

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS



DETERMINACIÓN DE PERFILES DE RESISTENCIA A  
ANTIBIÓTICOS Y SUSCEPTIBILIDAD A REUTERINA DE *Klebsiella*  
*pneumoniae* MULTIRRESISTENTE AISLADA DE HOSPITALES

POR

DIANA LAURA ABOITES QUIRIARTE

TESIS

LICENCIATURA EN QUÍMICA

CD. JUÁREZ, CHIH.

NOVIEMBRE 2019

DETERMINACIÓN DE PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y  
SUSCEPTIBILIDAD A REUTERINA DE *Klebsiella pneumoniae*  
MULTIRRESISTENTE AISLADA DE HOSPITALES

POR

DIANA LAURA ABOITES QUIRIARTE

TESIS

---

DRA. YURIDIA ORTIZ RIVERA  
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

---

DRA. GWENDOLYNE PERAZA MERCADO  
COORDINADORA DEL PROGRAMA

---

DR. JOSÉ ALBERTO LÓPEZ DÍAZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO

---

C.D. SALVADOR DAVID NAVA MARTÍNEZ  
DIRECTOR DEL INSTITUTO

FECHA: 22 DE NOVIEMBRE DE 2019

## DEDICATORIA

*A mis Padres:*

*el Sr. Juan Aboites Morales y la Sra. Guadalupe Quiarte Martínez por todo el amor y gratitud que siento por ellos. Por el apoyo y amor incondicional que me han brindado; es un orgullo y un honor ser su hija.*

*También dedico este trabajo a quien le sirva como base para futuras investigaciones, en especial en dar nuevas opciones antimicrobianas que permitan combatir este importante patógeno, en beneficio de la salud del hombre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada quiero darle las Gracias a Dios, por todas sus bendiciones, por ser tan bueno conmigo y siempre mostrarme su fidelidad, por sus perfectos planes, por siempre escuchar los deseos de mi corazón y concederlos, por guiarme y colocarme en el lugar correcto.

También quiero darle las gracias a mis padres, por que es para ellos y por ellos que he logrado llegar hasta aquí, por que han sido mi ejemplo de perseverancia y esfuerzo. Les agradezco todo lo que hacen por mí, por su amor, apoyo, tiempo, dedicación, atención, paciencia, sustento, por las desveladas y las levantadas temprano sin importar las diversas condiciones; por todas las herramientas que me han brindado para yo construir la persona en la que me estoy convirtiendo, no tengo como pagarles. Muchas gracias por ser tan excelentes padres, por todo y por tanto, los Amo.

Estoy sumamente agradecida con mi directora de investigación, la Dra. Yuridia Ortiz Rivera, lo cual es un orgullo y un privilegio para mí la oportunidad que tuve de trabajar con ella y agradezco mucho el haberme aceptado sin conocerme, sin yo haber sido su alumna de clases y haberse arriesgado conmigo. Le doy gracias a Dios y a la vida por habernos colocado en el camino, ahora la doctora es una persona muy importante en mi vida, que admiro, le tengo un enorme cariño y gratitud, se que es una persona que nunca voy a olvidar. Agradezco mucho todo el aprendizaje que de ella adquirí, sus consejos, sugerencias, correcciones, su apoyo, regaños, amistad, cariño y la confianza. También le agradezco mucho su ayuda durante el proceso del trámite de mi verano de investigación, por el tiempo que se tomó para corregir e instruirme. Le agradezco mucho la motivación que me da para seguir en este camino de la investigación y el que me haya brindado la oportunidad de realizar la síntesis de la reuterina en la Cd. de Cuauhtémoc, en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), donde ella obtuvo su grado de doctorado. Algo que agradezco, valoro mucho y es significativo para mí, es que me haya abierto las puertas de su casa y de su familia, durante nuestra estancia en el CIAD. Agradezco mucho a sus papás por su hospitalidad, sus atenciones y por ser tan extraordinarias personas, las cuales agradezco mucho

haber compartido con ellos en este viaje llamado vida, espero no sea la única vez.

Agradezco a la Maestra Ileana Escamilla por proveerme las cepas para la realización de este estudio.

Agradezco al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo CIAD por recibirnos, prestarnos las instalaciones, material, reactivos y el equipo para la síntesis de nuestro antimicrobiano.

Les Agradezco mucho a mis compañeros que juntos somos hermanos trillizos de tesis: a Samuel Romero y Fabiola Flores por toda su ayuda, su apoyo, por las veces que me salvaron la campana con el material y con todo con lo que les fue posible. A Samuel por ayudarme en la recolección de cepas, más durante el tiempo que me fui al verano de investigación, por haberse encargado de ir a recoger cepas y preservar mis muestras. A Eduardo Suárez “el recién nacido” por estar siempre ahí cuando lo necesité, agradezco su tiempo, esfuerzo, inteligencia y dedicación para ayudarme en todo cuando no me fue posible.

Agradezco a mis maestras formadoras de mi tesis la Dra. Carmen Alejandra Mendez, la Dra. Ana Luisa Serrano y la Dra. Dulce María Arzate, por su tiempo, paciencia, correcciones, por el conocimiento brindado y por atender a todas las molestias que les causé. Así mismo, quiero darles las gracias a todos los doctores que me permitieron trabajar en sus laboratorios y hacer uso de su material y sus equipos para incubar o leer mis muestras al Dr. Juan José Ramírez, el Dr. Jonatan Torres, el Dr. Ángel Díaz, la Dra. Mariana Grigoruta y a las Doctoras del Laboratorio de Biología Molecular y Bacteriología V-321 Marisela Aguirre y Roxana Malpica.

Así mismo, aprovecho este medio para hacer mención de todas las personas que me apoyaron y motivaron a llegar hasta aquí, por ejemplo, a mis maestros, que más que maestros se convirtieron en personas muy importantes en mi vida por que no solo fueron ejemplo de admiración y excelencia, sino que, son personas que dejaron huella en mi y me los llevo en el corazón. El mayor de mis agradecimientos a mi maestra Katya Carrasco, tantas cosas que decir y que agradecerle, creo que estraré en deuda siempre, no se me olvida todo lo que hizo

por mí, nunca me negó nada al contrario siempre confió en mí y siempre me abrió paso a todas las oportunidades que se me presentaron, creo que soy muy afortunada porque no solo conocí a la maestra si no a la gran persona que es y muchas veces tomó el papel de amiga y de madre para aconsejarme y guiarme. Del mismo modo, a mi hermosa maestra Patricia Ramírez, por acompañarme a lo largo de mi carrera y por el hermoso detalle de tomarse el tiempo para asistir a mi presentación final de tesis, por siempre motivarme a seguir y cuando mis dramas no me lo permitían, también, por todo su cariño, amistad y consejos, fue mi mayor apoyo. Por otro lado, también extendiendo mis más sinceros agradecimientos al maestro Baltazar Corral, al cual le tengo un enorme cariño y gratitud, al igual, ha sido uno de los maestros que son parte de mi formación, de mis logros y mis caídas desde principio a fin de mi carrera, fue un honor y un placer para mí trabajar con él y espero haber sido útil en lo que pude. Al M.C. Jesús Ángel Araujo, mi maestro “Excelencia”, porque siempre digo que fue él quien sin saber dictó mi camino en esta hermosa área de la microbiología, (espero que estas palabras puedan llegar a ser vistas por el) donde descubrí que mi tema favorito era la resistencia a antibióticos y que en definitivo esto es lo que amo y a lo que me quiero dedicar. Yo le pedía a Dios un tema de investigación relacionado a microorganismos y cual fue mi sorpresa que Dios siempre nos escucha y fue tan específico que me colocó con la Dra. Yuridia, mas afortunada no puedo ser.

Con el mismo cariño y agradecimiento a los doctores como parte de mis admiraciones: Naun Lobo Galo, Jonatan Torres Pérez y José Alberto Nuñez Gastelum.

A mis mejores amigos, compañeros y futuros colegas, de la que considero la mejor etapa de mi vida que ha sido la universidad: Abril Estrada Valtierra, Omar Borrego Martínez, Ruby A. Sarabia Sánchez, Alejandra Salcido Bustillos, Cynthia A. Zarazúa Vallejo y Lorna Lopéz.

Muchas Gracias Abril porque nunca voy a olvidar y a dejar de agradecerte que cuando más necesité de un amigo, la compañía de alguien, quien estuvo ahí para rescatarme y hacerme sentir bien fuiste tú. Fuiste mi mejor amiga, mi compañera,

cómplice en exámenes, materias, en la vida personal, viajes, cumpleaños, en nuestro servicio social y en todo, de quien he aprendido bastantes cosas, sabes que te quiero mucho amiga. Del mismo modo a Omar que ha sido mi mejor amigo de la uni, con quien he compartido la mayoría de las clases, los traslados a la universidad y a nuestras casas, vivimos muchas experiencias bonitas, divertidas, estresantes y de más, siempre juntos desde primer semestre en clases, servicio social, prácticas, tesis y próximamente graduación, has sido muy buen amigo y estoy muy orgullosa de tu crecimiento académico y profesional y siempre te reconoceré tu fortaleza y valentía para tomar retos, para no irte por lo fácil sino por lo que realmente te gusta. Mi agradecimiento a mi Rubycita hermosa, por ser una excelente amiga, confiedente y compañera desde el inicio de nuestra carrera, poco a poco fuimos construyendo y fortaleciendo nuestra amistad siempre tocando puertas y saliendo adelante juntas, te quiero mucho y te agradezco todo tu apoyo, tu escucha y tus consejos, mereces lo mejor. A mi Alita de porcelana, Alejandra, por ser una maravillosa amiga, hermosa mujer por dentro y por fuera, siempre motivándome, siendo mi porra, regañándome, haciendome confiar y creer en mí, te agradezco mucho tu apoyo, confidencialidad, amistad y cariño, te agradezco a ti y a la vida que seas mi amiga, eres un verdadero amor y te adoro. Así mismo, a Lorna que ha sido un ser humano hermoso, del cual siempre he recibido cariño, amistad y motivación cuando pensaba que yo ya no podía más, fuiste mi sostén para continuar, muchas gracias, te quiero mucho. Por último y no menos importante a una extraordinaria amiga QFB quien me ha demostrado lo valiosa que es su amistad y quien de manera incondicional, sin pedirle nada siempre esta presente en todos los momentos difíciles y de celebridad muchas gracias Cynthia tu amistad es bastante valiosa e importante en mi vida.

## RESUMEN

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública mundial y el desarrollo de nuevas alternativas antimicrobianas es un proceso que puede tardar años de investigación. En el ámbito hospitalario hay pocas opciones de control y tratamiento contra las infecciones bacterianas. *Klebsiella pneumoniae* es un patógeno oportunista y multirresistente, debido al uso indiscriminado de antibióticos y a sus múltiples mecanismos de resistencia, es responsable de infecciones nosocomiales de difícil tratamiento e incluso puede causar la muerte. Por otro lado, se ha generado un interés significativo por la utilización de probióticos, ya que estos han demostrado tener características benéficas en la salud del huésped y una gran capacidad antimicrobiana. Por ello, se propone en este proyecto, la utilización de *Lactobacillus reuteri* que es un importante probiótico, que tiene la capacidad de producir diversos antimicrobianos como lo son las bacteriocinas y la reuterina un aldehído que ha demostrado su efectividad como antimicrobiano. Sin embargo, la reuterina se ha empleado como conservador de alimentos y no existe evidencia del uso de esta sustancia en cepas de origen nosocomial. Por ello, esta investigación se centró en evaluar la efectividad de esta sustancia como antimicrobiano contra *Klebsiella pneumoniae*. Para esto, se llevó a cabo la recolección de cepas aisladas de hospitales, se les realizó antibiogramas para evaluar la sensibilidad y la resistencia a los múltiples antibióticos de los cuales algunas cepas presentaron resistencia a tetraciclina, trombamicina, ampicilina con sulbactam, piperaciclina con tazobactam, piperaciclina sin combinación, ciproflaxacina, trimetoprima con sulfametoxazol, gentamicina y levofloxacin. Así mismo, se realizó la síntesis y la cuantificación de la reuterina y la prueba de susceptibilidad a reuterina de *Klebsiella pneumoniae*, por concentración mínima inhibitoria donde esta sustancia antimicrobiana no resultó eficaz en una concentración máxima probada de 44.7 mM, para inhibir a *Klebsiella pneumoniae*, debido probablemente a que este patógeno presenta cápsula la cual le confiere protección y resistencia a los antimicrobianos.

## ABSTRACT

The development of the new antimicrobial alternatives is a process that can take years of research. In a hospital setting there are a few controlled processes and some treatment options against bacterial infections. *Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic and multi-resistant pathogen, due to the indiscriminate use of antibiotics and its multiple resistance mechanisms, it is responsible for nosocomial infections that are difficult to treat and can even cause death. On the other hand, a significant interest in the use of probiotics has been generated, since these have been shown to have beneficial characteristics in the health of the host and a great antimicrobial capacity. Therefore, it is proposed in this project, that the use of *Lactobacillus reuteri* which is an important probiotic, which has the ability to produce various antimicrobials such as bacteriocins and reuterine, an aldehyde that has proven its effectiveness as an antimicrobial. However, reuterine has been used as a food preservative and there is no evidence of the use of this substance in nosocomial strains. Therefore, this research is focused on evaluating the effectiveness of this substance as an antimicrobial against *Klebsiella pneumoniae*. For this, the collection of isolated strains from hospitals was carried out, antibiograms were performed to assess the sensitivity and resistance to multiple antibiotics of which some strains showed resistance to tetracycline, thrombamycin, ampicillin with sulbactam, piperaciline with tazobactam, piperaciline without combination, ciproflaxacin, trimethoprim with sulfamethoxazole, gentamicin and levofloxacin. As well as the synthesis and quantification of reuterine and the susceptibility test to *Klebsiella pneumoniae* reuterine, by minimum inhibitory concentration where this antimicrobial substance was not effective at a maximum tested concentration of 40 mM, to inhibit *Klebsiella pneumoniae*, probably because this pathogen has a capsule which gives it protection and resistance to antimicrobials.

