



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

Efecto *in vitro* de cuatro cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
Cirujano Dentista

AUTORAS:

Albán Camacho, Emily Greidy (ORCID: 0000-0002-2735-025X)

Olivares Saba, Angie Esteffany (ORCID: 0000-0002-0285-3934)

ASESOR:

Dr. Ruiz Barrueto, Miguel Angel (ORCID: 0000-0002-3373-4671)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades infecciosas y transmisibles

PIURA – PERÚ

2021

Dedicatoria

A Dios, a nuestros padres Manuel y Adelina, Estela y José que nos dieron la vida y nos formaron con sapiencia.

A todas las personas que nos alentaron a continuar en este camino.

Agradecimiento

A nuestro asesor Dr. Miguel Angel Ruiz Barrueto por su apoyo y paciencia en el desarrollo de la presente tesis.

Índice de contenidos

Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	vi
Resumen.....	vii
Abstract.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	4
III. METODOLOGÍA.....	13
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	13
3.2. Variables y operacionalización	13
3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis.....	13
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	13
3.5. Procedimientos	14
3.6. Método de análisis de datos	15
3.7. Aspectos éticos.....	15
IV. RESULTADOS	16
V. DISCUSIÓN.....	21
VI. CONCLUSIONES.....	25
VII. RECOMENDACIONES	26
REFERENCIAS.....	27
ANEXOS	35
ANEXO 1	35
ANEXO 2	36
ANEXO 3	37

ANEXO 4	38
ANEXO 5	45

Índice de tablas

Tabla 1.....	17
Tabla 2.....	18
Tabla 3.....	19
Tabla 4.....	20
Tabla 5.....	21

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue comparar el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Fue una básica con diseño investigación experimental verdadero. Se evaluaron dos concentraciones de los probióticos *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus casei* ATCC 393. Todas las cepas probióticas y la cepa de *E. faecalis*, fueron cepas ATCC certificadas. El control positivo fue clorhexidina 2%. El efecto antibacteriano fue evaluado por el método de difusión en disco utilizando medios de cultivo con certificación ISO. Los resultados mostraron que *L. casei* ATCC 393 y *L. acidophilus* ATCC 4356 presentan el mismo efecto inhibitorio ($p=0,462$). Del mismo modo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el efecto inhibitorio de las dos concentraciones de *B. animalis* ATCC 25527 ($p=0,098$). El efecto inhibitorio de la concentración $1,5 \times 10^9$ UFC/mL de *B. animalis* ATCC 25527 y la concentración $1,5 \times 10^8$ de *L. lactis* ATCC 11454 es estadísticamente iguales ($p=0,111$). Se concluye que todos los probióticos mostraron efecto inhibitorio sobre *E. faecalis* de tipo bacteriostático y no superaron al control positivo que expresó efecto de tipo bactericida.

Palabras claves: *Enterococcus faecalis*, Probióticos, Antibacterianos, Antibiosis.

Abstract

The aim of the present investigation was to compare the in vitro effect of probiotic strains against *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. It was a basic with true experimental research design. Two concentrations of the probiotics *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus casei* ATCC 393. All probiotic strains and the *E. faecalis* strain were certified ATCC strains. The positive control was 2% chlorhexidine. The antibacterial effect was evaluated by the disk diffusion method using ISO certified culture media. The results showed that *L. casei* ATCC 393 and *L. acidophilus* ATCC 4356 show the same inhibitory effect ($p = 0.462$). Similarly, there is no statistically significant difference between the inhibitory effect of the two concentrations of *B. animalis* ATCC 25527 ($p = 0.098$). The inhibitory effect of the 1.5×10^9 CFU / mL concentration of *B. animalis* ATCC 25527 and the 1.5×10^8 concentration of *L. lactis* ATCC 11454 is statistically equal ($p = 0.111$). It is concluded that all the probiotics showed an inhibitory effect on bacteriostatic type *E. faecalis* and did not exceed the positive control that expressed a bactericidal effect.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, Probiotics, Antibacterials, Antibiosis.

I. INTRODUCCIÓN

En la cavidad oral existen diversos microorganismos que componen el microbioma como virus, hongos, protozoos además de alrededor de 700 especies de bacterias que habitan y colonizan de forma natural en condiciones de eubiosis, pero en ocasiones este vínculo entre el huésped y el microbioma puede alterarse debido al incremento de microorganismos patógenos produciéndose un desequilibrio en el cuerpo denominado Disbiosis o estado de enfermedad.¹ Actualmente existen diversos enfoques de tratamiento que intentan mantener las condiciones homeostáticas a nivel oral cuando se está produciendo una enfermedad.

Uno de estos tratamientos incluye a la endodoncia que es una rama de la estomatología destinada a la prevención, diagnóstico y tratamiento de las dolencias o afecciones de la pulpa dental² consiste en eliminar microorganismos patógenos a través de soluciones irrigantes y desinfección; aunque a veces cuando su proceso no es completo, las bacterias pueden permanecer y generar infección en el diente afectando el resultado del tratamiento³, este es un procedimiento cuyas tasas de éxito oscilan entre 86% y 98%.⁴

Habitualmente las fallas endodónticas surgen debido a la acción de agentes microbianos que persisten⁵ en la porción apical de los conductos radiculares, incluso en los dientes bien tratados.⁶ El principal microorganismo causante del fracaso en el tratamiento endodóntico⁷ es *Enterococcus faecalis*, un microorganismo patógeno anaerobio facultativo, grampositivo⁸, que se considera como un patógeno oportunista⁶ y produce infecciones en el sistema de los conductos radiculares con una prevalencia que varía entre el 24% y 90%.⁹ Entre las características principales de esta bacteria tenemos que es capaz de atravesar los túbulos dentinarios, sobrevivir en niveles de pH bajos y resistir a diversos medicamentos intracanales.¹⁰

Los irrigantes del conducto radicular juegan un papel vital en la reducción de microorganismos dentro del sistema del conducto radicular¹¹ en relación a la terapia química utilizada en el tratamiento de conductos, los irrigantes más empleados en la fase de limpieza son hipoclorito de sodio (NaOCl), ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y clorhexidina¹² que poseen efectos antimicrobianos pero a pesar de ello tienen diversas desventajas ya que, NaOCl

es altamente tóxico cuando entra en contacto con los tejidos blandos, produciendo inflamación aguda y posterior necrosis, además aumenta la permeabilidad de los vasos produciendo edema y sangrado profuso a través del canal radicular y daños al ligamento periodontal.¹³ En el caso de la clorhexidina su efecto antimicrobiano ya ha sido comprobado pero también se sabe que podría generar pigmentación dentaria y en algunos casos de uso excesivo episodios xerostómicos.¹¹

Se están investigando varios enfoques para manipular favorablemente la composición del microbioma oral¹ entre ellos se encuentran los probióticos que son considerados microorganismos vivos que al ser suministrados en dosis adecuadas conceden beneficios en la salud.¹⁴ Generalmente las bacterias de géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son microorganismos beneficiosos no solo para el sistema digestivo, sino también para la cavidad bucal.⁷ Ante la realidad problemática descrita se generó la siguiente interrogante ¿Cuál es el efecto *in vitro* de cuatro cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212?

Para llevar a cabo esta investigación se utilizaron cepas probióticas pues existen pocas investigaciones sobre el uso de los probióticos en beneficio de la terapia endodóntica, y aún no se han estudiado cuáles son las cepas particularmente efectivas o la concentración necesaria de éstas para contrarrestar la presencia de este tipo de patógenos en el conducto radicular. Existe alguna evidencia científica de que el consumo regular de probióticos proporciona beneficios a nivel de tubo digestivo, es por ello, que actualmente se están evaluando especies bacterianas similares en beneficio a la salud oral.

Además, considerando que las sustancias químicas utilizadas en la actualidad tienen efectos colaterales en la integridad bucal y la terapia antibiótica es responsable del desarrollo de resistencia a los antimicrobianos el propósito de este estudio fue investigar alternativas de tratamiento naturales y no perjudiciales que permitan controlar o impedir la proliferación de *Enterococcus faecalis*, principal especie responsable del fracaso en el pos tratamiento endodóntico.

Para solucionar la problemática planteada anteriormente se propuso el siguiente objetivo general: Comparar el efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. El cual se fundamenta en los siguientes objetivos específicos: Determinar el efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

ATCC 11454 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Determinar el efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Determinar el efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Determinar el efecto *in vitro* *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Según los datos evidenciados se propusieron las siguientes hipótesis:

H1: *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454 posee efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

H2: *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 posee efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

H3: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 posee efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

H4: *Lactobacillus casei* ATCC 393 posee efecto antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

II. MARCO TEÓRICO

Chen et al¹⁵ (2020) en Taiwán, su propósito fue evaluar la actividad antibacteriana de diversos probióticos y paraprobióticos e investigar su papel inhibidor contra patógenos orales. Fue un estudio experimental *in vitro*. Las cepas probióticas *L. salivarius* subsp. *salicinius* AP-32, *L. rhamnosus* CT-53, *L. paracasei* ET-66 y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CP-9 demostraron alta actividad antipatógena, sin embargo, AP-32, CT-53 y ET-66 muertos por calor evidenciaron niveles elevados de reducción. La acción antibacteriana de los probióticos no se vinculó con la producción de H₂O₂; *L. acidophilus* TYCA02 provocó numerosos niveles de H₂O₂, pero manifestaron actividades antibacterianas moderadas. Los comprimidos orales que incluyen probióticos demostraron positivos efectos inhibidores frente a patógenos orales, especialmente los que contienen probióticos viables. Concluyeron que los probióticos inhiben el crecimiento de microorganismos bucales y mejoran la salud oral.

How et al¹⁶ (2020) en Malasia tuvo como propósito evaluar el efecto antagónico de la soja fermentada con probióticos contra patógenos orales. Fue un estudio experimental *in vitro*. Se incorporó *Streptococcus salivarius* Tucc 1251, *S. salivarius* Tucc 1253, *S. salivarius* Tucc 1254, *S. salivarius* Tucc 1255 y *S. orisratti* Tucc 1253 en la fermentación de la soja a 37 ° C en 24 h y se hizo una prueba antimicrobiana de soja fermentada con *Streptococcus* contra *E faecalis* ATCC 700802, *S. pyogenes* ATCC 19615 y *S. aureus* ATCC 25923. Las cepas de *Streptococcus* revelaron un incremento significativo en su crecimiento después de la fermentación de la soja. La soja fermentada con Tucc 1253 de *S. salivarius* demostró actividad β-glucosidasa extracelular significativamente superior y una cantidad de agliconas. Concluyeron que la soja fermentada con *S. salivarius* Tucc 1253 tiene efecto antimicrobiano frente todos los microorganismos patógenos en condiciones anaeróbicas como aeróbicas.

El-Sayed et al¹⁷ (2019) en Egipto, tuvo como finalidad investigar el efecto inhibidor de *Lactobacillus rhamnosus* (B-445) como irrigante probiótico ante el crecimiento de *Enterococcus faecalis*. Fue un estudio *in vitro*. Se prepararon 42 dientes anteriores de un solo canal humano extraídos. Los dientes se agruparon según el tipo de irrigante y se les inoculó *E. faecalis*. El cultivo se prolongó durante 21 días.