## CONTENIDO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>RESUMEN .....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>  | <b>IX</b>   |
| Índice de Figuras .....   | XII         |
| Índice de Cuadros.....  | XIII        |
| <b>INTRODUCCIÓN .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>1. Antecedentes.....</b>   | <b>2</b>    |
| 1.1. Generalidades de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                    | 2           |
| 1.1.1 Patogenia.....  | 4           |
| 1.1.2 Resistencia a antibióticos.....   | 6           |
| 1.1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente.....                                    | 10          |
| 1.1.4 Epidemiología .....   | 14          |
| 1.2 <i>Lactobacillus reuteri</i> como opción de control del crecimiento microbiano<br>..... | 19          |
| 1.2.1 Generalidades de reuterina.....   | 22          |
| 1.2.2 Reuterina como antimicrobiano .....   | 23          |
| 1.3 Hipótesis .....   | 25          |
| 1.4 Objetivos .....   | 25          |
| 1.4.1 Objetivo General .....  | 25          |
| 1.4.2 Objetivos específicos .....   | 25          |
| <b>2. Materiales y métodos .....</b>  | <b>26</b>   |
| 2.1 Antibiogramas .....   | 26          |
| 2.2 Síntesis de reuterina .....   | 26          |
| 2.3 Cuantificación de reuterina.....  | 28          |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.4 Prueba de susceptibilidad de <i>K. pneumoniae</i> a reuterina .....                                 | 28        |
| <b>3. Resultados y discusión .....</b>  | <b>30</b> |
| 3.1 Determinación de la sensibilidad y resistencia a antibióticos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..... | 30        |
| 3.2 Cuantificación de reuterina.....  | 32        |
| 3.3 Determinación de la susceptibilidad de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a reuterina .....               | 35        |
| 3.4 Conclusiones.....   | 41        |
| 3.5 Recomendaciones .....   | 42        |
| 3.6 Difusión .....  | 43        |
| <b>LITERATURA CITADA.....</b>   | <b>44</b> |

### Índice de Figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Curva de calibración de acroleína ( $C_3H_4O$ ) utilizada para calcular la concentración de reuterina ( $C_3H_6O_2$ ).....                    | 32 |
| <b>Figura 2.</b> Prueba de la susceptibilidad a reuterina de <i>K. pneumoniae</i> en microplaca de 96 pozos, comparada con <i>pseudomonas aeruginosa</i> ..... | 35 |

## Índice de Cuadros

|  |    |
|--|----|
| <b>Cuadro I.</b> Antibiogramas de las cepas aisladas.....  | 30 |
| <b>Cuadro II.</b> Lecturas de la prueba de susceptibilidad con reuterina a una<br>concentración máxima de 44.7 mM..... | 36 |

## INTRODUCCIÓN

En el ambiente existen gran variedad de bacterias, algunas de ellas resistentes a los antibióticos como *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), la cual es una bacteria Gram Negativa, multirresistente debido al uso indiscriminado de antibióticos y a los múltiples mecanismos de resistencia que tiene al producir enzimas que le permiten bloquear el efecto antimicrobiano, así como la transferencia del material genético. Además, es una bacteria encapsulada que la protege de fagocitosis y de los factores bactericidas del hospedero. En conjunto todas estas características generan la capacidad de adaptación a diferentes ambientes como lo son los hospitales. Debido a que la resistencia a antibióticos es un problema de salud pública mundial y en el ámbito hospitalario hay pocas opciones de control y tratamiento, aunado a que el desarrollo de fármacos es un proceso que puede llegar a tardar años de investigación, es indispensable desarrollar nuevas alternativas antimicrobianas, para evitar y controlar infecciones de origen nosocomial (Quintana, 2019). Por otro lado, se ha generado un interés significativo por la utilización de probióticos ya que estos han demostrado tener características benéficas y una gran capacidad antimicrobiana. *Lactobacillus reuteri* es un importante probiótico el cual tiene la capacidad de producir diversos antimicrobianos de carácter peptídico como lo son las bacteriocinas y la reuterina que es una sustancia aldehídica, de bajo peso molecular, que ha demostrado su efectividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos, siendo más eficaz en bacterias Gram negativas que en Gram positivas (Martín, 2017). La mayoría de los estudios publicados se enfocan en la efectividad de la reuterina como conservador en alimentos, sin embargo, no existe evidencia del empleo de la reuterina en cepas de origen hospitalario; por lo que esta investigación resulta pertinente para generar información evaluando la efectividad de la reuterina como antimicrobiano contra *Klebsiella pneumoniae* en beneficio del sector salud.

## 1. Antecedentes

### 1.1. Generalidades de *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* es un bacilo Gram negativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, mide de 2-3 por 0.4-0.6 micras, es anaerobia y anaerobia facultativa, es inmóvil puesto que no posee flagelos, no forma esporas, posee antígenos somáticos O, antígenos flagelares H y antígenos capsulares, generalmente formados por polisacáridos. El género fue llamado así en honor a Edwin Klebs, un microbiólogo alemán de finales del siglo XIX; también fue descrito por Karl Friedländer y durante muchos años se conoció como el bacilo de Friedländer (Arredondo & Villacaña, 2007; Carrillo *et al.*, 2013; Cubero, 2016).

*Pneumoniae* es la principal especie del género *Klebsiella* muy expandida en la naturaleza, normalmente se aísla de materia fecal, tanto de humanos como de animales, pero también de vegetales, alimentos y agua. Además, es una bacteria que en su estructura morfológica presenta cápsula. Dicha cápsula esta compuesta por polisacáridos, ácidos complejos, con subunidades de cuatro a seis azúcares y ácido urónico. Además, la cápsula es responsable de que sea un microorganismo altamente patógeno, puesto que le provee virulencia. Actualmente, se conocen 78 tipos serológicos de los cuales dos de ellos K1 y K2 son los mas virulentos (López & Echeverri, 2010; Valdiviezo, 2019). Además, le otorga gran capacidad de resistir a la desecación en el medio, a sobrevivir en la piel, por lo tanto a permanecer en las manos como vehículo fundamental de transmisión debido a que su cápsula es hidrófila. Así mismo, la cápsula la protege de la fagocitosis por macrófagos, polimorfonucleares y de los diferentes factores bactericidas que proporciona el hospedero lo cual hace a *K. pneumoniae* un microorganismo altamente adaptado al ambiente hospitalario. Es una bacteria ampliamente diseminada en el medio ambiente, lo cual facilita su transmisión entre personas, ciudades y países. No obstante, cabe mencionar que *K. pneumoniae* tiene estructuras especializadas que le permiten adherirse a las

células del hospedero (*pilis*) y sideróforos que son quelantes del hierro, los cuales le proporcionan el hierro necesario para su desarrollo (López & Echeverri, 2010). El hierro es un elemento vital para el crecimiento bacteriano, su disponibilidad en el hospedero es muy escaso (López & Echeverri, 2010) de esta manera asegura la obtención de tal nutriente y facilita su permanencia en el tejido afectado (Echeverri Toro & Cataño Correa, 2010).

### 1.1.1 Patogenia

*K. pneumoniae* es un patógeno oportunista, de suma importancia en el ámbito hospitalario, capaz de colonizar diversas partes del cuerpo humano como lo son: la piel, la mucosa, la nasofaringe y el tracto gastrointestinal. Es responsable de infecciones nosocomiales, infecta principalmente a pacientes hospitalizados y, rara vez causa infección en huéspedes sanos (Andrade *et al.*, 2004). La gran mayoría de las infecciones causadas por este microorganismo son adquiridas en el hospital. Sin embargo, se ha reportado que las infecciones causadas por este agente también han sido adquiridas en la comunidad (Namikawa *et al.*, 2019).

Se ha señalado a *K. pneumoniae* como un patógeno causal de infecciones de difícil tratamiento que puede provocar diversos cuadros clínicos en el hombre como: infecciones en el tracto urinario, tracto respiratorio, neumonías, bacteriemias, sepsis, infecciones hepatobiliares, peritonitis, meningitis, infecciones en tejidos blandos, incluso puede causar hasta la muerte. Infecta el área y el material quirúrgico (Algorta & Schelotto, 2006). Se transmite por medio de heces, por contacto con equipo contaminado en los hospitales como catéteres, equipos de transfusión, aditamentos de terapia respiratoria, sondas vesicales, agujas, etc. Los pacientes más susceptibles a contraer una infección bacteriana son los que se encuentran hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (UCI), los neonatos, los inmunocomprometidos ya sea porque portan VIH o porque se les suministra algún fármaco inmunosupresor en el caso de pacientes con trasplantes de órganos, los alcohólicos, los ancianos, pacientes que padecen enfermedades como diabetes mellitus o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) entre otros (OMS, 2018; Bermejo *et al.*, 2006).

La infección sistemática es rápida y muy difícil de controlar (Martínez, 2014). La primera etapa del ciclo infeccioso es la adherencia del patógeno a las células del huésped por medio de proyecciones filamentosas de la superficie bacteriana, denominadas pilis. En *K. pneumoniae* se encuentran dos tipos de pilis

predominantes: el tipo 1 y el tipo 3. El tipo 1 está asociado a la patogénesis del tracto urinario adhiriéndose a células del túbulo proximal y el tipo 3 está asociado con la adherencia a las células endoteliales y los epitelios del tracto urinario y del tracto respiratorio (López & Echeverri, 2010).

La infección del tracto urinario es la más frecuente con un 6 al 17% de todas las infecciones hospitalarias, seguida en importancia por sepsis, neumonía, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas. Casi todos los pacientes con enfermedad pulmonar causada por *Klebsiella* presentan una bronconeumonía o una bronquitis frecuentemente adquirida en el hospital, representando el 7-8 % de las neumonías nosocomiales.

### **1.1.2 Resistencia a antibióticos**

Anteriormente, cuando aún no se contaba con el descubrimiento y la utilización de los antimicrobianos, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias eran la principal causa de muerte en los seres humanos (OMS, 2018). Si bien, la introducción de los antibióticos en la práctica clínica logró que enfermedades bacterianas que antes eran mortales fueran más fáciles de controlar, aumentando la esperanza de vida de los pacientes. Los antibióticos se han considerado una panacea para curar infecciones bacterianas, por ello, se han expandido mundialmente, aunque no de forma equitativa ni correcta, el mal manejo, la dosificación inadecuada especialmente en infecciones que no requieren fármacos antibacterianos (infecciones virales), terapias antibióticas incompletas, el antibiótico contraindicado para la sensibilidad del microorganismo, hasta el uso indiscriminado e irracional de estos fármacos, por ejemplo, en la industria agropecuaria con la finalidad de mejorar la producción creando grandes reservorios de resistencia bacteriana en los animales de granja han contribuido a la pérdida parcial o total de su efectividad. Además, han favorecido la aparición, selección y diseminación de cepas resistentes a dichos fármacos (Álos, 2015; Cavagnaro, 2014; Rosenblatt, 2009).

La resistencia natural es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano, por ejemplo, las bacterias Gram negativas son resistentes a la vancomicina y este caso no es variable. En cambio, la resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie en específico. La resistencia adquirida es la que conlleva al fracaso clínico cuando se cree que se utiliza un antibiótico activo sobre el patógeno que está produciendo la infección. Las bacterias son capaces de crear resistencia en base a su variabilidad genética, estos mecanismos de resistencia los pueden adquirir por mutación o por transferencia horizontal de material genético contenido en plásmidos entre células bacterianas de especies similares o distintas. Los mecanismos de resistencia a antibióticos se clasifican en tres grupos que son: la inactivación enzimática, la modificación en el sitio

blanco y la alteración de la permeabilidad. En la producción de enzimas inactivantes o inactivación enzimática, el principal mecanismo de resistencia a betalactámicos es por hidrólisis. Esto implica la acción de enzimas betalactamasas, las cuales destruyen por hidrólisis a los antibióticos betalactámicos como: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemes (Gómez, García & Hernández, 1982; Vignoli & Seija, 2006). Del mismo modo, pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas como las acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de aminoglucósidos. Otra es la modificación o alteración en el sitio blanco o en el sitio de acción en el cual pueden existir modificaciones en el gen que codifica el propio blanco del antibiótico, y otro es la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales. Y como tercera categoría se encuentra la alteración de la permeabilidad que se puede catalogar en tres tipos como: las alteraciones de las membranas bacterianas y modificaciones en el ingreso, o el eflujo de las drogas. Los cambios de permeabilidad se relacionan con la disminución de porinas, el cual no es un mecanismo que proporcione altos niveles de resistencia (Doleyres *et al.*, 2005).

La resistencia bacteriana es un mecanismo de defensa para los microorganismos, es un fenómeno que ya existía antes de que los antibióticos fueran descubiertos, sin embargo, con su uso y aplicación en el tratamiento de enfermedades infecciosas se ha ido intensificando (Rodríguez *et al.*, 2014). Son las bacterias y no los seres humanos ni los animales, los que se vuelven resistentes (Serra, 2017). Tanto en personas como en animales es muy común que los antibióticos se administren sin supervisión médica (OMS, 2018).

La resistencia a los antimicrobianos constituyen un problema de salud pública mundial, y el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento es un proceso que puede llegar a tardar años (Serra, 2017; Quintana, 2019) debido al elevado costo para desarrollar nuevos fármacos y la dificultad en los criterios de aprobación (Rosenblatt, 2009). Así mismo, la resistencia a los agentes

antimicrobianos va en aumento día con día, es un fenómeno que afecta por igual a países de alto y bajo ingreso, apareciendo y propagando mecanismos de resistencia, haciendo más difícil la capacidad para controlar infecciones. Con ello, la neumonía, tuberculosis, septicemia, gonorrea, sífilis, el trasplante de órganos, quimioterapia, cirugías entre otros, son prácticas que se vuelven más difíciles, de alto riesgo y en ocasiones imposibles de controlar conforme los antibióticos van perdiendo su efectividad (OMS, 2018; Serra, 2017). Actualmente, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las causas más importantes de muerte (Álos, 2015). En el mundo mueren más de 2 millones de personas al año por infecciones intratables gracias a la resistencia (Mendoza, 2011). Al mismo tiempo, muchos países en desarrollo a nivel mundial no cuentan con medicamentos efectivos (OMS, 2018). El alto consumo de antibióticos sobre todo en los hospitales ha generado cepas con mecanismos de resistencia que en ocasiones nos dejan sin alternativas para su tratamiento. Esta resistencia disminuye la posibilidad de que el medicamento sea eficaz (Serra, 2017; Solórzano & Miranda, 1998) haciendo que las infecciones se vuelven persistentes, y se prolongue el tiempo de hospitalización. Esto, obliga a los pacientes a utilizar medicamentos de alto costo, en consecuencia, el riesgo a propagarse entre personas y el riesgo de mortalidad aumentan (OMS, 2018; Serra, 2017).

La resistencia no es un problema de patogénesis si no una limitación para las opciones de control, ya que de cierta forma somos dependientes de los antibióticos. Si además de estos, existieran otros métodos alternativos la resistencia persistiría, pero dejaría de ser un problema de salud pública (OMS, 2018).

En muchos países, como en México y el sur del continente americano, en donde se presenta mayor consumo de antibióticos sin prescripción médica, no se han generado políticas que indaguen la restricción de los antibióticos. Mientras que en países donde sí existen estas restricciones no se han llevado a cabo de la

mejor manera para evitar el consumo excesivo de antibióticos, especialmente en lo que se refiere al crecimiento de animales (Mendoza, 2011).

No es una exageración visualizar que en un futuro cercano la humanidad se aproxima a padecer infecciones bacterianas con la misma gravedad que se tenía antes de que se descubriera el primer antibiótico. Quien posea un buen sistema inmunológico podría tener la posibilidad de sobrevivir, en cambio, de no ser así, difícilmente se podrá sobrevivir a infecciones serias (Mendoza, 2011).

### 1.1.3 *Klebsiella pneumoniae* multirresistente

*K. pneumoniae* es un patógeno de distribución mundial, reconocido como una amenaza urgente para la salud humana como consecuencia de la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos asociados con brotes hospitalarios y de comunidad (Valdiviezo, 2019). La resistencia de *K. pneumoniae* a los antimicrobianos ha evolucionado. Actualmente, el gran problema clínico generado es por su elevada resistencia (Algorta & Schelotto, 2006; Espinal; Mantilla, Saavedra, 2004; López & Echeverri, 2010). La multirresistencia aparece como producto de mecanismos codificados en los cromosomas o en los elementos móviles, pues esta última causa, genera mayor preocupación ya que la diseminación de los elementos móviles promueven la aparición de brotes nosocomiales (Cano *et al.*, 2008). Además *K. pneumoniae* presenta plásmidos relacionados con la expresión de proteínas que sirven para la fijación de este microorganismo a superficies plásticas, como las de catéteres vasculares y sondas vesicales. (Paciel, Seija, Prieto, Vignoli, & Medina, 2011).

*K. pneumoniae* presenta resistencia a las diferentes familias de antibióticos como los son los aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos. Los comunes perfiles de multirresistencia que se presentan en *K. pneumoniae* pueden lograr el fracaso de cualquier tratamiento (Suárez *et al.*, 2015). Se considera que las enzimas betalactamasas son el principal mecanismo de resistencia presente en los bacilos Gram negativos en especial las enterobacterias y en los bacilos no fermentadores. Otros mecanismos importantes que caben resaltar son la producción de la pérdida o modificación de porinas, restándole permeabilidad a la membrana externa bacteriana, la cual le otorga a *K. pneumoniae* una alta resistencia a los antibióticos betalactámicos, por lo que es de suma importancia ya que estos antibióticos son los más prescritos. La aparición de cepas productoras de enzimas betalactamasas que son hidrolasas, promueve la capacidad de inactivar los antibióticos de las familias de los betalactámicos, es decir, penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos (Morejón

García, 2013). Entre los mecanismos de resistencia de *K. pneumoniae* el principal se encuentra en las enzimas betalactamasas, las cuales inhiben por hidrólisis enzimática el anillo betalactámico de los antibióticos betalactámicos ya que actúa inactivando las propiedades de la molécula antes de que puedan llegar a su sitio de acción, es decir, al punto de unión con las proteínas fijadoras de penicilina PBP (Paciel *et al.*, 2011). Su importancia radica en que el anillo betalactámico se encuentra en la estructura de varias familias de antibióticos. Es un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno y se diferencian en base a las cadenas laterales complementarias relacionadas con su actividad antimicrobiana, farmacocinética y toxicidad. El mecanismo de acción de los antibióticos betalactámicos se centra en inhibir la síntesis de la pared bacteriana, es decir, las transpeptidasas denominadas PBP. Interfieren en la última etapa de la síntesis de peptidoglicano. No obstante, también actúan en la activación de la autolisina bacteriana endógena, la cual destruye el peptidoglicano. Así mismo, al inhibir la producción de peptidoglicano, se crea una pared bacteriana débil y el medio donde se encuentra la bacteria es hiperosmótico, lo cual las sustancias del exterior logran entrar a la célula bacteriana, esta se hincha y por lo tanto se lisa, esta es otra forma de actuar de los betalactámicos (Hernández-Torres, 1982).

En la mayoría de los casos *K. pneumoniae* es resistente a la ampicilina debido a la presencia de la enzima betalactamasa SHV-1 y con justa razón puesto que *K. pneumoniae* presenta resistencia de manera natural a las penicilinas (Suárez & Gudiol, 2009). En los años 80 el uso de nuevos antibióticos eficaces contra la resistencia por este tipo de enzima originó la aparición de cepas resistentes a dichos fármacos. Con ello, en Alemania en el año 1983 se reportó por primera vez la resistencia de *K. pneumoniae* a cefalosporinas de tercera generación. Además en el año 1985 en Alemania se reportó la mutación de la enzima SHV-1 produciendo la enzima SHV-2, causante de la resistencia a las cefalosporinas de amplio espectro por lo cual se le denominó BLEE (López & Echeverri, 2010). Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas originadas por bacilos gramnegativos que hidrolizan las cefalosporinas de amplio espectro y los

monobactámicos, pero no las cefamicinas ni los carbapenémicos. Habitualmente son transferidas por plásmidos. La existencia de las BLEE ha obstaculizado la eficiencia del tratamiento de numerosas infecciones bacterianas debido a que cepas de *K. pneumoniae* son responsables de la resistencia a la gran mayoría de los betalactámicos y a antimicrobianos de otras familias (Díaz *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha reportado la aparición de enzimas betalactamasas del tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasas (KPC). Estas enzimas fueron detectadas por primera vez en *K. pneumoniae* y son propias de esta enterobacteria. Se le atribuye a *K. pneumoniae* el grave problema de salud pública generado especialmente por la resistencia a los antibióticos carbapenémicos. Las enzimas carbapenemasas se caracterizan por su capacidad para hidrolizar antibióticos carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam pero son débilmente inhibidas por ácido clavulánico y tazobactam pero presentan una elevada inhibición por ácido fenilborónico (Vera-Leiva *et al.*, 2017). La aparición de estas enzimas, es sumamente alarmante ya que estos antibióticos betalactámicos de elección para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) son reservados y empleados en casos de infecciones graves como último recurso efectivo y disponible para el tratamiento de infecciones donde *K. pneumoniae* es el agente responsable (Valdiviezo, 2019). Lo cual explica que si estos antibióticos son suministrados en casos especiales la posibilidad de controlar estas infecciones se ve limitada (Paciel *et al.*, 2011). La resistencia de *Klebsiella pneumoniae* a los antibióticos carbapenémicos como tratamiento de último recurso se ha ido propagando de tal manera que en muchos países dichos antibióticos no presentan efecto en la mayoría de los pacientes infectados por *K. pneumoniae* (OMS, 2018).

Por otra parte, el primer inhibidor de las enzimas betalactamasas fue el ácido clavulánico su estructura química le permite interactuar con la enzima betalactamasa secretada por bacterias como *K. pneumoniae* que le confiere

resistencia a los antibióticos betalactámicos (Hernández-Torres, 1982). De hechos, se ha reportado que la colistina es un antimicrobiano utilizado para tratar bacterias Gram negativas, resistentes a los medicamentos en especial para los que son capaces de inducir resistencia a carbapenémicos. Sin embargo, es importante destacar que estudios relatan que *K. pneumoniae* soporta el tratamiento con colistina y ácido clavulánico, esto se ha originado por el uso inadecuado e imprudente de dosificaciones subóptimas (Breve, 2014).

Además, de los betalactámicos otro grupo de antibióticos son las quinolonas que son antibióticos sintéticos, su espectro se amplió con la introducción de un átomo de fluor (fluoroquinolonas), su mecanismo de acción es mediante la inhibición de las enzimas topoisomerasa II o ADN girasa así como la topoisomerasa IV indispensables para la síntesis de ADN. Entre las quinolonas se encuentran: norfloxacin, ciprofloxacino, y levofloxacino (Valdiviezo, 2019). Por otro lado, los aminoglucósidos son antimicrobianos frecuentemente empleados y eficaces, por lo general son utilizados en sinergia con betalactámicos, su mecanismo de acción se lleva a cabo en la interacción de la superficie de la membrana y en la unión en la subunidad 30s de los ribosomas impidiendo la síntesis de proteínas, promoviendo la muerte del microorganismo. En este grupo se encuentran antibióticos como amikacina, gentamicina y kanamicina (Valdiviezo, 2019).

#### 1.1.4 Epidemiología

En los países desarrollados se piensa que las principales causas de muerte son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer. Sin embargo, estudios en Europa indican que las enfermedades infecciosas representan la segunda causa de mortalidad. En el mundo 16 de cada 53 millones de personas mueren a causa de enfermedades infecciosas (Suárez *et al.*, 2015). Los agentes infecciosos responsables de la mortalidad del hombre han ido evolucionando al mismo tiempo que las medidas higiénicas y las técnicas médicas han evolucionado (Lasa, Del Pozo, Leiva, & Penadés, 2005). Después de las infecciones respiratorias, las infecciones urinarias son las más frecuentes en el ámbito hospitalario y en la comunidad motiva millones de consultas médicas ambulatorias y hospitalizaciones. Dichas infecciones atribuibles al uso de dispositivos invasivos como los catéteres urinarios y complicaciones como la bacteriemia y la septicemia (Vargas-Alzate, Higueta-Gutiérrez, & Jiménez-Quiceno, 2019). Sin embargo, se ha reportado que los países latinoamericanos son los que presentan mayor problema de resistencia a los antibióticos en comparación con Estados Unidos y Europa (Paciel *et al.*, 2011), lo cual es aceptable ya que en estos países existe mayor control en cuanto al consumo de estos fármacos. Sin embargo, en países latinoamericanos como es el caso de México, los antibióticos están al alcance de todos, en ocasiones estos se encuentran a la venta sin receta y el personal del sector salud recetan antibióticos de una manera inconsciente, del mismo modo, la falta de educación en cuanto a su consumo por parte de la población deja mucho que desear. Por otro lado, la aparición de cepas multirresistentes son cada vez más frecuentes en Latinoamérica y representa un grave problema de salud relacionado a la morbilidad y a los altos costos (De La Vega, Benadof, Veas, & Acuña, 2017).

Entre el 3 y 7% de todas las infecciones bacterianas nosocomiales son causadas por *K. pneumoniae*, situación que la ubica como uno de los ocho patógenos

hospitalarios más importantes. El Grupo de Estudio de la Resistencia Microbiana de Medellín reportó que de 14 hospitales de esta ciudad durante los años 2007-2008 hacen responsable a *K. pneumoniae* como el tercer microorganismo frecuentemente aislado con un 8 % del total de microorganismos cultivados en los hospitales. Así mismo, el grupo de estudio de resistencia de Bogotá (GREBO) en 14 hospitales de tercer nivel de esa ciudad entre los años 2001 y 2003 señalaron que *K. pneumoniae* ocupó el cuarto lugar en prevalencia con un porcentaje del 5,7%, como causante de infección nosocomial (Suárez *et al.*, 2015). Además, se reveló que *K. pneumoniae* es el agente etiológico del 8% causal de todas las infecciones bacterianas adquiridas en los hospitales en los EE. UU y Europa (López & Echeverri, 2010). No obstante, se han detectado cepas de *K. pneumoniae* denominada hipervirulenta en el este y sureste de Asia desde hace dos décadas. Este tipo de cepas se detectaron por primera vez en el año 1980, en un paciente taiwanés que adquirió la infección por este agente patógeno en la comunidad, si bien, las infecciones por *K. pneumoniae* hipervirulentas aparecieron en Asia y se extendieron a otras zonas geográficas hasta actualmente considerarse como un grave problema clínico mundial con un incremento en incidencia. De hecho se reportó que estas cepas hipervirulentas son una amenaza incluso para jóvenes sanos con el peligro de adquirir la infección en la comunidad (Namikawa *et al.*, 2019).