G1=NaOCl al 2,5%, G2= solución salina y G3= irrigante probiótico experimental. Las muestras se recolectaron en conos de papel antes, inmediatamente después y 24 horas post posteriores al riego para el recuento de las UFC restantes de *E. faecalis* y de *L. rhamnosus*. Se determinó que G1 tuvo el valor medio más bajo (log 10 UFC / mL) de *E. faecalis* posterior al riego inmediato y 24 horas después del riego seguido por el grupo de probióticos, sin embargo, el valor medio más alto fue el grupo de solución salina ($P \leq 0,001$). El perfil de supervivencia de *L. rhamnosus* en el G3 después de la irrigación inmediata y posterior a la irrigación fue ligeramente superior para *E. faecalis* ($P \leq 0,001$). Concluyeron que *L. rhamnosus*, evidencia un efecto inhibidor potencias frente al crecimiento de *E. faecalis*.

Nair et al¹⁸ (2019) en Estados Unidos tuvo como objetivo investigar los efectos de una cepa probiótica de *Propionibacterium freudenreichii* frente a la multiplicación, la motilidad y la asociación de Salmonella y la invasión de las células epiteliales de aves. Fue un estudio experimental *in vitro*. Para ello se utilizaron *P. freudenreichii* subsp. *Freudenreichii* y *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii* contra *S. enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. heidelberg*, empleando co-cultivo, ensayos de motilidad, multiplicación, asociación celular e invasión. Las cepas demostraron eficacia inhibitoria en la proliferación de los 3 serotipos de Salmonella y el contenido cecal de pavo ($P \leq 0,05$). *P. freudenreichii* disminuyó de manera significativa la motilidad de Salmonella ($P \leq 0.05$). Concluyeron que *P. freudenreichii* posee potencial efecto antibacteriano contra Salmonella en aves de corral.

Elgamily et al¹⁹ (2018) en Egipto su objetivo fue evaluar la efectividad antibacteriana de un enjuague bucal probiótico sobre *Streptococcus mutans*. Fue un estudio experimental *in vitro*. Para ello se emplearon un total de tres grupos, G1 enjuague bucal experimental, G2 enjuague experimental con los dos aditivos activos (Zamzam y probiótico), y G3 enjuague comercial con hexitol, se utilizó el método de difusión de pozos después de 24h y 72h de almacenamiento período. El perfil de supervivencia de la cepa probiótica en el grupo G1 se determinó usando el método de UFC. *L. rhamnosus* mostró valores de halos de inhibición promedio más altos que el agua de zamzam. El G1 mostró un aumento

significativo en la zona de inhibición después de 72 h, aunque no hubo cambios importantes en el G3. Hubo un efecto reducido en el recuento de UFC en los probióticos durante 24 h y una disminución significativa después de 15 días, posterior a un cambio insignificante después de 30 días. Concluyeron que el enjuague experimental probiótico-zamzam tuvo efectividad frente a la reducción de *S. mutans*.

Invernici et al²⁰ (2018) en Brasil tuvo como objetivo evaluar el efecto de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* como adyuvante del raspado y alisado radicular en pacientes con periodontitis crónica generalizada. Fue un estudio experimental, ensayo clínico aleatorizado. Para ello, se reclutaron 41 pacientes que presentaban periodontitis crónica y fueron asignados aleatoriamente a un grupo de Prueba (SRP + Probiótico, n = 20) o Control (SRP + Placebo, n = 21). Las pastillas probióticas se utilizaron dos veces al día durante 30 días. En el grupo de prueba se observó un recuento mayor de *A. naeslundii* y *S. mitis* y una disminución pronunciada sobre el recuento de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum vincentii*, *C. showae* y *E. nodatum* que el grupo de control ($p < 0,05$) para bolsas periodontales. Además, evidenció proporciones medias de complejos naranja (a los 30 días) y rojo (a los 90 días) más bajas a diferencia de grupo de control ($p < 0,05$). Asimismo, se observó mayor proporción de microorganismos del complejo azul en relación con el grupo de control a los 90 días ($p < 0,05$). Concluyeron que la utilización de *B. lactis* HN019 como complemento del raspado y alisado radicular fomenta beneficios clínicos, microbiológicos e inmunológicos en el tratamiento de la periodontitis crónica.

Shin et al²¹ (2018) en Corea, tuvo como objetivo investigar el efecto inhibitor de *L. lactis* frente a la bioactividad de patógenos periodontales. Fue un estudio experimental in vitro. Se evaluó la actividad antibacteriana de SCM contra periodontopatógenos y para evaluar el efecto neutralizante de *L. lactis* sobre la halitosis, se mezcló SCM de periodontopatógenos con una suspensión de *L. lactis* y se midieron los niveles de compuestos de azufre volátiles. El SCM de *L. lactis* muestra actividad antimicrobiana contra las bacterias patógenas periodontales. Con ello, la suspensión de *L. lactis* tuvo un efecto neutralizante sobre las VSC producidas por periodontopatógenos, y *L. lactis* destruida por UV inhibió la

producción de IL-6 y TNF- α inducida por el LPS. Concluyeron que *L. lactis* podría considerarse como un probiótico apropiado en la prevención y tratamiento de periodontitis y halitosis.

Frickmann et al²² (2018) en Estados Unidos, su objetivo de estudio fue evaluar el efecto in vitro del sobrenadante del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Streptococcus salivarius* K12 sobre la replicación y la formación de biopelículas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*. Fue un estudio experimental in vitro. La evaluación se realizó en diferentes concentraciones de los probióticos durante 0,4 y 24 h post incubación. La amplificación bacteriana fue medida en lectores de microplacas y el estado de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido. Sin embargo, encontraron que *S. salivarius* K12 redujo y evitó la formación y maduración de biopelículas frescas, y redujo las biopelículas de *S. epidermidis* preformadas. *L. rhamnosus* GG no mostró efectos inhibidores claros por el contrario actuó como promotor del crecimiento planctónico y de biopelícula de *S. aureus* y *S. epidermidis*. Concluyó que los efectos inhibidores de *S. salivarius* K12 ante la formación de biopelículas estafilocócicas son de posible relevancia para las enfermedades asociadas con biopelículas.

Bohora et al²³ (2017) en India, su objetivo fue evaluar la eficacia antibacteriana de los probióticos contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 10231. Fue un estudio experimental in vitro. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de copa de agar y los resultados se expresaron en mm de halos de inhibición. Encontraron que los grupos probióticos inhibieron el desarrollo de *E. faecalis* por el método de copa de agar (Zona de inhibición de 20 mm), mientras que no hubo efecto sobre *C. albicans*. Concluyeron que las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son efectivas para prevenir el crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans* in vitro.

Parčina et al²⁴ (2017) en Croacia, tuvo como objetivo evaluar la capacidad antimicrobiana in vitro de pastas dentales probióticas que incluían en su composición *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus acidophilus*, además de una pasta de dientes sin probióticos por separado en combinación con enjuagues bucales que contenían aceites esenciales y hexitidina contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* y

Staphylococcus aureus. Fue un estudio experimental *in vitro*. Utilizando el método del pocillo se demostró que las pastas dentales probióticas tuvieron mejor efecto inhibitor que las pastas dentales sin probióticos en el caso de *C. albicans* ($p = 0.043$) y *S. salivarius* ($p = 0.043$). En todos los casos, las pastas dentales destacaron en su capacidad de inhibición a diferencia de los enjuagues bucales ($p \leq 0.05$). Concluyeron que las pastas dentales probióticas evitan la aparición de enfermedades infecciosas orales.

Lin X et al²⁵ (2017) en China tuvo como objetivo evaluar el efecto de los lactobacilos probióticos sobre *S. mutans* y biopelículas de diversas especies aisladas en niños que presentaban caries severa. Fue un estudio experimental *in vitro*. Para ello, se seleccionó a 20 niños con caries activa y se aisló *S. mutans* de su saliva. Se observó que *L. casei* Shirota, *L. casei* LC01, *L. plantarum* ST-III y *L. paracasei* LPC37 presentaron efectos inhibidores sobre *S. mutans* del 70-90% ($p < 0,05$). Además, redujeron significativamente el número de *S. mutans*, *Streptococcus spp.*, *S. sanguinis* y bacterias totales en biopelículas mixtas en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$). Se concluyó que estas cepas de lactobacilos fueron capaces de inhibir el crecimiento de *S. mutans* y tuvieron efectos sobre la composición de las biopelículas bacterianas *in vitro* siendo prometedoras para la prevención de caries dental.

Nadelman et al²⁶ (2017) en Brasil tuvo como propósito investigar los efectos de la leche de oveja fermentada probiótica que contenía en su composición *L. casei* sobre la desmineralización del esmalte y el recuento de microorganismos en un modelo de biopelícula mixto. Fue un estudio experimental. Para ello, se fijaron bloques de esmalte ($N = 50$) en placas de poliestireno en las que se formó una biopelícula mixta en un periodo de cinco días con leche de oveja (SM), leche de oveja fermentada con cultivo iniciador (SGSA); leche de oveja fermentada con cultivo probiótico (FSMP) y leche de oveja fermentada con cultivos iniciadores y probióticos (FSMSP), además se incluyó un grupo de control del crecimiento. Se obtuvo que FSMS y FSMP fueron similares ($p = 0,153$), ya que presentaron un menor número de microorganismos. Ambos fueron diferentes a FSMSP ($p < 0.05$), que presentó mayor número de microorganismos totales. FSMS presentó un recuento de *Streptococcus* más bajo en comparación con FSMP ($p = 0,04$) y

FSMSP ($p = 0,006$); no obstante, FSMP presentó una tendencia a controlar la desmineralización interna del esmalte, puesto que presentó valores de ΔZ más bajos en comparación con los otros grupos. Concluyeron que ambas muestras de leche de oveja fermentada probiótica (FSMP y FSMPS) son importantes en el desafío cariogénico.