La facilidad con la que *K. pneumoniae* se dismina en el ambiente hospitalario y su alta estabilidad en los plásmidos que contienen genes que codifican para  $\beta$ -lactamasas ha generado un acúmulo de múltiples resistencias en una misma cepa y así serios brotes epidémicos (Martínez, 2014). Algunos brotes o epidemias nosocomiales han estado asociados con cepas de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación, debido a la producción de betalactamasas de espectro expandido (BLEE) (Barreto, Zambrano, & Araque, 2009). De hecho en el año 1983, se informó por primera vez la aparición de betalactamasas mediadas por plásmidos capaces de inactivar cefalosporinas de espectro extendido. El hecho de que los antibióticos carbapenémicos sean las drogas de elección para infecciones graves por agentes responsables de producir BLEE crea una mayor dependencia para el uso de carbapenémicos en la práctica clínica (Arnold *et al.*, 2011).

Además de las BLEE, *K. pneumoniae* es la principal especie productora de otro tipo de enzima denominada KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa), lo cual, genera una mayor preocupación por que es capaz de hidrolizar e inactivar los únicos antibióticos efectivos para las infecciones por bacterias productoras de BLEE. Peor aún, la enzima KPC se ha ido diseminando y se ha encontrado en otras bacterias de la familia enterobacteriaceae como *E. coli*, *S. aureus*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Proteus* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Raoultella ornithinolytica*, *Morganella morganii*, *Pantoea* spp., *Providencia* spp. y *S. marcescens*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y *Flavobacterium odoratum* (Vera-Leiva *et al.*, 2017). Las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productora de KPC son un problema mundial que se ha ido agravando desde su primera detección hace más de una década (Arnold *et al.*, 2011). En el año 1996, en Carolina del Norte se reportó el primer primer aislado de *K. pneumoniae* productora de KPC, desde esa fecha hasta la actualidad ya se ha expandido por el mundo y se han identificado y reportado aislados productores de KPC en Europa, Asia, Medio Oriente, América Central y del Sur, Brasil, Uruguay, Ecuador y Argentina, África y Oceanía. En ese año cuando se hallaron cepas resistentes a los carbapenemes se clasificó como “super bacteria” o multirresistente (Arnold *et al.*, 2011; Córdova *et al.*, 2012; Vera-Leiva *et al.*, 2017). No obstante, Colombia es un país que ha sido reportado a nivel mundial como endémico de *K. pneumoniae* productora de KPC (Bustos-Moya *et al.*, 2016). En el año 1994, en Japón se detectó otra enzima carbapenemasa la cual se denominó metalobetalactamasa también capaz de hidrolizar antibióticos carbapenémicos, sin embargo, son menos comunes que las enzimas KPC (Arnold *et al.*, 2011).

Antes de presentarse los primeros brotes hospitalarios de *K. pneumoniae* en Nueva York, la resistencia a los carbapenémicos era una nueva incidencia en los Estados Unidos, estos brotes causaron una gran preocupación ya que estos agentes patógenos presentaban resistencia a todos los betalactámicos y en hospitales de Brooklyn durante el 2003 y 2004 la mitad de estas bacterias presentaban susceptibilidad a los aminoglucósidos y a las fluoroquinolonas. Después de los primeros brotes en Nueva York las bacterias productoras de KPC fueron endémicas en muchos hospitales de esta ciudad y de Nueva Jersey, 10 años mas tarde ya se habían detectado cepas productoras de KPC en todo

Estados Unidos y en el mundo. El primer aislamiento que se detectó en Francia fue en el 2005 en un paciente que había estado previamente hospitalizado en un Hospital en New York (Arnold *et al.*, 2011). Así mismo, se ha encontrado que tanto en Israel como en EE.UU. una alta tasa de mortalidad ha sido atribuida a las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productora de KPC, con un 38 a un 57% y en Grecia un 22,2 % (Paciel *et al.*, 2011). En el año 2014, la OMS informó que las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos ya se había diseminado a nivel mundial y que el principal mecanismo de resistencia a estos antibióticos es la enzima KPC (Vera-Leiva *et al.*, 2017).

En México existen reportes que demuestran que *K. pneumoniae* es uno de los principales agentes causantes de infecciones intrahospitalarias con niveles significativos de morbilidad y mortalidad (Andrade *et al.*, 2004; Suárez & Gudiol, 2009). En México en el 2001 se describió a *K. pneumoniae* como una bacteria productora de enzimas betalactamasas de espectro extendido (BLEE) como un importante agente patógeno en pediatría, así mismo, se identificaron aislamientos provenientes de un brote en 1996 como productores de BLEE tipo SHV-5. En abril del año 2014, la OMS publicó su primer informe mundial con datos de 114 países sobre la resistencia a antimicrobianos, en el caso de las Américas señaló la resistencia de *K. pneumoniae* a las cefalosporinas, en el caso de México se señalaron las cuatro causas más frecuentes de infección nosocomial: de vías urinarias, de herida quirúrgica, neumonías y bacteriemias; según una guía de práctica clínica (GPC), los Gram negativos como *K. pneumoniae* se encuentra en la flora más prevalente en infección nosocomial de vías urinarias relacionada a la sonda vesical. En ese mismo año se dieron a conocer bacteriemias causadas por *K. pneumoniae* productora de BLEE causando infección en neonatología (Rodríguez noriega *et al.*, 2014). En México entre el 2004 y 2008 la problemática ocasionada por bacterias productoras de BLEE se abordó en varios hospitales mexicanos en los cuales existió evidencia de bacteriemias e infecciones urinarias, así mismo se reportó la propagación de un clon de *K. pneumoniae* productora de SHV-5 (Rodríguez *et al.*, 2014). En el Hospital General Regional 1 del Instituto Mexicano del Seguro Social de

Chihuahua, Chihuahua, México, en el año 2013, se detectó un total de 1042 infecciones nosocomiales, principalmente relacionadas con: líneas vasculares (25 %), de sitio quirúrgico (24 %), neumonía (14 %) y de vías urinarias (12 %), causadas por diferentes patógenos del cual *K. pneumoniae* ocupa el (5.1 %) de las infecciones nosocomiales, así mismo, durante el año 2014, se reportó que de 13527 egresos hospitalarios, 1079 presentaron Infecciones nosocomiales (8 por 100 egresos) identificadas de líneas vasculares, quirúrgicas, neumonía y de vías urinarias de las cuales se observó que *K. pneumoniae* es una de las 7 principales bacterias multirresistentes mostrando resistencia a 34 antibióticos (Holguín *et al.*, 2005). La mayor problemática se encuentra asentada a nivel intrahospitalario donde las cepas pasan de paciente en paciente y las enzimas de microorganismo en microorganismo, lamentablemente en los últimos años no se han desarrollado nuevas drogas antimicrobianas para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos lo que ha limitado fuertemente las posibilidades terapéuticas (Paciel *et al.*, 2011). Es por ello que debido a la múltiple resistencia y a la falta de antimicrobianos que proporcionen una solución efectiva para la intervención de las infecciones es necesario desarrollar nuevas opciones de control como la utilización de probióticos, tal es el caso de *Lactobacillus reuteri* un probiótico capaz de producir múltiples antimicrobianos, que en diversos estudios se ha demostrado que dichos antimicrobianos tienen un alto potencial para inhibir el crecimiento de agentes patógenos (Ortiz *et al.*, 2017).

## **1.2 *Lactobacillus reuteri* como opción de control del crecimiento microbiano**

En 1965 se definió inicialmente a los probióticos haciendo referencia a sustancias que eran segregadas por microorganismos que favorecían el crecimiento de otros. Actualmente, el término probiótico hace referencia a microorganismos viables, principalmente bacterias, no patógenas, utilizadas como suplemento alimenticio que en dosis apropiadas contribuyen en beneficio de la salud del huésped (Estupiñán, Manzano & Poveda, 2012; Mu *et al.*, 2018; Olveira & González, 2007).

En los últimos años se ha generado un interés significativo por la utilización de probióticos, debido su gran potencial para producir antimicrobianos ya sean bacteriocinas o ácidos que puedan inhibir la proliferación de patógenos (Fierro *et al.*, 2017). Y, en gran medida a la resistencia a antibióticos y a las propiedades saludables sobre su consumo, específicamente en el tratamiento de enfermedades en el tracto gastrointestinal ya que estos han demostrado tener características benéficas, lo que ha promovido en gran medida su uso, como una terapia prometedora y segura en diferentes casos clínicos (Estupiñán, Manzano & Poveda, 2012; Mu *et al.*, 2018; Olveira & González, 2007). Los probióticos previenen los problemas de salud, enriquecen la microflora con bacterias que actúan de manera positiva, es decir, a favor de la vida del huésped (Fernández, 2005).

En 1980, el *Lactobacillus reuteri* (*Lb. reuteri*) se identificó y se le asignó el nombre de reuteri en honor a su descubridor, Gerhardt Reuter (León *et al.*, 2015). El *Lb. reuteri* es una bacteria Gram positiva, heterofermentativa, anaerobia facultativa, no forman esporas, y tiene una temperatura óptima de crecimiento de 35-38 °C. Además, cumple con las características de ser un probiótico ya que resiste al pH ácido del estómago, intestinos y a las sales biliares y a diversos entornos de pH, siendo capaz de crecer a un pH entre 5 y 7.5 (Martín, 2017).

*Lb. reuteri* es una cepa probiótica colonizadora de humanos y animales. En humanos es común encontrarlo en diferentes sitios del cuerpo como lo son el tracto gastrointestinal y urinario, en la vagina, vía oral, la piel e incluso en la leche materna (Hernández & Millones, 2016; Mu *et al.*, 2018). Tiene diversos efectos beneficiosos como la prevención y mejora de diferentes trastornos (Mu *et al.*, 2018). Así mismo, propiedades funcionales contra infecciones en el cuerpo humano (Ceylan *et al.*, 2019; Hernández & Millones, 2016). Actúa como probiótico a través de mecanismos como la exclusión y la competencia con patógenos por los nutrientes (Hernandez & Millones, 2016). Incluso tiene la capacidad de adherirse a las paredes del intestino reduciendo la posibilidad de que otros microorganismos se adhieran en la pared intestinal. Es capaz de inhibir microorganismos patógenos, regenerar la microbiota comensal del huésped y fortalecer la barrera intestinal. Además, entre los numerosos beneficios de *Lb. reuteri* se destaca que reduce las infecciones, promueve la salud, mejora la tolerancia de los alimentos, la absorción de nutrientes, minerales y vitaminas, reduce la traslocación bacteriana y actúa en beneficio del sistema inmunológico (Mu *et al.*, 2018).

Por otro lado, cabe destacar que el *Lb. reuteri* es un importante probiótico capaz de producir múltiples antimicrobianos. Su acción probiótica se debe a la capacidad de inhibir con éxito microorganismos patógenos combinando diferentes mecanismos de acción (Martín, 2017; Mu *et al.*, 2018). Presenta efectos de inhibición contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Hernandez & Millones, 2016). *Lb. reuteri* coloniza de forma natural el tracto gastrointestinal, al estar en contacto con el patógeno, actúa produciendo altas cantidades de antimicrobiano con el fin de eliminar al agente oportunista y proteger al hospedero (López, García, López-Malo, & Santiago, 2008). Además, con la síntesis de sus diferentes sustancias antimicrobianas se ha demostrado que el *Lb. reuteri* es eficaz contra la infección causada por *Helicobacter pylori*, principal responsable de úlceras y gastritis (Ceylan *et al.*, 2019). *Lb. reuteri* erradica a este patógeno sin causar los efectos secundarios comunes en comparación con las reacciones que causan los antibióticos. También, se ha demostrado que es efectivo contra una amplia variedad de bacterias como lo es la *E. coli*, *Clostridium* y *Salmonella*. Así mismo, se ha reportado que *Lb. reuteri* actúa contra hongos y virus, por ejemplo, contra neumovirus, circovirus, rotavirus,

virus coxsackie y papilomavirus. De igual manera se ha reportado que *Lb. reuteri* tiene propiedades antifúngicas donde detiene el crecimiento y mata varias especies de *Candida* (Mu *et al.*, 2018).

Puesto que *Lb. reuteri* consigue producir moléculas antimicrobianas como los ácidos orgánicos, ácido láctico, peróxido de hidrógeno, etanol, bacteriocinas, reuteraciclina y la reuterina (Mu *et al.*, 2018; Diaz, 2016) los cuales son antimicrobianos hidrosolubles de amplio espectro efectivos a pH variables y son resistentes a enzimas proteolíticas y lipolíticas (Hernández & Millones, 2016). Además de reuterina y reuteriaciclina, *Lb. reuteri* consigue producir otro antimicrobiano designado como reutericina 6 o gassericina A, la cual es una bacteriocina hidrófoba, pequeña y circular de amplio espectro de acción contra patógenos presentes en los alimentos (Martín, 2017). La reuteriaciclina es un antimicrobiano el cual se caracteriza por ser un ácido tetrámico y ha demostrado su acción en los alimentos, contra bacterias Gram positivas. Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos que tienen propiedades inhibitoras y son sustancias naturales para conservar alimentos más admisibles que los conservadores químicos (Ramírez, 2005). La habilidad de *Lb. reuteri* para sintetizar reuterina es dependiente de la temperatura, el pH, la concentración de oxígeno, la edad celular y la biomasa. *Lb. reuteri* produce cantidades suficientes de reuterina que se ha utilizado en el ámbito de los alimentos donde se ha comprobado su eficiencia como antimicrobiano, con una gran capacidad de inhibición bacteriana es por ello que se propone la reuterina como una opción en el control y tratamiento de bacterias oportunistas y multirresistentes en el ambiente hospitalario.

### 1.2.1 Generalidades de reuterina

Entre los compuestos no proteicos producidos por *Lactobacillus reuteri* se encuentra la reuterina (Milena *et al.*, 2009), o 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) es una sustancia neutra, soluble en agua y de naturaleza aldehídica, con un bajo peso molecular de 74,0817 g/mol, producida por *Lb. reuteri* durante el metabolismo anaeróbico del glicerol (Martín, 2017). La reuterina es una molécula de cadena corta que si no se utiliza como antimicrobiano esta puede ser fácilmente metabolizada (López *et al.*, 2008).

*Lb. reuteri* es el probiótico que produce mayor cantidad de 3-HPA en solución de glicerol (Doleyres, Beck, Vollenweider & Lacroix, 2005), este, metaboliza el glicerol para generar 3-HPA en una reacción mediada por la coenzima B12 (Mu *et al.*, 2018), siendo la glicerol deshidratasa (GDH) la enzima responsable de la producción de 3-HPA, que transforma el glicerol a 3-HPA (Baeza *et al.*, 2011).

Estudios describen la estructura de la reuterina que disuelta en agua se encuentra en equilibrio compuesta en sus tres formas: monomérica, hidratada y dimérica cíclica (Baeza *et al.*, 2011). La reuterina es efectiva en un intervalo de pH de 2 a 8, siendo más estable a pH ácido, mientras que a pH básico en un rango de 11 se degrada rápidamente y de manera irreversible. Otro factor importante que contribuye para la estabilidad de la reuterina es su concentración, cuando la concentración de reuterina está por encima de los 4.9 M se presenta en forma de dímero, en solución acuosa experimenta una dimerización e hidratación reversible formando un equilibrio de 3-HPA, hidrato de HPA y HPA dímero llamado reuterina. Cuando la concentración es baja de 1,4 M prevalece el HPA hidratado, incluso a menores concentraciones de 0,03 M, son las empleadas en la mayoría de las investigaciones en las que la reuterina se utiliza como antimicrobiano. La reuterina de acuerdo con su composición química es resistente a enzimas proteolíticas y lipolíticas (Martín, 2017).

### 1.2.2 Reuterina como antimicrobiano

La reuterina es un potente inhibidor bacteriano, tiene una amplia efectividad y es activa contra numerosos microorganismos patógenos relacionados al deterioro de alimentos (Martín, 2017) y ha demostrado Inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas siendo más eficaz en Gram negativas, incluyendo otros microorganismos como virus, levaduras, mohos y protozoos (Doleyres *et al.*, 2005; Milena & Suárez, 2009; Talarico & Dobrogosz, 1989). Por sus características antimicrobianas la hace atractiva como conservante natural de amplio espectro en la mejora de la calidad y seguridad de los alimentos refrigerados así como agente auxiliar terapéutico (Doleyres *et al.*, 2005). Se cree que la acción antimicrobiana de la reuterina es debida en gran parte a la conversión espontánea de 3-HPA a acroleína que esta última es una sustancia citotóxica (Mu *et al.*, 2018). Su actividad antimicrobiana es extraordinariamente amplia, se describe que la reuterina actúa sobre la síntesis de ADN inhibiendo las enzimas sulfhidrilo implicadas en la actividad ribonucleótido reductasa, donde el dímero de reuterina se sitúa en el lugar de reconocimiento de la ribonucleótido reductasa e inhibe la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa involucrada en la síntesis del DNA, lo cual determina su amplio espectro antimicrobiano (Milena & Suárez, 2009; Talarico & Dobrogosz, 1989). No obstante, se le atribuyó la acción antimicrobiana de la reuterina por su capacidad para reaccionar con los grupos sulfhidrilo de las ribonucleótido reductasa y de las tiorredoxinas. Por último se determinó que la reuterina genera estrés oxidativo en las células modificando el grupo tiol en ensayos *in vitro*. Al añadir un aminoácido con un grupo tiol como lo es la cisteína al medio, se demostró que la reuterina únicamente actúa en alta concentración, mientras que adicionando otros aminoácidos sin grupo tiol como valina o serina el aldehído de reuterina actúa sobre su actividad antimicrobiana desde muy bajas concentraciones (Martín, 2017). Por otro lado, cabe destacar que no hay suficiente evidencia que respalde la utilización de la reuterina como tratamiento terapéutico por ello se pretende

utilizar la reuterina como una opción para el control de infecciones causadas por patógenos multirresistentes como lo es *K. pneumoniae*.

### **1.3 Hipótesis**

La reuterina es un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*

### **1.4 Objetivos**

#### **1.4.1 Objetivo General**

Evaluar la efectividad de reuterina como antimicrobiano contra *Klebsiella pneumoniae*

#### **1.4.2 Objetivos específicos**

- Recolectar cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de hospitales
- Probar resistencia a antibióticos de las cepas aisladas
- Producir y cuantificar reuterina proveniente de *Lactobacillus reuteri*
- Determinar la susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* a reuterina

## 2. Materiales y métodos

### 2.1 Antibiogramas

Se probó la resistencia a antibióticos por medio de antibiogramas y se determinó a cuáles de estos antibióticos las cepas aisladas de *K. pneumoniae* son sensibles y resistentes. Esto consistió en sembrar el microorganismo de interés sobre la superficie de agar contenido en una placa de Petri y sobre este inóculo se colocaron discos de papel secante impregnados con diferentes antibióticos. Posteriormente, se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas. Una vez transcurridas las 24 horas de incubación se observa si los discos aparecen rodeados por una zona ausente de colonias bacterianas, al cual se le denomina halo de inhibición. Esto significa que el microorganismo es sensible al antimicrobiano, de lo contrario cuando no aparece un halo de inhibición el microorganismo es resistente al antimicrobiano (Alarcón *et al.*,2016).

### 2.2 Síntesis de reuterina

La síntesis y cuantificación de reuterina se realizó en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo CIAD A. C. en la unidad de Cuauhtémoc, Chihuahua, México. La metodología que se utilizó para llevar a cabo la síntesis y obtención de reuterina fue de acuerdo a lo reportado por (Ortiz-Rivera *et al.*, 2017).

Para llevar a cabo la síntesis de reuterina fue necesario preparar soluciones como el buffer fosfato de potasio 0.1 M a pH 7 del cual se pesaron 5.44 g y se disolvieron en 400 mL de agua. Así mismo, la solución de glicerol 200 mM donde se tomaron 7.3 mL de glicerol y se aforaron en un matraz de 500 mL.

La reuterina se obtuvo a partir del *Lb. reuteri* en condiciones anaerobias. Se preparó un caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe). Se pesaron 2.55 g del polvo del caldo MRS y se disolvieron en 50 mL de agua. Para disolver se colocó en un vaso de precipitados con un agitador magnético sobre una parrilla eléctrica. Una vez preparado el caldo, se transfirieron 5 mL de caldo en 10 tubos con su respectiva tapadera, sin cerrar totalmente (no se le agregó Tween 80) y se esterizaron en

autoclave. Una vez estéril se dejó enfriar a temperatura ambiente. Después se realizó el pre-cultivo en un tubo con caldo estéril y se inocularon 100  $\mu$ L de la cepa de *Lb. reuteri*, se incubó a 37°C de 15 a 24 horas.

Para la preparación del medio de cultivo se pesaron 25.5 g de polvo del caldo MRS, los cuales se disolvieron en un frasco con 500 mL de agua, sobre una parrilla eléctrica con un agitador magnético y se le agregaron 729  $\mu$ L de glicerol.

Una vez terminado el periodo de incubación y si hubo crecimiento celular en el pre-cultivo de *Lb. reuteri*, este se transfirió al frasco del medio de cultivo al 1%, es decir, 5 mL del pre cultivo en 500 mL de caldo MRS con glicerol y se procedió a incubar entre 37°C a 41°C por 15 a 24 horas. Pasado el tiempo de incubación del cultivo al 1%; se transfirieron 50 mL del cultivo en 10 tubos Falcón de 50 mL. Se procedió a centrifugar todos los tubos con el cultivo a 1500 rpm a 20°C por 10 minutos. Al centrifugarse se formó un sedimento de células de *Lb. reuteri*, y el sobrenadante se desechó. Después se realizaron los lavados de *Lb. reuteri* con 10 mL del buffer de fosfatos 0.1 M a pH de 7 y se desechó el sobrenadante. Así mismo, se pesó un tubo falcón vacío con su respectiva tapadera y sobre ese peso se le agregó 1g del sedimento de *Lb. reuteri*. Se obtuvieron 2 g totales del sedimento de *Lb. reuteri* colocando cada gramo en 2 tubos.

Para la producción de reuterina, a cada tubo Falcón con 1 g de sedimeto, se le agregó 30 mL de glicerol para disolver totalmente y se incubó 2 horas a 37°C-41°C a baño María. Una vez terminado el periodo de incubación se retiraron los tubos de la incubadora y se procedió a centrifugar a 4°C por 20 minutos a 7197 rcf. Una vez separadas las fases se formó una vez más un sedimento de *Lb. reuteri*, el sobrenadante se recuperó y se filtró; este filtrado se consideró como el extracto acuoso de reuterina.

### 2.3 Cuantificación de reuterina

Para la cuantificación de reuterina fue necesario cuantificar por duplicado. Se utilizó un baño de arena a 40°C, se colocó un termómetro, y se colocaron a incubar en el baño de arena, Liebisch, por 50 minutos 5 tubos de ensayo que contenían: 945 µL de HCl concentrado, 150 µL de etanol al 95%, 75 µL de la solución de triptófano, 297 µL de agua y los 33 µL de reuterina. Para la preparación del blanco la única diferencia es que no se le agregó reuterina. Como contenían triptófano y es sensible a la luz se taparon los tubos con papel aluminio con excepción del blanco. Pasado el tiempo de incubación se pasó la mezcla a unas celdillas para leer en el espectrofotómetro a 560 nm.

### 2.4 Prueba de susceptibilidad de *K. pneumoniae* a reuterina

Una vez obtenidas las cepas aisladas de *K. pneumoniae*, se preparó y se esterilizó el medio de cultivo (caldo nutritivo) y con un asa bacteriológica se tomaron colonias bacterianas de *K. pneumoniae* y se sembraron en 5 mL del caldo, se incubó en agitación a 37 °C por 24 horas en condiciones anerobias. Pasado el tiempo de incubación se procedió a medir la densidad óptica del cultivo en un espectrofotómetro, JENWAY 7315 Spectrophotometer, a una longitud de onda de 595nm, el crecimiento bacteriano se dejó proceder hasta obtener una densidad óptica de 0.6 de absorbancia. Así mismo, se realizaron diluciones a diferentes concentraciones de reuterina: 4, 6, 8, 10, 20 y 40 mM y se realizó la prueba de susceptibilidad en una micro placa de 96 pozos con el método de concentración mínima inhibitoria (MIC) por microdilución. Con una micro pipeta se colocaron en varios pozos de la microplaca 150 µL del cultivo de *K. pneumoniae* y a cada pozo con el cultivo bacteriano se le agregó 150 µL de reuterina a diferentes concentraciones, así mismo, para el control positivo en un pozo se colocó 150 µL del cultivo de *K. pneumoniae* y se le añadió 150 µL de agua y se procedió a incubar a 37 °C por 24 horas. se utilizó un control positivo de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* generado con el mismo procedimiento anterior.

No obstante, también se realizó la prueba de susceptibilidad de las cepas de *K. pneumoniae* con reuterina concentrada, se comparó con el control positivo, y a su vez, se le agregó un control negativo de 150  $\mu$ L de agua y 150  $\mu$ L de caldo. Después se procedió a incubar a 37°C por 24 horas. Se analizó la placa en espectrofotómetro.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1 Determinación de la sensibilidad y resistencia a antibióticos de *Klebsiella pneumoniae*

Se determinó la sensibilidad y la resistencia a los diferentes antibióticos por medio de antibiogramas como se muestra en el Cuadro I.

Cuadro I. Antibiogramas de las cepas aisladas

|                       | K1         | K2         | K3         | K4         | K5         |
|-----------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Amp\ sulbactam</b> | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente | Resistente |
| <b>Amicacina</b>      | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| <b>Ciprofloxacina</b> | Sensible   | Sensible   | Resistente | –          | Resistente |
| <b>Cefepima</b>       | Sensible   | Sensible   | –          | –          | –          |
| <b>Cefotetan</b>      | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| <b>Ertapenem</b>      | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| <b>Gentamicina</b>    | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Resistente |
| <b>Imipenem</b>       | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| <b>Levofloxacina</b>  | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Resistente |
| <b>Meropenem</b>      | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| <b>pip\Tazobactam</b> | Resistente | Sensible   | Resistente | Resistente | Sensible   |
| <b>Piperaciclina</b>  | Resistente | Resistente | –          | –          | –          |
| <b>Trimet\Sulfa</b>   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente |
| <b>Tetraciclina</b>   | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente | Resistente |
| <b>Tigeciclina</b>    | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| <b>Trobamicina</b>    | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente | Resistente |

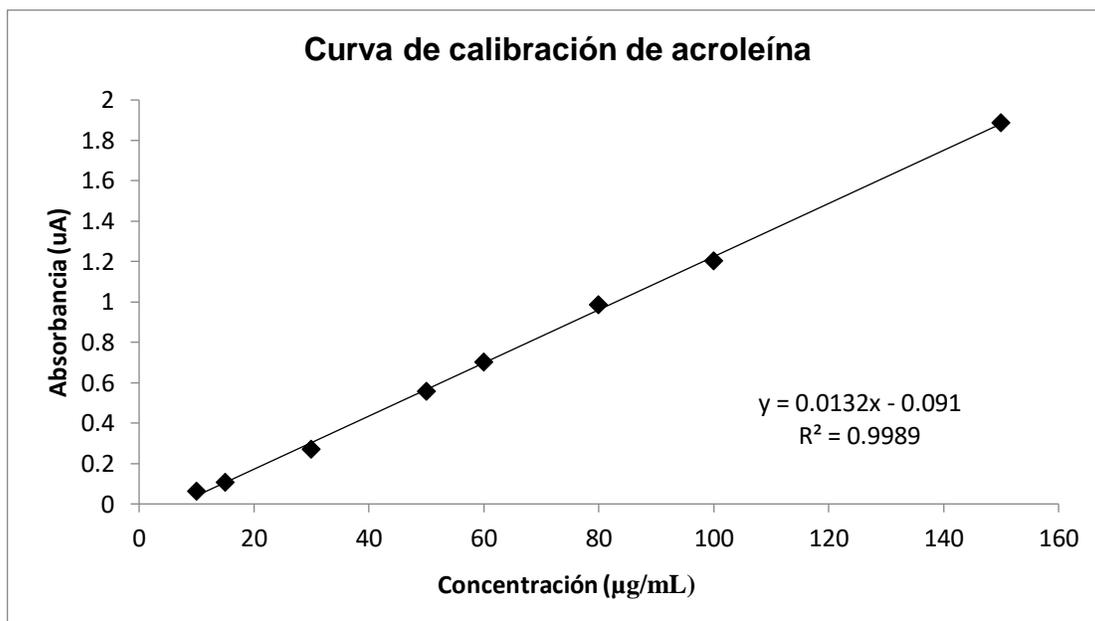
Según los antibiogramas realizados las cepas aisladas presentan resistencia a algunos antibióticos de elección para el tratamiento contra infecciones producidas por *K. pneumoniae*. El 60% de las cepas presentaron resistencia ante antibióticos como: la tetraciclina, trombamicina y las combinaciones de ampicilina con sulbactam y la combinación de piperaciclina con tazobactam. Así mismo, presentaron resistencia a piperaciclina sin combinación. Por otro lado, el 40% es resistente a ciprofloxacina y a la combinación de trimetoprima con sulfametoxazol y el 20% presentó resistencia a gentamicina y levofloxacina.