En este marco, La Organización Mundial de la Salud (OMS) precisa que salud bucodental se relaciona con la ausencia de dolor orofacial, cáncer de boca o garganta, infecciones y llagas bucales, enfermedades periodontales, caries, pérdida de dientes asimismo a otras afecciones y trastornos que limitan a un individuo en sus capacidades de morder, masticar, sonreír y hablar, repercutiendo en su bienestar psicosocial.²⁷ Se calcula que estas enfermedades afectan a casi 3500 millones de personas en todo el mundo.²⁸

Por otra parte, la Endodoncia es una rama de la Odontología, admitida por la Asociación Dental Americana en el año 1963, etimológicamente deriva de las palabras griegas "Endo" que significa interior y "odont" diente.²⁹ Esta especialidad se encarga de estudiar la estructura, morfología y fisiología de la cavidad pulpar de los dientes, además de las enfermedades presentes debido al complejo dentinopulpar y región periapical.²⁷ Su principal objetivo es reducir la infección de los canales radiculares debido a microorganismos.^{30,31}

El estado periodontal de un diente es un aspecto fundamental a evaluar durante la planificación inicial de la terapia.³² El tratamiento de conductos puede variar de acuerdo a la anatomía y morfología dental, diagnóstico y complejidad del caso. Para ello el especialista realizará la apertura cameral para tener acceso a los conductos radiculares y eliminar el tejido pulpar, tomar radiografías para comprobar que los instrumentos ingresen en la longitud exacta de la raíz. Con ello los conductos radiculares se desinfectan y acondicionan, de manera que permitan sellar de forma apropiada para protegerlo de la contaminación finalizando con la restauración definitiva de la pieza dentaria.²

El fracaso del tratamiento endodóntico se ha definido como una reincidencia de signos clínicos junto con la presencia de una radiolucidez a nivel apical, aunque hay que tener en cuenta que para considerar un tratamiento de conductos radiculares como exitoso este debe ser evaluado clínica y radiográficamente a

través del tiempo, es decir, el especialista debe dar seguimiento al paciente y asegurarse que el tratamiento haya sido exitoso y que el diente implicado sea funcional.⁵ Las infecciones primarias del espacio endodóntico son causadas principalmente por especies anaeróbicas de *Enterococcus faecalis*.³³ Sin embargo, el surgimiento de estas sucede por la eliminación incompleta del tejido pulpar, de las bacterias presentes en los conductos radiculares o de una contaminación.⁶

Estas fallas endodónticas pueden atribuirse a bacterias patógenas que han subsistido a los procedimientos biomecánicos o colonizado los conductos radiculares mediante la filtración coronal en dientes con raíces obturadas. La especie bacteriana más involucrada y frecuente⁶ pertenece a la familia *Enterococcus*. Esta bacteria es un coco gram positivo, que se agrupa formando diplos o cadenas cortas. Son mesófilos, capaces de crecer en un amplio rango de pH que va de 4,4 a 9,6 y tolerar medios salinos con 6,5% de NaOCl.³⁴

E. faecalis es la especie más predominante del género *Enterococcus*.³⁵ Forma parte del microbioma del ser humano siendo el tracto gastrointestinal su hábitat natural. También se ha aislado de la cavidad oral. Este microorganismo prevalece en pacientes con tratamiento o retratamiento endodóntico. Está asociado a persistentes infecciones, y es capaz de sobrevivir a los procedimientos pulpares y tratamientos de conductos. La prevalencia de *E. faecalis* fluctúa entre 24% y 77% debido a infecciones endodónticas persistentes asintomáticas.³⁶

Algunos factores de virulencia de *E. faecalis* incluyen su capacidad de adaptación y supervivencia en diversos hábitats, la liberación de toxinas tipo citolisina, además de su alta persistencia en el conducto radicular, lograda principalmente debido a la producción de sustancias de agregación, la expresión de adhesinas, y la facilidad para formar biofilm, y seguir invadiendo y habitando los túbulos dentinarios. Producen gelatinasa lo que les permite sobrevivir a largo plazo en los canales radiculares.³⁷

En la actualidad, existen diversas terapias para el control de *E. faecalis* a nivel oral como las soluciones irrigantes entre las más empleadas encontramos el Hipoclorito de sodio y la Clorhexidina los cuales presentan efectos lubricantes y antibacterianos, además existen otras técnicas como la fitoterapia que consiste

en utilizar sustancias naturales para la desinfección de los conductos radiculares³⁸ y el uso de probióticos los cuales son considerados como una nueva tecnología potencial en el campo endodóntico ya que pueden desempeñar un rol muy importante en la eliminación de microorganismos patógenos entre ellos *E. faecalis*.³⁹

Los probióticos son microorganismos que al ser administrados adecuadamente son beneficiosos para la salud. Un probiótico es considerado como tal cuando es de origen humano, es seguro, no patógeno o tóxico e incapaz de producir resistencia a antibióticos. Debe ser capaz de sobrevivir en el tubo digestivo, tener comportamiento antagónico contra bacterias patógenas y debe estimular al sistema inmunológico, mostrando efectos beneficiosos en el huésped.⁴⁰ El uso de los probióticos otorgan beneficios a varias áreas del cuerpo incluidas la boca, tracto gastrointestinal, respiratorio o urinario, piel, vagina, etc. y pueden utilizarse en personas sanas o enfermas.⁴¹

Los probióticos ejercen su mecanismo de acción liberando componentes antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, además, producen compuestos ácidos que reducen los niveles del pH e inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos también, impiden la adhesión de bacterias o compiten por el sustrato mediante la exclusión competitiva. Finalmente producen modulación del sistema inmune ejerciendo acción antiinflamatoria.^{42,43}

En la Salud oral diversas cepas de probióticos han mostrado una efectividad significativa en la prevención de caries dental, halitosis, enfermedad periodontal, candidiasis y otros problemas bucales, tanto in vitro como in vivo cuando son administrados de forma continua y durante algunas semanas. Las investigaciones han mostrado que los probióticos inhiben patógenos orales e impiden la colonización de estas, además mantienen el pH equilibrado. Es por ello que los probióticos se pueden adoptar como un enfoque novedoso para mejorar la salud oral.¹⁴

Entre las cepas probióticas encontramos *Propionibacterium freudenreichii ssp. shermanii* ATCC 9614 son bacilos grampositivos que se desarrollan a 15°C y 40°C en un pH de 5,1 a 8,5;⁴⁴ además de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* DSM 15954 una cepa capaz de competir e inhibir con los agentes patógenos y

desplazar los sitios de adhesión⁴⁵ y *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 11454 un coco anaeróbico grampositivo⁴⁶ que podría actuar como agente antimicrobiano.⁴⁷

Según datos recopilados, para evaluar la actividad antibacteriana de diferentes sustancias incluidas los probióticos se pueden utilizar varios métodos de laboratorio. Entre los métodos más empleados se encuentra el método de difusión en disco y en pocillos que consiste en inocular sobre las placas de agar un inóculo estandarizado del microorganismo, ambos métodos proporcionan resultados fáciles de interpretar.^{48,49}

III. METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

Esta investigación es de tipo básica y con diseño experimental puro.⁵⁰

3.2. Variables y operacionalización

La variable dependiente (VD): Cepas probióticas.

Variable independiente (VI): Efecto in vitro contra *Enterococcus faecalis*.

3.3. Población (criterios de selección), muestra, muestreo, unidad de análisis

La población estuvo constituida por tres cepas: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393 y además de la cepa problema *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

La muestra estuvo conformada por el inóculo de cada una de las cepas probióticas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393), además del inóculo de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

La unidad de análisis estuvo constituida por una placa petri sembrada con la bacteria de interés y enfrentada a los probióticos evaluados.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó la técnica de la experimentación. Las metodologías utilizadas fueron propuestas por el Clinical and Laboratory standard institute (CLSI) para garantizar la fiabilidad de los resultados. Se utilizó el método turbidimétrico para la obtención del inóculo de las cepas probióticas, así como de la cepa problema. La estandarización del inóculo se realizó en espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10S. La evaluación del efecto in vitro se realizó mediante los métodos de difusión en disco y pocillo. Se utilizó un equipo vernier para la medición de los halos de inhibición en los métodos de Difusión en disco y en pocillo. Ambos equipos no requirieron calibración. El procesamiento fue llevado a cabo por un experto microbiólogo (Asesor) por ello, las investigadoras no requirieron calibración.

3.5. Procedimientos

Obtención de cepas probióticas y de *Enterococcus faecalis*.

Las cepas liofilizadas certificadas fueron adquiridas de GenLab del Perú S.A.C. Estas serán; *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus casei* ATCC 393.

Medios de cultivo y condiciones de cultivo para la reactivación de cepas

El caldo Mann-Rogosa-Sharpe (MRS) se utilizó para reactivación de las cepas probióticas. La cepa de *E. faecalis* se reactivó en caldo soya tripticasa en condiciones de microaerofilia a 37 °C durante 24 horas. La cepa de *E. faecalis* se mantuvo viable en agar mitis salivarius-Bacitracina pero la evaluación del efecto in vitro se realizó en Agar MRS y agar sangre. En su totalidad los medios de cultivo fueron de la marca Merck, con certificación de calidad ISO 11133.⁵¹

Preparación del inóculo microbiano

El número de unidades formadoras de colonia (UFC) en suspensión de todas las cepas microbiológicas a utilizadas en el estudio se determinó con un espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10S. Se obtuvieron dos concentraciones estándar de $1,5 \times 10^8$ y $1,5 \times 10^9$ UFC/mL para las cepas probióticas y de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL para *E. faecalis*. La densidad óptica y la longitud de onda a utilizadas fueron de 0,381 y 530 nm para *E. faecalis*, respectivamente, y de 0,296 y 600 nm para las cepas probióticas. Las densidades de células de los inóculos se confirmaron mediante el recuento de UFC/mL en medio de cultivo sólido.⁵²

Prueba de susceptibilidad de *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis ATCC 29212 se cultivó en agar sangre a 37°C durante 24 – 48 horas en anaerobiosis obtenida mediante sistema Gaspak. Se empleó el método de difusión en disco, recomendado por Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) para estimar el efecto inhibitorio según la guía M100.⁵³ Para ello las placas que contenían los medios de cultivo se inocularon previamente mediante la dispersión en superficie con un hisopo a partir del

inóculo de *E. faecalis*. Antes de situar sobre la superficie los discos de susceptibilidad (Papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro y 1mm de espesor) embebidos con los probióticos y los controles, las placas sembradas se secaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después las placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas en sistema de anaerobiosis Gaspak. Posterior al tiempo de incubación se realizaron las lecturas de los halos de inhibición formados, estos fueron expresados en milímetros y registrados en la ficha de recolección de datos. Los ensayos se realizaron por octuplicado. Se utilizó el mismo procedimiento con el método de difusión en pozo. Se empleó dos controles, el control positivo fue Gluconato de clorhexidina al 2% y el control negativo fue solución salina estéril 0,9%.^{54,55}

3.6. Método de análisis de datos

Los datos recopilados en la ficha de recolección de datos fueron tabulados en el programa Excel 2010. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete SPSS v.26. La normalidad de los datos se calculó con la prueba de Shapiro-Wilk, se obtuvieron datos normales por ello, se realizó el análisis paramétrico con ANOVA unidireccional. La comparación de las medias de los resultados y su significancia estadística fue establecida mediante el análisis post hoc de Tukey con un nivel de confianza del 95%.⁵⁶

3.7. Aspectos éticos

Las investigaciones experimentales se fundamentan éticamente en el uso responsable y seguro de los microorganismos. En relación a ello se tomó en cuenta los protocolos de bioseguridad instaurados en los manuales de operatividad del laboratorio de investigación Science Experiment E.I.R.L, sede Trujillo. Además, se acataron los manuales de gestión de residuos peligrosos y biocontaminados del laboratorio, del Ministerio de Salud (MINSA)⁵⁷ y de la Organización Mundial de la Salud (OMS).⁵⁸

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Comparación del efecto *in vitro* de cepas probióticas contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

SUSTANCIA	Concentración UFC/mL	Diámetro de halo de inhibición en mm Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>L. casei</i> ATCC 393	1,5 x10 ⁸	6,44				
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356		6,50				
<i>L. casei</i> ATCC 393	1,5 x10 ⁹	6,76				
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356		6,84				
<i>B. animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 ⁸	8,21				
	1,5 x10 ⁹	8,76 8,76				
<i>L. lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 ⁸	9,30				
<i>L. lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 ⁹	9,95				
Clorhexidina	2%	14,75				
Sig.*		0,462	0,098	0,111	1,000	1,000

* Sig.= p= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

La tabla 1 muestra los subconjuntos formados después del análisis y comparación de los promedios de halos de inhibición mediante la prueba de Tukey. Entiéndase por subconjunto a la agrupación de medias sin diferencia estadística significativa ($p > 0,05$). Se evaluaron 2 concentraciones de 4 probióticos más un control lo que haría teóricamente un total de 9 subconjuntos de ensayo, sin embargo, se aprecia que la prueba estadística solo formó 5 subconjuntos. Esto debido a que el análisis considera en el primer subconjunto que las dos concentraciones de *L. casei* ATCC 393 y *L. acidophilus* ATCC 4356 presentan el mismo efecto inhibitorio ($p = 0,462$). Del mismo modo, en el segundo subconjunto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el efecto inhibitorio de las dos concentraciones de *B. animalis* ATCC 25527 ($p = 0,098$). El tercer subconjunto lo conforma la concentración 1,5 x10⁹ UFC/mL de *B. animalis* ATCC 25527 con la concentración 1,5 x10⁸ de *L. lactis* ATCC 11454 (efecto inhibitorio estadísticamente igual; $p = 0,111$). El cuarto y quinto subconjunto lo conforma la concentración 1,5 x10⁹ de *L. lactis* y la clorhexidina 2% utilizado como control positivo respectivamente.