Generalmente, en el tratamiento contra infecciones generadas por *K. pneumoniae* se emplean antibióticos tales como: carbapenémicos, cefalosporinas de tercera generación, fluoroquinolonas y trimetoprima con sulfametoxazol. Sin embargo, la resistencia a estos fármacos, genera retrasos en la terapia y con ello, un incremento de morbilidad y mortalidad en los pacientes (Valdiviezo, 2019). Los carbapenemes como el imipenem y ertapenem son los antibióticos betalactámicos de más amplio espectro, actividad y resistencia a las enzimas betalactamasas, incluidas BLEE (Hernández-Torres, 1982). En los antibiogramas realizados se muestra que las cepas presentan sensibilidad a ambos antibióticos carbapenemicos, por lo tanto estas cepas no son productoras de enzimas KPC y son efectivos para el control de infecciones causadas en estas cepas de *K. pneumoniae*.

Se ha utilizado cefepima, un antibiótico perteneciente a las cefalosporinas de cuarta generación como elección para bacterias Gram negativas. Las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE pueden ser resistentes pero activas frente a betalactamasas AmpC (Hernández-Torres, 1982). Según un estudio realizado en un brote de neumonía aguda en liebres en la provincia de Hebei, China identificaron a *K. pneumoniae* resistente a imipenem, meropenem, penicilina y vancomicina, pero muy sensible a cefepima, cotrimoxazol y enrofloxacin (Du *et al.*, 2014). La combinación de piperaciclina con un inhibidor de las betalactamasas, tazobactam, es activa contra enterobacterias y anaerobios. Al unirse el tazobactam restablece su actividad contra *Klebsiella*. Además, esta combinación no induce la producción de enzimas betalactamasas (Luster *et al.*, 1982). Se reportó en el hospital pediátrico de Chile que *K. pneumoniae* presenta un 79.4% de susceptibilidad a piperacilina/tazobactam (PIP/TAZO) (De La Vega *et al.*, 2017).

### 3.2 Cuantificación de reuterina

La concentración de reuterina se calculó comparando la absorbancia de las muestras con una curva de calibración construida con acroleína, asumiendo que un mol de reuterina se deshidrató de la misma manera que un mol de acroleína que reaccionó con triptófano en presencia de HCl, como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1.** Curva de calibración de acroleína ( $C_3H_4O$ ) utilizada para calcular la concentración de reuterina ( $C_3H_6O_2$ ).

La determinación de la concentración de reuterina se realizó a partir de la ecuación de la recta con una absorbancia de 2.2 y 2.1 diluida 10 veces obteniendo absorbancias de 22.2 y 21.1

Donde la ecuación de la recta se muestra a continuación:

$$Y = mx + b \qquad \text{Ecuación 1}$$
$$Y = 0.0132x + (-0.091)$$

Se calculó la concentración final despejando X a una absorbancia de 22.2

$$X = \frac{22.2 + 0.091}{0.0132} = 1688.7 \mu\text{g/mL}$$

Se calculó la concentración inicial de reuterina con la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad \text{Ecuación 2}$$

$$C_1 = \frac{(1688.7 \mu\text{g/mL}) (1500 \mu\text{L})}{330 \mu\text{L}} = 7675.95 \mu\text{g/mL}$$

Donde:

$V_1$  = Volumen de reuterina

$V_2$  = Volumen de la celdilla

$C_2$  = Concentración obtenida de la ecuación

Con la concentración que se obtuvo de reuterina, se calculó la concentración como se muestra a continuación:

$$C = (7675.95 \mu\text{g/mL}) (1000\text{mL}) = 7675909.095 \mu\text{g} = 7.67595 \text{ g}$$

Finalmente se determinó la concentración de reuterina en mM con la fórmula de molaridad que se expresa a continuación:

$$M = \frac{m}{pm(V)} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

$m$  = masa (g)

$pm$  = peso molecular (g/mol)

$v$  = volumen (L)

$$M = \frac{7.67595 \text{ g}}{74 \frac{\text{g}}{\text{mol}} (1 \text{ L})} = 0.104 \text{ Molar} \times 1000 = 104 \text{ mM} \quad (1 \text{ Mol} = 1000 \text{ mM})$$

Del mismo modo siguiendo el procedimiento anterior se determinó la concentración de reuterina con una absorbancia de 21.1 de la cual se obtuvo una masa de 7.33161 g y una concentración de 99.075 mM como se muestra a continuación:

$$M \frac{7.33161 \text{ g}}{74 \text{ g/mol}(1 \text{ L})} = 0.099 \text{ Molar (1000)} = 99.075 \text{ mM (1Mol= 1000 mM)}$$

Mediante dos repeticiones se obtuvo la concentración de reuterina; en donde se determinó el promedio entre las dos concentraciones obtenidas anteriormente: 104 mM y 99.095 mM, así mismo, se calculó la desviación estándar.

A continuación, se muestran los cálculos correspondientes:

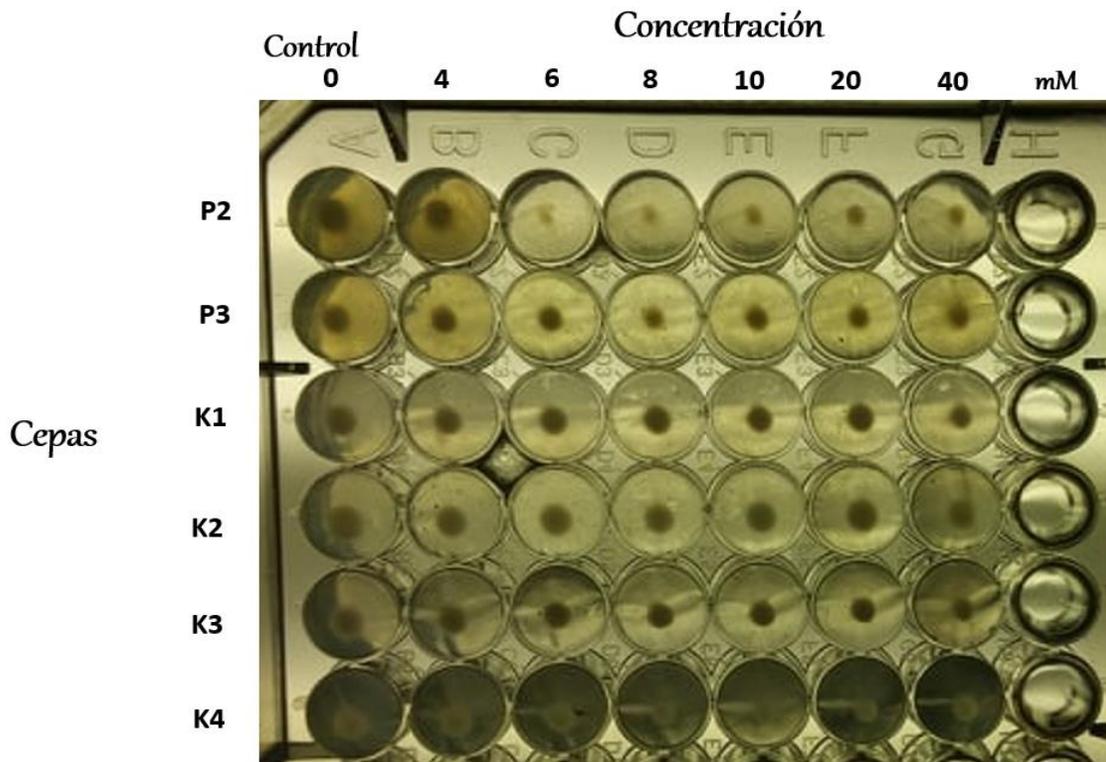
$$\text{Promedio } \frac{104 \text{ mM} + 99.075 \text{ mM}}{2} = 101.5375 \text{ mM} \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Desviación estándar} = 3.48$$

$$\text{Concentración de reuterina} = 101.5375 \text{ mM} \pm 3.48$$

### 3.3 Determinación de la susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* a reuterina

Se probó la susceptibilidad de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes concentraciones de reuterina con el método de concentración mínima inhibitoria (MIC) utilizando como referencia una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* como control positivo.



**Figura 2.** Prueba de la susceptibilidad a reuterina de *K. pneumoniae* en microplaca de 96 pozos, comparada con *pseudomonas aeruginosa*.

De manera experimental se probaron cuatro cepas de *Klebsiella pneumoniae* (K1, K2, K3 y K4), donde se observa que desde una concentración de reuterina de 0 hasta una concentración de 40 mM, el tamaño del sedimento formado es el mismo, no disminuye conforme aumenta la concentración, es decir, no presenta inhibición. Mientras tanto, en las cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa* (P2, P3) el cual es otro patógeno oportunista a nivel nosocomial, se aprecia que a mayor concentración mayor inhibición, determinando que la concentración mínima inhibitoria de *Pseudomonas* se presenta a partir de 4 mM.

Es por ello, que al no observar inhibición en las cepas de *Klebsiella pneumoniae* a una concentración de 40 mM en comparación con las cepas de referencia de *Pseudomonas aeruginosa*, se realizaron las pruebas de MIC con una nueva síntesis de reuterina para corroborar que la reuterina que se había estado utilizando anteriormente no haya perdido su estabilidad y por lo tanto su efectividad. Se realizó la prueba de susceptibilidad con reuterina en su máxima concentración de 44.7 mM. Los valores de las lecturas se muestran a continuación el Cuadro II.

**Cuadro II.** Lecturas de la prueba de susceptibilidad con reuterina a una concentración máxima de 44.7 mM.

|                            | Cepa | Control positivo | Muestra  | Cepa | Control positivo | Muestra | Control Negativo |
|----------------------------|------|------------------|----------|------|------------------|---------|------------------|
|                            | K1   | 0.99             | 0.129    | K5   | 0.076            | 0.111   | 0.01             |
|                            | K1   | 0.146            | 0.096    | K5   | 0.115            | 0.162   | 0.002            |
|                            | K1   |                  | 0.077    | K5   | 0.09             |         | 0.002            |
| <b>Promedio</b>            |      | 0.568            | 0.1006   |      | 0.0936           | 0.1365  | 0.0046           |
| <b>Desviación estándar</b> |      | 0.59679          | 0.02631  |      | 0.01975          | 0.03606 | 0.00461          |
|                            | K2   | 0.049            | 0.07     | K6   | 0.085            | 0.173   |                  |
|                            | K2   | 0.068            | 0.074    | K6   | 0.089            | 0.149   |                  |
|                            | K2   | 0.05             | 0.086    | K6   | 0.088            |         |                  |
| <b>Promedio</b>            |      | 0.0556           | 0.07666  |      | 0.0873           | 0.161   |                  |
| <b>Desviación estándar</b> |      | 0.01069          | 0.00832  |      | 0.00208          | 0.01697 |                  |
|                            | K3   | 0.08             | 0.094    | K7   | 0.125            | 0.096   |                  |
|                            | K3   | 0.093            | 0.084    | K7   | 0.07             | 0.083   |                  |
|                            | K3   |                  | 0.078    | K7   | 0.056            | 0.089   |                  |
| <b>Promedio</b>            |      | 0.0865           | 0.085333 |      | 0.0836           | 0.0893  |                  |
| <b>Desviación estándar</b> |      | 0.00919          | 0.00808  |      | 0.03647          | 0.00650 |                  |
|                            | K4   | 0.067            | 0.101    |      |                  |         |                  |
|                            | K4   | 0.072            | 0.108    |      |                  |         |                  |
|                            | K4   | 0.079            | 0.1      |      |                  |         |                  |
| <b>Promedio</b>            |      | 0.0726           | 0.103    |      |                  |         |                  |
| <b>Desviación estándar</b> |      | 0.00602          | 0.00435  |      |                  |         |                  |

Los datos del Cuadro II muestran las lecturas en microplaca del control negativo, control positivo y de los MICs de reuterina frente a *K. pneumoniae* donde se puede observar que los valores de las lecturas del control positivo y de la muestra que contiene reuterina y cultivo de *K. pneumoniae* no varían de manera

significativa e indican que aún en presencia del antimicrobiano hay crecimiento, en comparación con los datos del control (donde no hay reuterina), por lo tanto se determina que no presenta inhibición. Así mismo, se sospecha que *K. pneumoniae* no es susceptible a reuterina probablemente por que es una bacteria encapsulada y a su vez que tiene la capacidad de formar biopelículas.

Cabe resaltar que *K. pneumoniae* es un patógeno importante que incrementa su virulencia no solo por la capacidad que tiene para causar infecciones relacionadas al nosocomio y a la comunidad, sino, por el empleo de estrategias para crecer y evadir la respuesta inmune del huésped, los mecanismos de resistencia y factores de virulencia que posee como producir sideróforos, fimbrias, adhesinas, pilis, biopelículas (exopolisacáridos) y cápsula (Bansal, Soni, Harjai, & Chhibber, 2014; Barreto *et al.*, 2009; Lázaro, 2003; Valdiviezo, 2019). La cápsula es el principal factor de virulencia para *K. pneumoniae* puesto que el material capsular forma haces gruesos de estructuras fibrilosas que rodean la superficie bacteriana en capas masivas, de este modo protege a la bacteria de la fagocitosis por polimorfonucleares y de la muerte intracelular por neutrófilos, evita la lisis de la bacteria, Incluso la cápsula de *K. pneumoniae* dificulta la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos y también la protege de la actividad bactericida del suero (Cubero, 2016; Lázaro, 2003; Namikawa *et al.*, 2019; Valdiviezo, 2019). Por otro lado, la aparición de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas ha promovido que las infecciones causadas por este patógeno sean potencialmente más peligrosas, debido a la sobreproducción de su cápsula de polisacáridos y con ella los antígenos de superficie: polisacárido capsular y lipopolisacárido (López & Echeverri, 2010; Suárez *et al.*, 2015; Valdiviezo, 2019). El lipopolisacárido que se encuentra presente en la membrana externa es fundamental para la estructura e inmunidad de *K. pneumoniae* ya que es a través de este que le confiere protección contra los antibióticos (Cubero, 2016; Valdiviezo, 2019). Es posible que la cápsula de *K. pneumoniae* esté protegiendo a la bacteria contra la acción antimicrobiana de la reuterina, logrando a su vez

que esta sustancia no penetre al interior de la bacteria, puesto que en experimentos realizados (aún no publicados) en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRS) presentan sensibilidad ante la reuterina. *Pseudomonas aeruginosa* es sensible a reuterina en una concentración mínima de 4 mM mientras *Staphylococcus aureus* MRS es sensible a 2 mM. Además, estudios han reportado que la reuterina ha sido eficaz para inhibir diversos microorganismos como bacterias Gram negativas, Gram positivas, virus y protozoos (Doleyres *et al.*, 2005; Milena & Suárez, 2009; Talarico & Dobrogosz, 1989). Por otro lado, se ha demostrado que cepas mutantes de *K. pneumoniae* sin cápsula no presentan virulencia y no son capaces de causar infecciones (Cubero, 2016). Experimentos realizados en animales de laboratorio han confirmado que las bacterias sin cápsula no causan infección y son fácilmente reconocidas y destruidas por macrófagos del sistema inmunológico (Albertí, 2004). Otro estudio reportó que la pérdida de la síntesis de la cápsula reduce la virulencia al reducir el efecto antifagocítico contra los macrófagos y neutrófilos (Namikawa *et al.*, 2019). La problemática radica en que estas bacterias mutan rápidamente logrando que la composición química de los polisacáridos de la cápsula varíe, haciendo más difícil la efectividad del tratamiento (Albertí, 2004). Por otra parte, en un estudio donde se utilizaron otras sustancias antimicrobianas, se observó microscópicamente que cuando las células de *K. pneumoniae* se cultivaron con estos agentes bactericidas, presentaron una reducción bastante drástica y significativa en el grosor de la cápsula, la limitación con estos antimicrobianos es que no son suficientes como terapia para la infección por *K. pneumoniae* por lo que necesitan una combinación de otro bactericida para llevar a cabo una eficiente actividad antimicrobiana (Namikawa *et al.*, 2019), por ejemplo, si la cápsula de *K. pneumoniae* esta impidiendo que la reuterina penetre dentro de la bacteria, la sinergia de otras sustancias antimicrobianas que permitan reducir el grosor de la cápsula en conjunto con reuterina sería un método eficaz de probar, para determinar que la cápsula de *Klebsiella* es quien la esta protegiendo y que en efecto la reuterina es

un antimicrobiano eficaz para inhibir esta cepa patógena al igual que con *Staphylococcus aureus* y *pseudomonas aeruginosa* que no presentan cápsula en su estructura.

Por otro lado, se ha detectado a *K. pneumoniae* productora de biopelículas. La cronicidad o persistencia de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* están asociados a la formación de biopelículas en dispositivos o implantes clínicos (sondas, catéteres, implantes, prótesis etc.). Las infecciones relacionadas con biopelículas son las más difíciles de tratar con antibióticos debido a que estos no logran penetrar en su estructura. La naturaleza aniónica del exopolisacárido hace que se retrase la difusión de los antibióticos catiónicos como los aminoglucósidos, retardando la muerte celular al otorgarle mayor tiempo a la bacteria para que implemente una respuesta adaptativa. En el caso, de microorganismos productores de enzimas betalactamasas como *K. pneumoniae*, incrementan la producción enzimática en respuesta a la exposición del antibiótico betalactámico; las betalactamasas al ser secretadas o liberadas después de la lisis de la bacteria tienden a acumularse en el exopolisacárido, logrando de esta manera la inactivación del betalactámico en las capas superficiales de la biopelícula y evitando que el antibiótico penetre hacia el interior de la misma, y no solo eso, sino que en la biopelícula las bacterias tienden a formar colonias que facilitan el intercambio genético a través de plásmidos y así adquieren múltiples resistencias (Barreto *et al.*, 2009).

La prevalencia de patógenos bacterianos en las biopelículas, donde son mucho más resistentes a los antimicrobianos y a los componentes del sistema inmunitario, ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para controlar las infecciones por biopelículas (Bansal, Soni, Harjai, & Chhibber, 2014). La mayoría de los antibióticos tienen su blanco de acción en la inhibición de la pared bacteriana, en las proteínas de la membrana, impidiendo la síntesis de ADN y la síntesis de proteínas, sin embargo, es necesario el desarrollo de antimicrobianos específicamente que sean capaces y efectivos para destruir, atravesar o impedir

la formación de la cápsula y de las biopelículas, por lo tanto estas condiciones deben ser consideradas y evaluadas al elegir el tratamiento.

### 3.4 Conclusiones

Se ha demostrado que la reuterina ha sido eficaz para inhibir diversos microorganismos como bacterias Gram negativas, Gram positivas, virus y protozoos. Sin embargo, en este estudio la reuterina no resultó ser efectiva para inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* a una concentración máxima probada de 44.7mM, debido probablemente a que posee cápsula, lo cual quiere decir que esta estructura le puede estar confiriendo protección y por lo tanto, resistencia a antimicrobianos incluida la reuterina. Sin embargo, en experimentos realizados con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (datos aún no publicados), la reuterina es eficaz para inhibir su crecimiento. Lo cual hace a *K. pneumoniae* un patógeno especialmente alarmante e importante de tratar, promoviendo el desarrollo de nuevas alternativas antimicrobianas que puedan eliminar la cápsula.

### **3.5 Recomendaciones**

Se recomienda realizar experimentos de reuterina en sinergia con otros antimicrobianos capaces de inhibir o reducir el grosor de la cápsula, de modo que permita penetrar en el interior de la célula bacteriana y así confirmar que la cápsula no permite que la reuterina lleve a cabo su efectividad.

Mantener la reuterina siempre refrigerada y al utilizarla para realizar experimentos colocarla siempre en hielo.

Siempre que se vayan a sembrar cepas de una placa a un caldo, encender el mechero, no colocar las tapaderas de los tubos en la superficie, esterilizar bien el asa bacteriológica, cubrirse con un cubrebocas previamente y no hablar mientras se realiza la siembra.

Al preparar una solución o sembrar un cultivo en caldo agitar y mezclar bien.

Al momento de incubar los cultivos en caldo siempre ponerlos en agitación.

Utilizar siempre el material bien lavado, seco y estéril.

Preparar el medio de cultivo (en caldo) solo si se va a esterilizar en ese momento y conservarlo en un recipiente cerrado y en refrigeración.

Resuspender bien las muestras a analizar en placa.

Al esterilizar en campana con luz UV colocar su tela especial para evitar la exposición.

Revisar que el material y reactivos estén listos (limpios y estériles) antes del día programado para realizar la experimentación.

### 3.6 Difusión



## “SUSCEPTIBILIDAD A REUTERINA DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIRRESISTENTE AISLADA DE HOSPITALES”

Aboites-Quiarte, D.L.<sup>1</sup>; Ortiz-Rivera, Y.<sup>1</sup>

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Programa de Licenciatura en Química, Laboratorio de Biotecnología microbiana V-313, Anillo Envoltante del Pronaf y Estocolmo s/n, C.P.32310, A.P. 1595-D, Ciudad Juárez, Chihuahua, México. Tel. 6881800 Ext.1984  
 Correo Electrónico: yuridia.Ortiz@uacj.mx al139303@alumnos.uacj.mx



#### Introducción

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública mundial y el desarrollo de nuevas alternativas antimicrobianas es un proceso que puede tardar años de investigación. En el ámbito hospitalario hay pocas opciones de control y tratamiento contra las infecciones bacterianas. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) es un patógeno oportunista y multiresistente, debido al uso indiscriminado de antibióticos y a sus múltiples mecanismos de resistencia, es responsable de infecciones nosocomiales de difícil tratamiento e incluso puede causar la muerte. Por otro lado, se ha generado un interés significativo por la utilización de probióticos, ya que estos han demostrado tener características benéficas en la salud del huésped y una gran capacidad antimicrobiana. Por ello, en este proyecto se propone, la utilización de *Lactobacillus reuteri* que es un importante probiótico, que tiene la capacidad de producir diversos antimicrobianos como lo son las bacteriocinas y la reuterina un aldehído que ha demostrado su efectividad como antimicrobiano. Sin embargo, la reuterina se ha empleado como conservador de alimentos y no existe evidencia del uso de esta sustancia en cepas de origen nosocomial. Por ello, esta investigación se centró en evaluar la efectividad de esta sustancia como antimicrobiano contra *K. pneumoniae*.

#### Metodología

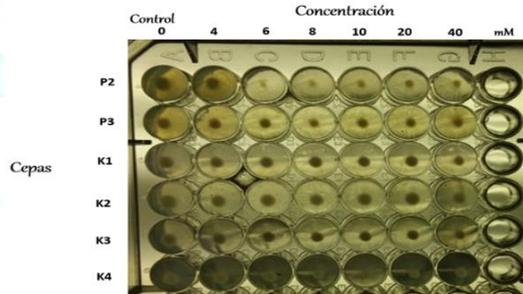
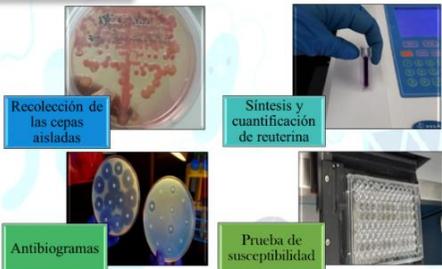


Figura 2. Prueba de susceptibilidad a reuterina de *K. pneumoniae* a diferentes concentraciones de reuterina utilizando como referencia una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* sensible a reuterina a una concentración mínima inhibitoria de 4 mM.

#### Resultados

Cuadro I. Determinación de la sensibilidad y resistencia a antibióticos a través de antibiogramas de las cepas aisladas de *K. pneumoniae*.

| Antibiótico                | K1         | K2         | K3         | K4         | K5         |
|----------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Amp <sup>s</sup> sulbactam | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente | Resistente |
| Amikacina                  | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| Ciprofloxacina             | Sensible   | Sensible   | Resistente | -          | Resistente |
| Cefepima                   | Sensible   | Sensible   |            |            |            |
| Cefotetan                  | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| Ertapenem                  | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| Gentamicina                | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Resistente |
| Imipenem                   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| Levofloxacina              | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Resistente |
| Meropenem                  | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| pip/Tazobactam             | Resistente | Sensible   | Resistente | Resistente | Sensible   |
| Piperaciclina              | Resistente | Resistente |            |            |            |
| Trimet/Sulfa               | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente |
| Tetraciclina               | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente | Resistente |
| Tigeciclina                | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   | Sensible   |
| Trobramicina               | Sensible   | Sensible   | Resistente | Resistente | Resistente |

Cuadro II. Lecturas de la prueba de susceptibilidad con reuterina concentrada (44.7 mM).

|                     | Cepa | Control positivo |        | Cepa             | Control positivo |        |
|---------------------|------|------------------|--------|------------------|------------------|--------|
|                     |      | Muestra          | K2     |                  | Muestra          | K6     |
| Promedio            | K1   | 0.1006           | 0.1225 | K2               | 0.0556           | 0.0766 |
| Desviación estándar |      | 0.0263           | 0.0332 |                  | 0.0106           | 0.0083 |
| Promedio            | K3   | 0.085333         | 0.0865 | K4               | 0.0726           | 0.103  |
| Desviación estándar |      | 0.008            | 0.0091 |                  | 0.006            | 0.0043 |
| Promedio            | K5   | 0.1365           | 0.0936 | K6               | 0.0873           | 0.161  |
| Desviación estándar |      | 0.036            | 0.0197 |                  | 0.002            | 0.0169 |
| Promedio            | K7   | 0.0893           | 0.0836 | Control negativo |                  |        |
| Desviación estándar |      | 0.0065           | 0.0364 | 0.00466          |                  |        |

#### Discusión y Conclusión

Los datos de la tabla II muestran que los valores del control positivo y de la muestra no varían de manera significativa, por lo tanto, no presenta inhibición. No obstante, se ha demostrado que la reuterina ha sido eficaz para inhibir diversos microorganismos como bacterias Gram negativas, Gram positivas, virus y protozoos (Doleyres *et al.*, 2005; Milena & Suárez, 2009; Talarico & Dobrogosz, 1989). Sin embargo, en este estudio la reuterina no resultó ser efectiva para inhibir el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* a una concentración máxima probada de 44.7 mM, debido probablemente a que posee cápsula, la cual le confiere protección y resistencia a los antimicrobianos. Así mismo, se ha descrito que el principal factor de virulencia para *K. pneumoniae* es su cápsula y con ella los antígenos de superficie: polisacárido capsular y el lipopolisacárido presente en la membrana externa le confiere protección contra los antibióticos, el material capsular forma haces gruesos de estructuras fibrosas que rodean la superficie bacteriana en capas masivas protege a la bacteria de la fagocitosis por polimorfonucleares y evita la lisis de la bacteria, dificulta la acción bactericida de los péptidos antimicrobianos y de la actividad bactericida del suero (Cubero, 2016; López & Echeverri, 2010; Valdiviezo, 2019). Sin embargo, en experimentos realizados con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (datos aún no publicados), la reuterina es eficaz para inhibir su crecimiento en concentraciones mínimas entre 2 y 4 mM. Lo cual hace a *K. pneumoniae* un patógeno especialmente alarmante e importante de tratar, promoviendo el desarrollo de nuevas alternativas antimicrobianas que puedan impedir la formación de la cápsula.