Tabla 2. Efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Sustancia	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	p**
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	1,5 x10 ⁸ UFC/mL	9,30	0,176	Bacteriostático	0,023
	1,5 x10 ⁹ UFC/mL	9,95	0,271	Bacteriostático	
Clorhexidina	2%	14,75	0,926	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** p= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 2 se observa el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 y el control clorhexidina 2% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se muestra que a la concentración de 1,5 x10⁸ del probiótico, se generó un halo de inhibición promedio de 9,30 ± 0,176 mm y a la concentración de 1,5 x10⁹ un halo de inhibición promedio de 9,95 ± 0,271 mm (efecto bacteriostático). El control positivo, clorhexidina 2% formo un halo de 14,75 ± 0,926 mm (Efecto bactericida). Se observa diferencia estadística entre las dos concentraciones del probiótico y también respecto al control (p<0,05).

Tabla 3. Efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Sustancia	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	p^{**}
<i>Bifidobacterium animalis</i> ATCC 25527	1,5 x10 ⁸ UFC/mL	8,21	0,272	Bacteriostático	0,098
	1,5 x10 ⁹ UFC/mL	8,76	0,327	Bacteriostático	
Clorhexidina	2%	14,75	0,926	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** p = Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 3 se observa el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 y el control clorhexidina 2% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se muestra que a la concentración de 1,5 x10⁸ del probiótico, se generó un halo de inhibición promedio de 8,21 ± 0,272 mm y a la concentración de 1,5 x10⁹ un halo de inhibición promedio de 8,76 ± 0,327 mm (efecto bacteriostático). El control positivo, clorhexidina 2% formo un halo de 14,75 ± 0,926 mm (Efecto bactericida). No existe diferencia estadística entre el efecto inhibitorio de las concentraciones del probiótico por lo que ambos efectos se consideran iguales ($p > 0,05$) pero si entre estas y el control positivo ($p < 0,05$).

Tabla 4. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Sustancia	Concentración	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	p**
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	1,5 x10 ⁸ UFC/mL	6,50	0,355	Bacteriostático	0,677
	1,5 x10 ⁹ UFC/mL	6,84	0,279	Bacteriostático	
Clorhexidina	2%	14,75	0,926	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** p= Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 4 se reporta el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y el control clorhexidina 2% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se muestra que a la concentración de 1,5 x10⁸ del probiótico, se generó un halo de inhibición promedio de 6,50 ± 0,355 mm y a la concentración de 1,5 x10⁹ un halo de inhibición promedio de 6,84 ± 0,279 mm (efecto bacteriostático). El control positivo, clorhexidina 2% formo un halo de 14,75 ± 0,926 mm (Efecto bactericida). No existe diferencia estadística entre el efecto inhibitorio de las concentraciones del probiótico por lo que ambos efectos se consideran iguales (p>0,05) pero si entre estas y el control positivo (p<0,05).

Tabla 5. Efecto *in vitro* de *Lactobacillus casei* ATCC 393 y el control clorhexidina 2% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Sustancia	Concentración UFC/mL	Zona de inhibición (mm)			
		Media	D.E*	Efecto	p^{**}
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	1,5 x10 ⁸	6,44	0,374	Bacteriostático	0,630
	1,5 x10 ⁹	6,76	0,316	Bacteriostático	
Clorhexidina	2%	14,75	0,926	Bactericida	0,000

*D. E= Desviación estándar (ANOVA).

** p = Significancia (HSD Tukey^a).

Fuente: Análisis estadístico

En la tabla 5 se reporta el efecto inhibitorio *in vitro* de dos concentraciones del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 393 y el control clorhexidina 2% contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Se muestra que a la concentración de 1,5 x10⁸ del probiótico, se generó un halo de inhibición promedio de 6,44 ± 0,374 mm y a la concentración de 1,5 x10⁹ un halo de inhibición promedio de 6,76 ± 0,316 mm (efecto bacteriostático). El control positivo, clorhexidina 2% formo un halo de 14,75 ± 0,926 mm (Efecto bactericida). No existe diferencia estadística entre el efecto inhibitorio de las concentraciones del probiótico por lo que ambos efectos se consideran iguales ($p > 0,05$) pero si entre estas y el control positivo ($p < 0,05$).

V. DISCUSIÓN

Los probióticos son microorganismos que cuando son aplicados al cuerpo o ingeridos generan beneficios para la salud de quien las consume.⁶¹ En los últimos años ha habido un rápido aumento del interés por la aplicación de suplementos probióticos para actuar como mediadores en la salud y la enfermedad. Este atractivo se debe principalmente a la evidencia cada vez mayor de la interacción del microbioma y los procesos patofisiológicos de la enfermedad dentro del huésped humano.⁶²

En la presente investigación se comparó el efecto inhibitorio de dos concentraciones de los probióticos *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 y *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 mediante el método de difusión en disco. Las concentraciones evaluadas fueron $1,5 \times 10^8$ UFC/mL y $1,5 \times 10^9$ UFC/mL. Con el probiótico *L. lactis* a su primera concentración formó halos de inhibición de $9,30 \pm 0,176$ mm y con la segunda halos de inhibición promedio de $9,95 \pm 0,271$ mm. Por su parte el probiótico *B. animalis* a la primera concentración generó un halo de inhibición promedio de $8,21 \pm 0,272$ mm y a la segunda concentración un halo de inhibición de $8,76 \pm 0,327$ mm. De igual manera, *L. acidophilus* formó halos de inhibición de $6,50 \pm 0,355$ mm y de $6,84 \pm 0,279$ mm a la primera y segunda concentración respectivamente. Finalmente, *L. casei* a la primera concentración formó halos de inhibición promedio de $6,44 \pm 0,374$ mm y a la segunda halos de inhibición de $6,76 \pm 0,316$ mm. La clorhexidina 2% formó un halo de $14,75 \pm 0,926$ mm. El método establece que halos de inhibición menores a 12 mm corresponden al efecto inhibitorio de tipo bacteriostático y superiores a 14 mm efecto bactericida, por lo que la inhibición generada por todos los probióticos fue de tipo bacteriostático y solo el control mostró efecto bactericida.

Al respecto, Chen et al¹⁵ investigaron experimentalmente la actividad antibacteriana de diversos probióticos y paraprobóticos contra patógenos orales. Demostraron que los probióticos *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* y *Bifidobacterium animalis* presentan alta actividad inhibitoria contra los principales microorganismos orales. Ellos fundamentaron que probablemente la producción

de peróxido de hidrógeno pudo ser el responsable de la capacidad inhibitoria de los probióticos vivos. Este mismo fenómeno pudo haber ocurrido durante la evaluación en la presente investigación, pues la producción de sustancias antagonistas como ácido láctico, bacteriocinas o H₂O₂ es una característica intrínseca de las diferentes especies de lactobacillus como lo reporta Tomás et al.⁶³

Por su parte, How et al¹⁶ evaluaron el efecto antagónico de la soja fermentada con los probióticos *Streptococcus salivarius* TUCC 1251, *S. salivarius* TUCC 1253, *S. salivarius* TUCC 1254, *S. salivarius* TUCC 1255 y *S. orisratti* TUCC 1253 contra los patógenos orales *Enterococcus faecalis* ATCC 700802, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Revelaron que la soja fermentada con *S. salivarius* TUCC 1253 tiene efecto antimicrobiano de tipo bacteriostático frente todos los microorganismos patógenos. Estos resultados se relacionan con los reportados en la presente investigación y con los publicados por El-Sayed et al¹⁷ quienes investigaron el efecto inhibitor de *Lactobacillus rhamnosus* (B-445) como irrigante probiótico ante el crecimiento de *Enterococcus faecalis*. Reportó que el probiótico *L. rhamnosus* evidencia un efecto inhibitorio potencial frente al crecimiento de *E. faecalis*. El fundamento radica, como se ha mencionado anteriormente en la capacidad de los diferentes probióticos de producir sustancias con potencial antimicrobiano. Además de las sustancias ya mencionadas, Mishra et al⁶⁴ estableció que los probióticos producen ácido acético, dióxido de carbono, diacetilo con capacidad de inhibir principalmente a las bacterias aerobias, además de las bacteriocinas que son proteínas biológicamente activas de bajo peso molecular que inhiben el crecimiento de una variedad de bacterias patógenas.

En ese sentido, Nair et al¹⁸ evaluaron los efectos de una cepa probiótica de *Propionibacterium freudenreichii* frente a la multiplicación, la motilidad y la asociación de *Salmonella*. Estableció que *P. freudenreichii* posee efecto antibacteriano potencial contra *Salmonella*. De igual manera, Nadelman et al¹⁹ investigaron los efectos de la leche de oveja fermentada con el probiótico *L. casei* sobre la desmineralización del esmalte y el recuento de microorganismos en un

modelo de biopelícula mixto. Se reportó que la leche fermentada y enriquecida con el probiótico disminuyó significativamente el número de *Streptococcus mutans*, considerando que el consumo de un tipo de leche similar contribuiría a dar solución al desafío cariogénico. Estos resultados nos permiten predecir que el uso de probióticos podría ser una alternativa para dar solución a los principales patógenos orales. Pues no podemos olvidar que si bien, *Enterococcus faecalis* es una especie distinta a *Streptococcus mutans*, ambas comparten características similares como la morfología y su reacción a la tinción de gram, pues son cocos gram positivos.

De la misma manera, Elgamily et al²⁰ evaluaron la efectividad antibacteriana de un enjuague bucal probiótico sobre *Streptococcus mutans*. El probiótico utilizado fue *L. rhamnosus*. Establecieron que el enjuague experimental probiótico-zamzam tuvo actividad inhibitoria contra *S. mutans* reduciendo su desarrollo. Similares resultados fueron reportados por Parčina et al²⁵ determinaron la capacidad antimicrobiana in vitro de pastas dentales probióticas que incluían en su composición *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus acidophilus* contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* y *Staphylococcus aureus*. Demostraron que las pastas dentales probióticas tuvieron mejor efecto inhibitor que las pastas dentales sin probióticos en el caso de *C. albicans* y *S. salivarius* y contribuirían a la aparición de enfermedades infecciosas orales. Como se puede ver, los probióticos son efectivos en estudios experimentales para inhibir el crecimiento de patógenos orales cuando son enfrentados de manera directa, sin embargo, también conservan su efectividad cuando son suministrados con otros soportes como los enjuagues bucales y las pastas dentales, incrementando así sus posibilidades de aplicación y utilidad por la población.

Por su parte, Invernici et al²¹ evaluaron el efecto de *Bifidobacterium animalis* como adyuvante del raspado y alisado radicular en pacientes con periodontitis crónica generalizada. Observaron una disminución pronunciada sobre el recuento de *P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum vincentii*, *C. showae* y *E. nodatum* para bolsas periodontales. Establecieron que la utilización de *B. lactis* HN019 como complemento del raspado y alisado radicular fomenta beneficios

clínicos, microbiológicos e inmunológicos en el tratamiento de la periodontitis crónica. Estos resultados nos permiten comprender el gran potencial que tendrían los probióticos a nivel oral, no solo frente a microorganismos gram positivos como *Enterococcus faecalis* sino también contra bacterias gramnegativas como las asociadas a la enfermedad periodontal como lo demostró Shin et al²² quienes investigaron el efecto inhibitorio de *L. lactis* frente a la bioactividad de patógenos periodontales. Sus resultados les permitieron enunciar que *L. lactis* podría considerarse como un probiótico apropiado en la prevención y tratamiento de la periodontitis y la halitosis.

Estudios como los de Bohora et al²⁴ y Lin X et al²⁶ quienes evaluaron la eficacia antibacteriana de los probióticos contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Candida albicans* ATCC 10231 y *S. mutans*. Encontraron que los grupos probióticos inhibieron el desarrollo de *E. faecalis* con halos de inhibición de 20 mm, mientras que no hubo efecto sobre *C. albicans* además observaron que *L. casei*, *L. casei* LC01, *L. plantarum* ST-III y *L. paracasei* LPC37 presentaron efectos inhibitorios sobre *S. mutans* considerándolas prometedoras para la prevención de caries dental.

VI. CONCLUSIONES

1. El efecto inhibitorio *in vitro* del probiótico *Lactobacillus casei* ATCC 393 es estadísticamente igual al de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sin embargo son diferentes de *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527, de *Lactococcus lactis* ATCC 11454 y del control positivo clorhexidina 2%.
2. El efecto *in vitro* de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 11454 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es de tipo bacteriostático.
3. El efecto *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* ATCC 25527 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es de tipo bacteriostático.
4. El efecto *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es de tipo bacteriostático.
5. El efecto *in vitro* *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 es de tipo bacteriostático.

VII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar y comparar diferentes concentraciones de probióticos nativos contra biofilm de interés estomatológico.
2. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactococcus lactis* contra *Enterococcus faecalis* para convertirlo en efecto bactericida.
3. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* ATCC 25527 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para convertirlo en efecto bactericida.
4. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para convertirlo en efecto bactericida.
5. Determinar de qué manera se puede potenciar el efecto inhibitorio de *Lactobacillus casei* ATCC 393 contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 para convertirlo en efecto bactericida.

REFERENCIAS

1. Marsh PD. In *Sickness and in Health - What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective*. *Adv Dent Res* [Internet]. 2018 [Citado 7 set 2020]; 29(1): 60-5. Disponible en: DOI: 10.1177/0022034517735295.
2. Hargreaves KM, Cohen S. *Vías de la Pulpa*. Vol. 10a ed. España: Elsevier; 2011.
3. Trevino A, González-Amaro A, Méndez V, Pozos-Guillen A. Frecuencia de *Candida* en conductos radiculares de dientes con infección endodóntica primaria y persistente. *Rev Iberoam Micol* [Internet]. 2017 [Citado 7 set 2020]; 35(2):78-82. Disponible en: DOI: 10.1016/j.riam.2017.09.004.
4. Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2019 [Citado 7 set 2020]; 24(3):e364-72. Disponible en: DOI: 10.4317/medoral.22907.
5. Tabassum S, Khan FR. Failure of endodontic treatment: The usual suspects. *Eur J Dent* [Internet]. 2016 [Citado 7 set 2020]; 10(1): 144-7. Disponible en: DOI: 10.4103/1305-7456.175682.
6. Rodríguez-Niklitschek C, Oporto OH. Clinical implications of *Enterococcus faecalis* microbial contamination in root canals of devitalized teeth: Literature review. *Rev Odont Mex* [Internet]. 2015 [Citado 7 set 2020]; 19(3): 177-82. Disponible en: DOI: 10.1016/j.rodex.2016.02.024.
7. Priyadharsini V, Girija S, Paramasivam A. *Enterococcus faecalis*: an emerging microbial menace in dentistry – an insight into the in-silico detection of drug resistant genes and its protein diversity. *J Clin Diagn Res* [Internet]. 2018 [Citado 7 set 2020]; 12(10): 6-10. Disponible en: DOI: 10.7860/JCDR/2018/36480.12155.
8. Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E, et al. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 [Citado 7 set 2020]; 6: 1534. Disponible en: DOI: 10.3389/fmicb.2015.01534.
9. Llena C, Almarche A, Mira A, López A. Antimicrobial efficacy of the supernatant of *Streptococcus dentisani* against microorganisms implicated in root canal

- infections. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2019 [Citado 7 set 2020]; 61(1): 184-94. Disponible en: DOI: doi.org/10.2334/josnurd.18-0239.
10. Damayanti L, Evaangelina IA, Laviana A, Herdiyati Y, Kurnia D. Antibacterial Activity of Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) Against Bacterial Oral Pathogen of *Streptococcus sanguinis* ATCC10556, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212: An in Vitro Study. *Open Dent J* [Internet]. 2020 [Citado 7 set 2020]; 14(1): 113-9. Disponible en: DOI: 10.2174/18742106020140113.
 11. Varadan P, Ganesh A, Konindala R, Nagendrababu V, Ashok R, Deivanayagam K. Comparación de la eficacia antibacteriana de la alexidina y la clorhexidina frente a *Enterococcus faecalis*: un estudio in vitro. *Cureus* [Internet]. 2017 [Citado 10 set 2020]; 9(10): e1805. Disponible en: DOI: 10.7759 / cureus.1805.
 12. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. *Eur J Dent* [Internet]. 2018 [Citado 10 set 2020]; 12(3): 459-66. Disponible en: DOI: 10.4103/ejd.ejd_56_18.
 13. Marín ML, Gómez B, Cano AD, Cruz S, Castañeda DA, Castillo EY. Hipoclorito de sodio como irrigante de conductos. Caso clínico, propuesta terapéutica, y Revisión de literatura. *Av Odontoestomatol* [Internet]. 2019 [Citado 10 set 2020]; 35(1): 33-43. Disponible en: DOI: 10.4321/s0213-12852019000100005.
 14. Chugh P, Dutt R, Sharma A, Bhagat N, Dhar MS. A critical appraisal of the effects of probiotics on oral health. *J Funct Foods* [Internet]. 2020 [Citado 7 set 2020]; 70: 103985. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jff.2020.103985.
 15. Chen Y, Hsieh P, Ho H, Hsieh S, Kuo Y, Yang S, et al. Antibacterial activity of viable and heat-killed probiotic strains against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2020 [Citado 17 set 2020]; 70(1): 310-7. Disponible en: DOI: 10.1111/lam.13275.
 16. How YH, Ewe JA, Song KP, Kuan CH, Kuan CS, Yeo SK. Soy fermentation by indigenous oral probiotic *Streptococcus* spp. and its antimicrobial activity against oral pathogens. *Int Food Res* [Internet]. 2020 [Citado 17 set 2020]; 27(2): 357-65. Disponible en: [http://www.ifrj.upm.edu.my/27%20\(02\)%202020/17%20-%20IFRJ19824.R1.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/27%20(02)%202020/17%20-%20IFRJ19824.R1.pdf)

17. El-Sayed H, Aly Y, Elgamily H, Nagy MM. A Promising Probiotic Irrigant: An In Vitro Study. *Open Access Maced J Med Sci* [Internet]. 2019 [Citado 17 set 2020]; 7(3): 407-11. Disponible en: DOI: 10.3889/oamjms.2019.074.
18. Nair DVT, Kollanoor A. Effect of *Propionibacterium freudenreichii* on *Salmonella* multiplication, motility, and association with avian epithelial cells¹. *Poult Sci* [Internet]. 2017 [Citado 20 oct 2020]; 96(5): 1376-86. Disponible en: DOI: 10.3382/ps/pew367.
19. Elgamily H, Mosallam O, El-Sayed H, Mosallam R. Antibacterial effectiveness of probiotic-based experimental mouthwash against cariogenic pathogen: An in vitro study. *Eur J Dent* [Internet]. 2018 [Citado 17 set 2020]; 12(1): 7-14. Disponible en: DOI: 10.4103/ejd.ejd_253_17.
20. Invernici MM, Salvador SL, Silva PH, Soares MS, Casarin R, Palioto DB, et al. Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2018 [Citado 20 oct 2020]; 45(10): 1198-210. Disponible en: DOI: 10.1111/jcpe.12995.
21. Shin HS, Baek DH, Lee SH. Inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the bioactivity of periodontopathogens. *J Gen Appl Microbiol* [Internet]. 2018 [Citado 20 oct 2020]; 64(2): 55-61. Disponible en: DOI: 10.2323/jgam.2017.06.003.
22. Frickmann H, Klenk C, Warnke P, Redanz S, Podbielski A. Influence of probiotic culture supernatants on in vitro biofilm formation of staphylococci. *Eur J Microbiol Immunol* [Internet]. 2018 [citado 11 Nov 2020]; 8(4):119-27. Disponible en: <https://akjournals.com/view/journals/1886/8/4/article-p119.xml>
23. Bohora A, Kokate Sh. Good Bugs vs Bad Bugs: Evaluation of Inhibitory Effect of Selected Probiotics against *Enterococcus faecalis*. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2017 [Citado 10 set 2020]; 18(4): 312-6. Disponible en: DOI: 10.5005/jp-journals-10024-2037.
24. Parčina I, Cigić L, Gavić L, Radić M, Biočina D, Tonkić M, et al. Antimicrobial efficacy of probiotic-containing toothpastes: an in vitro evaluation. *Med Glas* [Internet]. 2017 [Citado 10 set 2020]; 14(1): 139-44. Disponible en: DOI: 10.17392/870-16.
25. Lin X, Chen X, Tu Y, Wang S, Chen H. Effect of Probiotic *Lactobacilli* on the Growth of *Streptococcus Mutans* and Multispecies Biofilms Isolated from

- Children with Active Caries. *Med Sci Monit* [Internet]. 2017 [Citado 17 may 2020]; 30(23):4175-81. Disponible en: DOI: 10.12659/msm.902237.
26. Nadelman P, Frazão J, Vieira T, Balthazar C, Andrade M, Alexandria A, et al. The performance of probiotic fermented sheep milk and ice cream sheep milk in inhibiting enamel mineral loss. *Int Food Res J* [Internet]. 2017 [Citado 02 may 2021]; 97(1): 184–90. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.051>.
27. Organización Mundial de la Salud. Nota descriptiva sobre la Salud bucodental [Internet]. Perú: OMS; 2020 [Citado 17 set 2020]. Disponible en: https://www.who.int/topics/oral_health/es/#:~:text=La%20salud%20bucodental%2C%20fundamental%20para,otras%20enfermedades%20y%20trastornos%20que.
28. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* [Internet]. 2018 [Citado 14 set 2020]; 392(10159): 1789-858. Disponible en: DOI: 10.1016/S0140-6736(18)32279-7.
29. American Dental Association. Endodoncia [Internet]. Perú: ADA; 2020 [Citado 17 set 2020]. Disponible en: <https://www.mouthhealthy.org/es-MX/az-topics/e/endodontics>.
30. Toledo L, Carrazana MA, Barreto E. Evolución del tratamiento endodóntico y factores asociados al fracaso de la terapia. *Rev Med Electrón* [Internet]. 2016 [Citado 14 set 2020]; 20(3): 202-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medicentro/cmc-2016/cmc163f.pdf>
31. Monardes H, Lolas C, Aravena J, González H, Abarca J. Evaluación del tratamiento endodóntico y su relación con el tipo y la calidad de la restauración definitiva. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* [Internet]. 2016 [Citado 14 set 2020]; 9(2): 108-13. Disponible en: DOI: 10.1016/j.piro.2016.03.004.
32. Soares CJ, Rodrigues MP, Faria-E-Silva AL, Santos-Filho PCF, Veríssimo C, Kim HC, et al. How biomechanics can affect the endodontic treated teeth and their restorative procedures?. *Braz Oral Res* [Internet]. 2018 [Citado 14 set 2020]; 32(1): e76. Disponible en: DOI: 10.1590/1807-3107.

33. Toledo L, Ramos I. Fracaso del tratamiento endodóntico en pacientes con enfermedad periodontal. *Medicentro Electrónica* [Internet]. 2018 [Citado 14 set 2020]; 22(3): 268-71. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432018000300010
34. Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Arena C, Caponio VCA, Caloro GA, et al. Inspection of the Microbiota in Endodontic Lesions. *Dent J* [Internet]. 2019 [Citado 14 set 2020]; 7(2): 47. Disponible en: DOI: 10.3390/dj7020047.
35. Ben O, Smaoui S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int* [Internet]. 2019 [Citado 14 set 2020]; 5938210: 1-13. Disponible en: DOI: 10.1155/2019/5938210.
36. Alvarado SL, Herrera-Plasencia P, Enoki-Miñano E, Ruiz-Barrueto M, Millones PA. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Prosopis pallida* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2018 [Citado 14 set 2020]; 70(2). Disponible en: <http://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/287/201>.
37. Pedraza KI. Medicación intraconducto frente al *Enterococcus faecalis*. *Revista odontologica Basadrina*. [Internet]. 2019 [Citado 14 set 2020]; 3(2). Disponible en: DOI: 10.33326/26644649.2019.3.2.893.
38. Borzini L, Condò R, De Dominicis P, Casaglia A, Cerroni L. Root Canal Irrigation: Chemical Agents and Plant Extracts Against *Enterococcus faecalis*. *Open Dent J* [Internet]. 2016 [Citado 17 set 2020]; 10(1): 692–703. Disponible en: DOI: 10.2174/1874210601610010692.
39. Bohora AA, Kokate SR. Concept of probiotics in endodontics. *Int Curr Adv Res* [Internet]. 2016 [Citado 17 set 2020]; 4(7): 1137-42. Disponible en: DOI:10.21474/IJAR01.
40. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* [Internet]. 2019 [Citado 14 set 2020]; 10(1): 49-66. Disponible en: DOI: 10.1093/advances/nmy063.
41. Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *J Pediatr* [Internet]. 2015 [Citado 14 set 2020]; 91(1): 6-21. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jpeds.2014.08.005.

42. Orellana-Centeno JE, Morales-Castillo V. Los probióticos y su relación en la odontología preventiva. *Avan C Salud Med* [Internet]. 2019 [Citado 20 oct 2020]; 6(4): 116-21. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/342453506_Los_probioticos_y_su_relacion_en_la_odontologia_preventiva.
43. Ramos-Perfecto D, Berrocal-Medrano C, Cuentas-Robles A, Castro-Luna A. Probióticos como posible apoyo en el tratamiento de la periodontitis crónica. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral* [Internet]. 2018 [citado 20 oct 2020]; 11(2): 112-5. Disponible en: DOI: 10.4067/S0719-01072018000200112.
44. Campaniello D, Bevilacqua A, Sinigaglia M, Altieri C. Screening of *Propionibacterium* spp. for potential probiotic properties. *Anaerobe* [Internet]. 2015 [Citado 14 set 2020]; 34: 169-73. Disponible en: DOI: 10.1016/j.anaerobe.2015.06.003.
45. Eskesen D, Jespersen L, Michelsen B, Whorwell PJ, Müller-Lissner S, Morberg CM. Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12®, on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial. *Br J Nutr* [Internet]. 2015 [Citado 14 set 2020]; 114(10): 1638-46. Disponible en: DOI: 10.1017 / S0007114515003347.
46. Kaboré WAD, Dembélé R, Bagré TS, Konaté A, Boisramé S, Chevalier V, et al. Characterization and Antimicrobial Susceptibility of *Lactococcus lactis* Isolated from Endodontic Infections in Ouagadougou, Burkina Faso. *J Dent* [Internet]. 2018 [Citado 14 set 2020]; 6(4): 69. Disponible en: DOI: 10.3390/dj6040069.
47. Ma D, Jiang Y, Ahmed S, Qin W, Liu Y. Antilisterial and physical properties of polysaccharide-collagen films embedded with cell-free supernatant of *Lactococcus lactis*. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019 [Citado 14 set 2020]; 145(1): 1031-8. Disponible en: 10.1016/j.ijbiomac.2019.09.195.
48. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* [Internet]. 2016 [Citado 17 set 2020]; 6(2): 71-9. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
49. Bayot ML, Bragg BN. Antimicrobial Susceptibility Testing. *StatPearls* [Internet]. 2020 [Citado 17 set 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539714/>.

50. Artiles VA, Otero IJ, Barrios IO. Metodología de la investigación para las ciencias de la Salud. La Habana: Ciencias médicas; 2008.
51. International Organization for Standardization. ISO 11133 [Internet]. Ginebra: ISO; 2014 [Citado 12 Nov 2020]. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/53610.html>
52. García-Hernández Y, Pérez-Sánchez T, García-Curbelo Y, Sosa-Cossio D, Nicoli JR. Capacidad de crecimiento, actividad antimicrobiana y susceptibilidad a antimicrobianos de dos cepas de *Pediococcus pentosaceus*, candidatas a probiótico. CITMA, [Internet]. 2017 [Citado 12 Nov 2020]; 51(4): 433-442. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2079-34802017000400433&lng=es&tlng=es.
53. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th Edición. CLSI. [Citado 12 Nov 2020]. 2018;1-296. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/free-resources/access-our-free-resources/>
54. Gajdács M, Spengler G, Urbán E. Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology?. Antibióticos [Internet]. 2017 [Citado 22 oct 2020]; 6(25). Disponible en: DOI: 10.3390/antibiotics6040025.
55. Schumacher A, Vranken T, Malhotra A, Arts JJC, Habibovic P. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2018 [Citado 22 oct 2020]; 37: 187-208. Disponible en: DOI: 10.1007/s10096-017-3089-2.
56. Dawson G. Interpretación fácil de la bioestadística. La conexión entre la evidencia y las decisiones médicas. Vol. 1a ed. Elsevier; 2015.
57. Manual de Procedimientos Bioseguridad en Laboratorios de Ensayo, Biomédicos y Clínicos [Internet]. Perú: Ministerio de Salud Instituto Nacional de Salud; 2005 [citado 22 oct 2020]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1669.pdf>
58. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio [Internet]. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 2005 [citado 22 oct 2020]. Disponible en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf

59. Bolocan AS, Upadrasta A, Almeida PHA, Clooney AG, Draper LA, Ross RP, et al. Evaluation of Phage Therapy in the Context of *Enterococcus faecalis* and Its Associated Diseases. *Viruses* [Internet]. 2019 [Citado 21 set 2020]; 11(4): 366. Disponible en: DOI: 10.3390/v11040366.
60. Chalas R, Janczarek M, Bachanek T, Mazur E, Cieszko-Buk M, Szymanska J. Characteristics of oral probiotics – a review. *Curr Issues Pharm Med Sci* [Internet]. 2016 [Citado 21 set 2020]; 29(1): 8-10. Disponible en: DOI: 10.1515/cipms-2016-0002.
61. Hempel S, Newberry S, Ruelaz A, Wang Z, Miles JNV, Suttorp MJ, Et al. Safety of Probiotics to Reduce Risk and Prevent or Treat Disease. Evidence Report/Technology Assessment No. 200. (Prepared by the Southern California Evidence-based Practice Center under Contract No. 290-2007-10062-I.) AHRQ Publication No. 11-E007. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality [Internet]. 2011 [Citado 20 Jun 2021]; Disponible en: www.ahrq.gov/clinic/tp/probiotictp.htm.
62. Day RL, Harper AJ, Woods RM, Davies OG, Heaney LM. Probiotics: current landscape and future horizons. *Future Sci OA* [Internet]. 2019 [Citado 20 Jun 2021]; 3;5(4):FSO391. Disponible en: doi: 10.4155/fsoa-2019-0004.
63. Tomás MS, Claudia Otero M, Ocaña V, Elena Nader-Macías M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2004 [Citado 20 Jun 2021]; 268:337-346. Disponible en: doi: 10.1385/1-59259-766-1:337.
64. Mishra C, Lambert J. Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pac J Clin Nutr* [Internet]. 1996 [Citado 20 Jun 2021]; 5(1):20-4. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24394460/>

ANEXOS

ANEXO 1

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador	Escala
Cepas probióticas	Microorganismos vivos que pueden influenciar positivamente al huésped cuando se administran en dosis adecuadas. ⁵⁹	Bacterias probióticas de los géneros <i>Lactococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Lactobacillus</i> , a dos concentraciones estandarizadas medidas espectrofotométricamente	Cepa de <i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 11454 Cepa <i>B. animalis</i> ssp. <i>animalis</i> ATCC 25527 Cepa de <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 Cepa de <i>L. casei</i> ATCC 393	1,5 x 10 ⁸ UFC/mL 1,5 x 10 ⁹ UFC/mL	De Razón
Efecto contra <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Bacteria cocoide grama positiva, anaerobia facultativa, patógena capaz de sobrevivir en diversos entornos y causar infecciones graves. ⁶⁰	Afectación o no del desarrollo de una cepa de <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 al ser enfrentada a dos concentraciones de cuatro cepas probióticas in vitro y observado por la formación o ausencia de un halo de inhibición que se expresará en milímetros de diámetro.	Sin efecto Efecto Bacteriostático Efecto bactericida	Halos de Inhibición 0 mm = Sin efecto < 12 mm = Efecto bacteriostático ≥ 14 mm = Efecto bactericida	De Razón

ANEXO 2

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ensayos	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)								
	CEPAS PROBIÓTICAS								CONTROL
	Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3		Cepa 4		Control +*
Concentración	C1**	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	2%
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

*Gluconato de clorhexidina

** Concentración 1

ANEXO 3

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA

En la investigación no se aplica el cálculo del tamaño de la muestra sino la determinación del número de unidades de ensayo (replicados). Para ello se aplicará la siguiente fórmula estadística que se usa en estudios experimentales para determinar el número de observaciones, duplicados y repeticiones:

$$n = \frac{W - W^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{W^2}$$

Dónde:

n: Número mínimo de réplicas que deben hacerse en el estudio.

Z α : Valor correspondiente al nivel de confianza asignado.

Z β : Valor correspondiente al valor estadístico.

W: Eficiencia mínima esperada o diferencia mínima observable.

$$n = \frac{W - W^2 \cdot Z_{\beta} + 1,4 \cdot Z_{\alpha}^2}{W^2}$$
$$n = \frac{0,8 - (0,8)^2 \cdot (0,842) + 1,4 (1,96)^2}{(0,8)^2}$$
$$n = \frac{0,8 - (0,64) \cdot (0,842) + 1,4 (3,842)}{0,64}$$
$$n = 8$$

Reemplazando los valores en la fórmula se obtiene que el número de repeticiones necesarias son 8.

ANEXO 4

TABLAS, FIGURAS Y FOTOS

Resumen de procesamiento de casos						
Concentración de probiótico	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
L. acidophilus 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. acidophilus 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. casei 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. casei 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. lactis 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
L. lactis 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
B. animalis 1	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
B. animalis 2	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
Clorhexidina 2%	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%

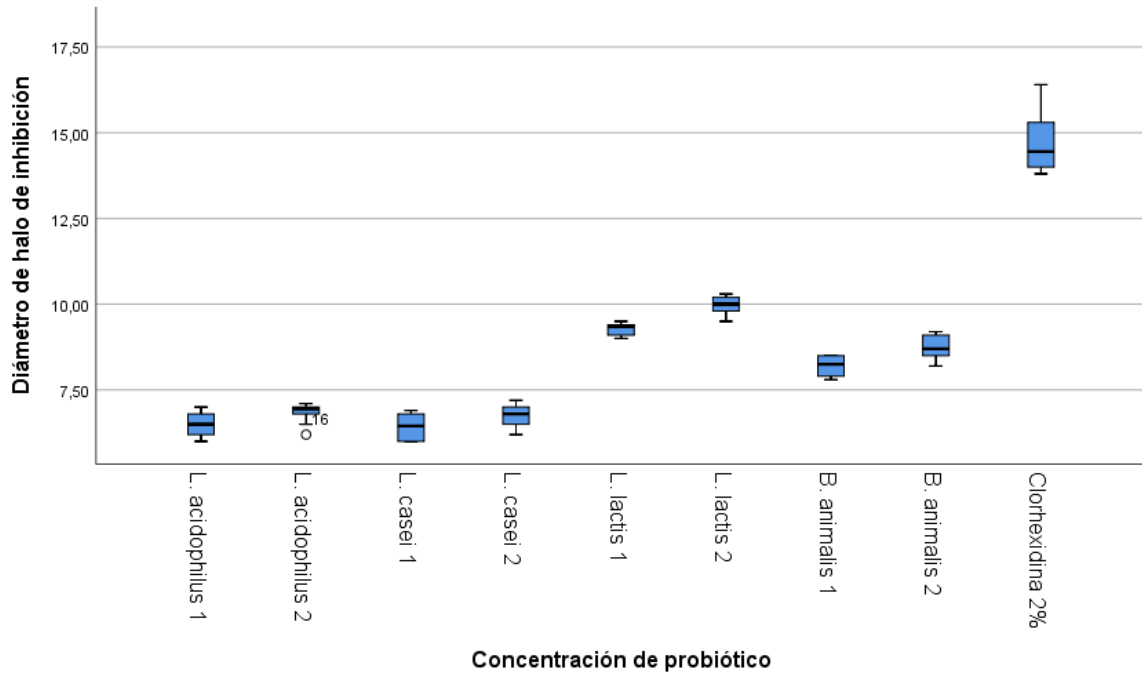
Descriptivos				
Concentración de probiótico			Estadístico	Error estándar
L. acidophilus 1	Media		6,5000	,11255
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,2454	
		Límite superior	6,7546	
	Media recortada al 5%		6,5000	
	Mediana		6,5000	
	Varianza		,127	
	Desviación estándar		,35590	
	Mínimo		6,00	
	Máximo		7,00	
	Rango		1,00	
	Rango intercuartil		,67	
	Asimetría		-,166	,687
	Curtosis		-1,197	1,334
L. acidophilus 2	Media		6,8400	,08844
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,6399	
		Límite superior	7,0401	
	Media recortada al 5%		6,8611	
	Mediana		6,9500	
	Varianza		,078	
	Desviación estándar		,27968	
	Mínimo		6,20	
	Máximo		7,10	
	Rango		,90	
	Rango intercuartil		,28	
	Asimetría		-1,696	,687
	Curtosis		2,379	1,334
L. casei 1	Media		6,4400	,11851
		Límite inferior	6,1719	

	95% de intervalo de confianza para la media	Límite superior	6,7081	
	Media recortada al 5%		6,4389	
	Mediana		6,4500	
	Varianza		,140	
	Desviación estándar		,37476	
	Mínimo		6,00	
	Máximo		6,90	
	Rango		,90	
	Rango intercuartil		,83	
	Asimetría		-,027	,687
	Curtosis		-1,831	1,334
L. casei 2	Media		6,7600	,10022
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	6,5333	
		Límite superior	6,9867	
	Media recortada al 5%		6,7667	
	Mediana		6,8000	
	Varianza		,100	
	Desviación estándar		,31693	
	Mínimo		6,20	
	Máximo		7,20	
	Rango		1,00	
	Rango intercuartil		,55	
	Asimetría		-,431	,687
	Curtosis		-,569	1,334
L. lactis 1	Media		9,3000	,05578
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	9,1738	
		Límite superior	9,4262	
	Media recortada al 5%		9,3056	
	Mediana		9,3500	
	Varianza		,031	
	Desviación estándar		,17638	
	Mínimo		9,00	
	Máximo		9,50	
	Rango		,50	
	Rango intercuartil		,33	
	Asimetría		-,607	,687
	Curtosis		-1,002	1,334
L. lactis 2	Media		9,9500	,08596
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	9,7555	
		Límite superior	10,1445	
	Media recortada al 5%		9,9556	
	Mediana		10,0000	
	Varianza		,074	
	Desviación estándar		,27183	
	Mínimo		9,50	
	Máximo		10,30	
	Rango		,80	
	Rango intercuartil		,45	
	Asimetría		-,415	,687
	Curtosis		-1,107	1,334

B. animalis 1	Media		8,2100	,08622
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,0150	
		Límite superior	8,4050	
	Media recortada al 5%		8,2167	
	Mediana		8,2500	
	Varianza		,074	
	Desviación estándar		,27264	
	Mínimo		7,80	
	Máximo		8,50	
	Rango		,70	
	Rango intercuartil		,60	
	Asimetría		-,336	,687
Curtosis		-1,596	1,334	
B. animalis 2	Media		8,7600	,10349
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	8,5259	
		Límite superior	8,9941	
	Media recortada al 5%		8,7667	
	Mediana		8,7000	
	Varianza		,107	
	Desviación estándar		,32728	
	Mínimo		8,20	
	Máximo		9,20	
	Rango		1,00	
	Rango intercuartil		,63	
	Asimetría		-,007	,687
Curtosis		-,613	1,334	
Clorhexidina 2%	Media		14,7500	,29297
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	14,0872	
		Límite superior	15,4128	
	Media recortada al 5%		14,7111	
	Mediana		14,4500	
	Varianza		,858	
	Desviación estándar		,92646	
	Mínimo		13,80	
	Máximo		16,40	
	Rango		2,60	
	Rango intercuartil		1,50	
	Asimetría		,756	,687
Curtosis		-,792	1,334	

Pruebas de normalidad							
	Concentración de probiótico	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro de halo de inhibición	L. acidophilus 1	,120	10	,200 [*]	,940	10	,554
	L. acidophilus 2	,285	10	,021	,778	10	,008
	L. casei 1	,180	10	,200 [*]	,871	10	,103
	L. casei 2	,150	10	,200 [*]	,969	10	,877
	L. lactis 1	,215	10	,200 [*]	,889	10	,167
	L. lactis 2	,209	10	,200 [*]	,931	10	,460
	B. animalis 1	,172	10	,200 [*]	,883	10	,140
	B. animalis 2	,173	10	,200 [*]	,926	10	,411
	Clorhexidina 2%	,206	10	,200 [*]	,884	10	,143

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.



Descriptivos								
Diámetro de halo de inhibición								
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
L. acidophilus 1	10	6,5000	,35590	,11255	6,2454	6,7546	6,00	7,00
L. acidophilus 2	10	6,8400	,27968	,08844	6,6399	7,0401	6,20	7,10
L. casei 1	10	6,4400	,37476	,11851	6,1719	6,7081	6,00	6,90
L. casei 2	10	6,7600	,31693	,10022	6,5333	6,9867	6,20	7,20
L. lactis 1	10	9,3000	,17638	,05578	9,1738	9,4262	9,00	9,50
L. lactis 2	10	9,9500	,27183	,08596	9,7555	10,1445	9,50	10,30
B. animalis 1	10	8,2100	,27264	,08622	8,0150	8,4050	7,80	8,50
B. animalis 2	10	8,7600	,32728	,10349	8,5259	8,9941	8,20	9,20
Clorhexidina 2%	10	14,7500	,92646	,29297	14,0872	15,4128	13,80	16,40
Total	90	8,6122	2,53740	,26747	8,0808	9,1437	6,00	16,40

Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Diámetro de halo de inhibición	Se basa en la media	8,117	8	81	,000
	Se basa en la mediana	4,373	8	81	,000
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,373	8	24,103	,002
	Se basa en la media recortada	7,569	8	81	,000

ANOVA					
Diámetro de halo de inhibición					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	558,702	8	69,838	395,170	,000
Dentro de grupos	14,315	81	,177		
Total	573,017	89			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición							
	(I) Concentración de probiótico	(J) Concentración de probiótico	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	L. acidophilus 1	L. acidophilus 2	-,34000	,18800	,677	-,9392	,2592
		L. casei 1	,06000	,18800	1,000	-,5392	,6592
		L. casei 2	-,26000	,18800	,901	-,8592	,3392
		L. lactis 1	-2,80000*	,18800	,000	-3,3992	-2,2008
		L. lactis 2	-3,45000*	,18800	,000	-4,0492	-2,8508
		B. animalis 1	-1,71000*	,18800	,000	-2,3092	-1,1108
		B. animalis 2	-2,26000*	,18800	,000	-2,8592	-1,6608
		Clorhexidina 2%	-8,25000*	,18800	,000	-8,8492	-7,6508
	L. acidophilus 2	L. acidophilus 1	,34000	,18800	,677	-,2592	,9392
		L. casei 1	,40000	,18800	,462	-,1992	,9992
		L. casei 2	,08000	,18800	1,000	-,5192	,6792
		L. lactis 1	-2,46000*	,18800	,000	-3,0592	-1,8608
		L. lactis 2	-3,11000*	,18800	,000	-3,7092	-2,5108
		B. animalis 1	-1,37000*	,18800	,000	-1,9692	-,7708
		B. animalis 2	-1,92000*	,18800	,000	-2,5192	-1,3208
		Clorhexidina 2%	-7,91000*	,18800	,000	-8,5092	-7,3108
	L. casei 1	L. acidophilus 1	-,06000	,18800	1,000	-,6592	,5392
		L. acidophilus 2	-,40000	,18800	,462	-,9992	,1992
		L. casei 2	-,32000	,18800	,743	-,9192	,2792
		L. lactis 1	-2,86000*	,18800	,000	-3,4592	-2,2608
		L. lactis 2	-3,51000*	,18800	,000	-4,1092	-2,9108
		B. animalis 1	-1,77000*	,18800	,000	-2,3692	-1,1708
		B. animalis 2	-2,32000*	,18800	,000	-2,9192	-1,7208
		Clorhexidina 2%	-8,31000*	,18800	,000	-8,9092	-7,7108
	L. casei 2	L. acidophilus 1	,26000	,18800	,901	-,3392	,8592
		L. acidophilus 2	-,08000	,18800	1,000	-,6792	,5192
		L. casei 1	,32000	,18800	,743	-,2792	,9192
		L. lactis 1	-2,54000*	,18800	,000	-3,1392	-1,9408
		L. lactis 2	-3,19000*	,18800	,000	-3,7892	-2,5908
		B. animalis 1	-1,45000*	,18800	,000	-2,0492	-,8508
		B. animalis 2	-2,00000*	,18800	,000	-2,5992	-1,4008
		Clorhexidina 2%	-7,99000*	,18800	,000	-8,5892	-7,3908
	L. lactis 1	L. acidophilus 1	2,80000*	,18800	,000	2,2008	3,3992
		L. acidophilus 2	2,46000*	,18800	,000	1,8608	3,0592
		L. casei 1	2,86000*	,18800	,000	2,2608	3,4592
		L. casei 2	2,54000*	,18800	,000	1,9408	3,1392
		L. lactis 2	-,65000*	,18800	,023	-1,2492	-,0508
		B. animalis 1	1,09000*	,18800	,000	,4908	1,6892
		B. animalis 2	,54000	,18800	,111	-,0592	1,1392
		Clorhexidina 2%	-5,45000*	,18800	,000	-6,0492	-4,8508
	L. lactis 2	L. acidophilus 1	3,45000*	,18800	,000	2,8508	4,0492
		L. acidophilus 2	3,11000*	,18800	,000	2,5108	3,7092
		L. casei 1	3,51000*	,18800	,000	2,9108	4,1092
		L. casei 2	3,19000*	,18800	,000	2,5908	3,7892
		L. lactis 1	,65000*	,18800	,023	,0508	1,2492
		B. animalis 1	1,74000*	,18800	,000	1,1408	2,3392
		B. animalis 2	1,19000*	,18800	,000	,5908	1,7892
		Clorhexidina 2%	-4,80000*	,18800	,000	-5,3992	-4,2008
	B. animalis 1	L. acidophilus 1	1,71000*	,18800	,000	1,1108	2,3092
		L. acidophilus 2	1,37000*	,18800	,000	,7708	1,9692
		L. casei 1	1,77000*	,18800	,000	1,1708	2,3692
		L. casei 2	1,45000*	,18800	,000	,8508	2,0492
L. lactis 1		-1,09000*	,18800	,000	-1,6892	-,4908	
L. lactis 2		-1,74000*	,18800	,000	-2,3392	-1,1408	
B. animalis 2		-,55000	,18800	,098	-1,1492	,0492	

		Clorhexidina 2%	-6,54000*	,18800	,000	-7,1392	-5,9408
B. animalis 2		L. acidophilus 1	2,26000*	,18800	,000	1,6608	2,8592
		L. acidophilus 2	1,92000*	,18800	,000	1,3208	2,5192
		L. casei 1	2,32000*	,18800	,000	1,7208	2,9192
		L. casei 2	2,00000*	,18800	,000	1,4008	2,5992
		L. lactis 1	-,54000	,18800	,111	-1,1392	-,0592
		L. lactis 2	-1,19000*	,18800	,000	-1,7892	-,5908
		B. animalis 1	,55000	,18800	,098	-,0492	1,1492
		Clorhexidina 2%	-5,99000*	,18800	,000	-6,5892	-5,3908
Clorhexidina 2%		L. acidophilus 1	8,25000*	,18800	,000	7,6508	8,8492
		L. acidophilus 2	7,91000*	,18800	,000	7,3108	8,5092
		L. casei 1	8,31000*	,18800	,000	7,7108	8,9092
		L. casei 2	7,99000*	,18800	,000	7,3908	8,5892
		L. lactis 1	5,45000*	,18800	,000	4,8508	6,0492
		L. lactis 2	4,80000*	,18800	,000	4,2008	5,3992
		B. animalis 1	6,54000*	,18800	,000	5,9408	7,1392
		B. animalis 2	5,99000*	,18800	,000	5,3908	6,5892

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

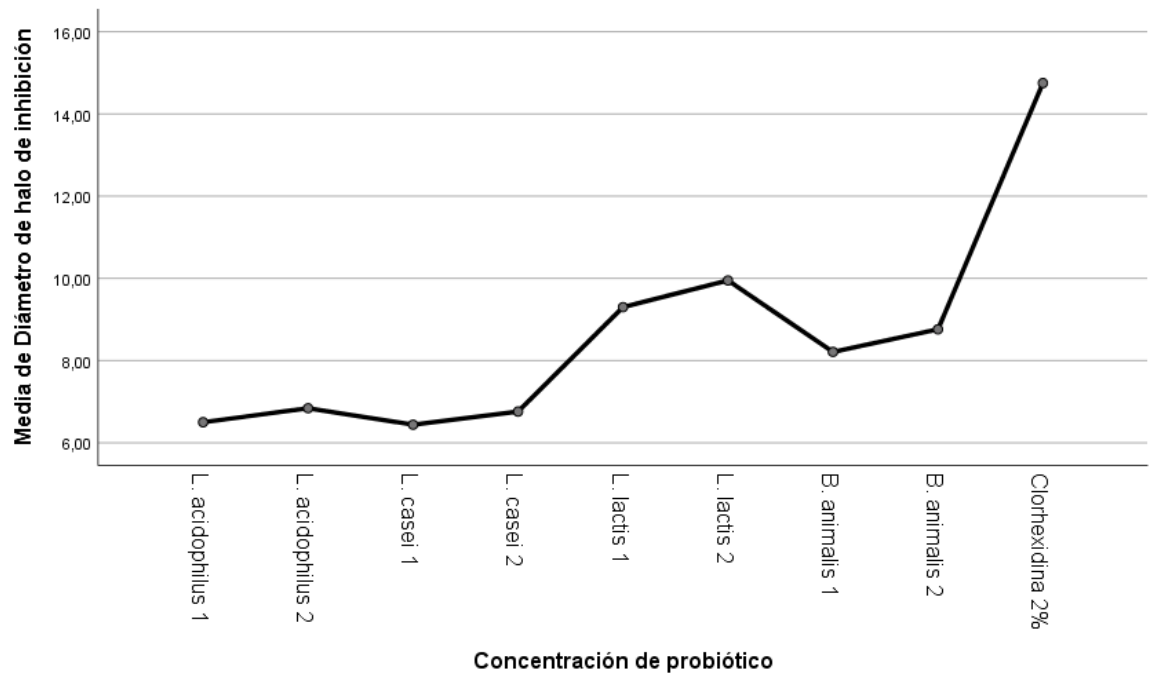
Subconjuntos homogéneos

Diámetro de halo de inhibición								
	Concentración de probiótico	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
			1	2	3	4	5	6
HSD Tukey ^a	L. casei 1	10	6,4400					
	L. acidophilus 1	10	6,5000					
	L. casei 2	10	6,7600					
	L. acidophilus 2	10	6,8400					
	B. animalis 1	10		8,2100				
	B. animalis 2	10		8,7600	8,7600			
	L. lactis 1	10			9,3000			
	L. lactis 2	10				9,9500		
	Clorhexidina 2%	10					14,7500	
	Sig.			,462	,098	,111	1,000	1,000
Duncan ^a	L. casei 1	10	6,4400					
	L. acidophilus 1	10	6,5000					
	L. casei 2	10	6,7600					
	L. acidophilus 2	10	6,8400					
	B. animalis 1	10		8,2100				
	B. animalis 2	10			8,7600			
	L. lactis 1	10				9,3000		
	L. lactis 2	10					9,9500	
	Clorhexidina 2%	10						14,7500
	Sig.			,054	1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

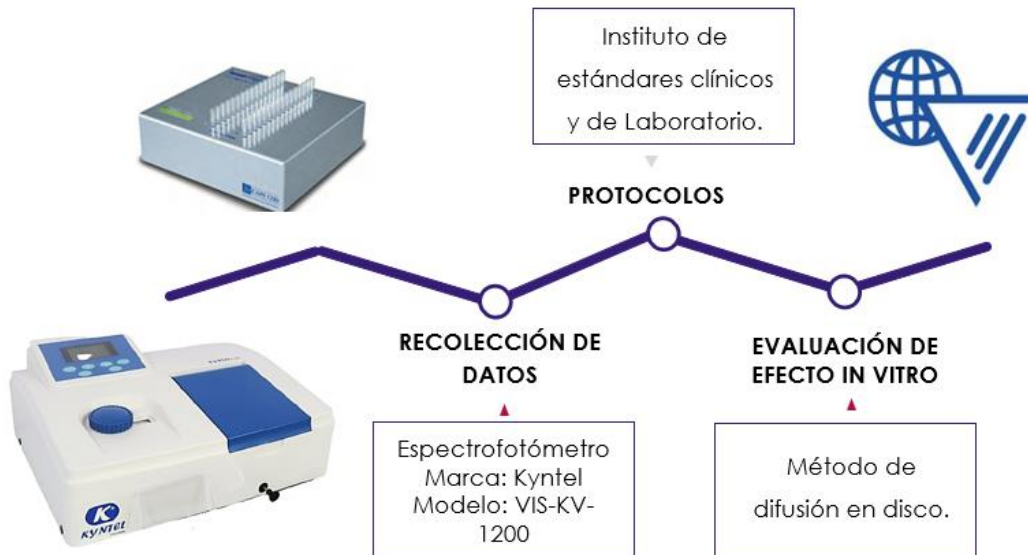
Gráficos de medias



ANEXO 5

GALERÍA FOTOGRÁFICA

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:



PROCEDIMIENTOS:



PROCEDIMIENTOS:

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA REACTIVACIÓN DE CEPAS

Cepas Probióticas → Caldo nutritivo
 E. faecalis → Caldo Nutritivo



MERCK



International Organization for Standardization



PREPARACIÓN DEL INÓCULO MICROBIANO

Concentraciones estándar
 CP: $1,5 \times 10^8$ y $1,5 \times 10^9$ UFC/mL
 E. faecalis: de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL
 Densidad óptica y la longitud de onda
 E. faecalis: 0,381 y 530 nm
 CP: 0,296 y 600 nm



PROCEDIMIENTOS:

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD DE *E.* *faecalis*

Se cultivará en agar sangre a 37°C durante 24–48h en anaerobiosis y se empleará el método de difusión en disco, para estimar el efecto inhibitorio.