#### Referencias

Cubero González, M. (2016). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. *TDX (Tesis Doctoral En Xarxa)*. Retrieved from <http://www.tesisenred.net/handle/10803/392721>  
 Doleyres, Y., Beck, P., Vollenweider, S., & Lacroix, C. (2005). Production of 3-hydroxypropionaldelyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 467-474. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1895-4>  
 López, V. A., & Echeverri, T. L. M. (2010). *K. pneumoniae*: ¿The new "superbacteria"? Pathogenicity, epidemiology and resistance mechanisms. *Intervet*, 28(2), 157-165. <https://doi.org/10.4295/intervet.2010.30.597>  
 Talarico, T. L., & Dobrogosz, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(5), 674-679. <https://doi.org/10.1128/AAC-33-5-674>  
 Sandra Milena Vázquez, M., Héctor Suárez, M., S. Z. B. (2009). USE OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES. 48(3), 64-71.  
 Sylvia Belén Valdiviezo Ayala. (2019). Análisis de estructura de covarianza sobre indicadores relacionados con la salud en ancianos en el hogar con un enfoque en salud subjetiva. *TiE. Duke Law Journal*, 1(1), 1-13. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

## LITERATURA CITADA

- Albertí, S. (2004). *Klebsiella, una bacteria que aprovecha las uniones celulares para introducirse en la corriente sanguínea*. Retrieved from [http://www.uib.cat/digitalAssets/128/128119\\_neumonia.pdf](http://www.uib.cat/digitalAssets/128/128119_neumonia.pdf)
- Algorta, G., & Schelotto, F. (2006). En *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (pág. 325). 2da edición .
- Andrade, V., Espinosa De Los Monteros, L. E., Jiménez, V., Cervantes, C., & Silva, J. (2004). Caracterización de *Klebsiella pneumoniae* productora de la  $\beta$ -lactamasa SHV-5, en una unidad de cuidados intensivos. *Salud Publica de Mexico*, 46(6), 524–528. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342004000600007>
- Ángel Díaz, M., Ramón Hernández, J., Martínez-Martínez, L., Rodríguez-Baño, J., Pascual, Á., Martínez Peinado, C., ... Castillo, J. (2009). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: Segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(9), 503–510. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.09.006>
- Arnold, R. S., Thom, K. A., Sharma, S., Phillips, M., Kristie Johnson, J., & Morgan, D. J. (2011). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Southern Medical Journal*, 104(1), 40–45. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181fd7d5a>
- Baeza, Jiménez Ramirez; Lopez, Martinez L. Xochitl; Espinosa, de los M. J. J., & Fernández, Gerardo; Valerio, Alfaro; García, G. S. (n.d.). *Clave: 57750*. (5).
- Bansal, S., Soni, S. K., Harjai, K., & Chhibber, S. (2014). Aeromonas punctata derived depolymerase that disrupts the integrity of *Klebsiella pneumoniae* capsule: Optimization of depolymerase production. *Journal of Basic Microbiology*, 54(7), 711–720. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300356>
- Barreto, S., Zambrano, M., & Araque, M. (2009). Variaciones fenotípicas de susceptibilidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* de origen nosocomial y su asociación con la formación de biopelículas. *Investigacion Clinica*, 50(2), 221–229.
- Bermejo, J., Bencomo, B., Arnesi, N., Lesnaberes, P., Borda, N., & Notario, R. (2006). Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Revista Chilena de Infectología*, 23(4), 316–320. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182006000400004>

- Betancor, L., Gadea, M., & Flores, K. (2008). *Genetica Bacteriana*. Obtenido de <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/GeneticaBacteriana.pdf>
- Breve, N. (2014). *Colistina , el resurgir de un antimicrobiano Colistin , the resurgence of an antimicrobial*. *53*(2), 237–238.
- Bustos-Moya, G., Josa-Montero, D., Perea-Ronco, J., Gualtero-Trujillo, S., Ortiz-Aroca, J., Novoa-Bernal, Á., ... Poveda-Henao, M. (2016). Factores relacionados con el control exitoso de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC-2 en una unidad de cuidado intensivo en Bogotá, Colombia. *Infectio*, *20*(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.07.001>
- Cavagnaro Santa María, F. (2014). Antibiotic resistance in urinary infection: The never-ending story. *Boletín Medico Del Hospital Infantil de Mexico*, *71*(6), 329–331. <https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2014.12.001>
- Ceylan, Z., Uslu, E., İspirli, H., Meral, R., Gavgalı, M., 'Yilmaz, M. T., & Dertli, E. (2019). A novel perspective for *Lactobacillus reuteri*: Nanoencapsulation to obtain functional fish fillets. *Lwt*, *115*(July), 108427. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108427>
- Cubero González, M. (2016). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*. Retrieved from <http://www.tesisenred.net/handle/10803/392721>
- De La Vega, J. R., Benadof, D., Veas, A., & Acuña, M. (2017). Susceptibilidad de enterobacterias a piperacilina/tazobactam en un hospital pediátrico de Chile. *Revista Chilena de Infectología*, *34*(6), 563–569. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000600563>
- Diaz, N. R. (2016). *Biotica Magistral*. Obtenido de [http://www.botica.com.py/prospecto-digital/2016/11/16/lactobacillus-reuteri/?fbclid=IwAR3VD8jkqawN\\_iz\\_hpqip3egwFqTOpf3E9FM-IHMS-ECYcKDuwijOiRk9Ys](http://www.botica.com.py/prospecto-digital/2016/11/16/lactobacillus-reuteri/?fbclid=IwAR3VD8jkqawN_iz_hpqip3egwFqTOpf3E9FM-IHMS-ECYcKDuwijOiRk9Ys)
- Doleyres, Y., Beck, P., Vollenweider, S., & Lacroix, C. (2005). Production of 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(4), 467–474. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1895-4>
- Du, Y., Luo, J., Wang, C., Wen, Q., Duan, M., Zhang, H., & He, H. (2014). Detection of drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Chinese hares (*Lepus sinensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, *50*(1), 109–112. <https://doi.org/10.7589/2013-03-059>
- Echeverri Toro, L. M., & Cataño Correa, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia TT - *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance.

- Iatreia*, 23(3), 240–249. Retrieved from <http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/1356/1028>
- Eliecer Cano, M., Ángeles Domínguez, M. ., Ezpeleta, C., Padilla, B., Ramírez de Arellano, E., & Martínez-Martínez, L. (2008). Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(4), 220–229. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(08\)72694-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)72694-6)
- Espinal, P; Mantilla, J; Saavedra, C. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasas de espectro extendido. *Biomédica*, 252–261. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v24i3.1271>
- Fernández, Y. C. (2005). Probióticos y salud: una reflexión necesaria. *Revista Cubana de Medicina General Integral*.
- Fierro-monti, C. (2017). *Rol de los Probióticos como Bacterioterapia en Introducción*. XIX, 30. <https://doi.org/10.22592/o2017n30a2>
- Hernández-Torres, J. G. E. G.-V. A. (1982). The effects of estrogens on immune responses. *International Journal of Immunopharmacology*, 4(4), 361. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(82\)90377-0](https://doi.org/10.1016/0192-0561(82)90377-0)
- Hernández carmen; Millones Pablo. (2016). Lactobacillus reuteri como agente probiotico en la enfermedad periodontal. *In Crescendo. Ciencias de La Salud*, 3(1), 210–215. Retrieved from <http://revistas.uladech.edu.pe/index.php/increscendo-salud/article/view/1266/1046>
- Holguín, Salazar Héctor Daniel; Cisneros, R. M. E. (2005). Open Journal Systems. *Library Hi Tech*, Vol. 23, pp. 504–519. <https://doi.org/10.1108/07378830510636300>
- Juan ignacio Álos. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Keyra León., Huniades Urbina Medina., Editza sanchez., Abraham Abraham., M. T. A. (2015). *P roductos y eFectos*. 78(1), 129–134.
- Lasa, I., Del Pozo, J. L., Leiva, J., & Penadés, J. R. (2005). Bacterial biofilms and infection. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163–175.
- Lázaro, L. I. (2003). " Biosíntesis del lipopolisacárido de *Klebsiella Pneumoniae* ". *Biología*.
- López, V. J. A., & Echeverri, T. L. M. (2010). *K. pneumoniae*: ¿The new “superbacteria”? Pathogenicity, epidemiology and resistance mechanisms. *Iatreia*, 23(2), 157–165. <https://doi.org/10.4295/audiology.30.597>

- Madigan, Micahel T; Martinko, John M; Parker, J. (2007). *Madigan Micahel T; MartinkoJohn M; Parker Jack*.
- Mani López, E., García Galindo, H. S., Aurelio, L. M. V., & Santiago, E. (2008). IMPACTO SOCIAL Y ECOLÓGICO DEL EFECTO ESTIMULANTE DE SALMONELLA TIPHYMURIUM EN LA PRODUCCIÓN DE REUTERINA PRODUCIDA POR LACTOBACILLUS REUTERI. *Idesia (Arica)*, 26(2), 9–12. <https://doi.org/10.4067/s0718-34292008000200002>
- Martín, I. C. (2017). *Universidad complutense de madrid*.
- Martínez Moliner, V. (2014). *Papel del lípido A de Klebsiella pneumoniae en el control de la respuesta inmune* . 187. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2013.05.012>
- Mendoza Medellín, A. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de La Facultad de Medicina (México)*, 54(1), 18–27.
- Miguel Anguel Serra Valdés. (2017). iS h U i s r e i c e r m r m J ] . *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 5(3), 8–9. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000300011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011)
- Morejón García, M. (2013). Betalactamasas de espectro extendido. *Revista Cubana de Medicina*, 52(4), 272–280.
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of Lactobacillus reuteri in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>
- Namikawa, H., Oinuma, K. I., Sakiyama, A., Tsubouchi, T., Tahara, Y. O., Yamada, K., ... Kakeya, H. (2019). Discovery of anti-mucoviscous activity of rifampicin and its potential as a candidate antivirulence agent against hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.05.018>
- Noah Rosenblatt Farrell. (2009). El paisaje de la resistencia a los antibióticos. *Salud Publica de Mexico*, 51(5), 434–442. <https://doi.org/10.1590/S0036-36342009000500011>
- Olveira Fuster, G., & González Molero, I. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutricion Hospitalaria*, 22(SUPPL. 2), 26–34.
- OMS. (2018 ). *Organizacion mundial de la salud* . Obtenido de [http://www.who.int/drugresistance/AMR\\_Importance/es/](http://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/)
- OMS. (15 de Febrero de 2018). *Organizacion mundial de la salud* . Obtenido de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>

- OMS. (29 de Enero de 2018). *Organizacion Mundial de la salud* . Obtenido de <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/e>
- Ortiz, R. Y., Sánchez Vega, R., Gutiérrez Méndez, N., León Félix, J., Acosta Muñiz, C., & Sepulveda, D. R. (2017). Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, *100*(6), 4258–4268. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11534>
- Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignoli, R., & Medina, J. (2011). *Carbapenemasa* ). 2011.
- Quintana, C. A. (12 de Abril de 2019). Nanoparticulas metalicas y su uso en biomateriales antimicrobianos.
- RAMÍREZ, M. D. S. C. (2005). *Tesis*. 1, 92.
- Rodríguez noriega, E., León garnica, G., Petersen morfín, S., Pérez Gómez, H. R., González Díaz, E., & Morfín Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, *34*(1), 181–190. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/843/84330489021.pdf>
- Sandra Milena Vásquez M., Héctor Suárez M., S. Z. B. (2009). *USE OF ANTIMICROBIAN SUBSTANCES*. *36*(3), 64–71.
- Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G. (1998). Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud Publica de Mexico*, *40*(6), 510–516. <https://doi.org/10.1590/S0036-36341998000600008>
- Suárez, B. T., Yusnielis Pérez, B., & Luisa, M. (2015). *Caracterización de aislamientos intrahospitalarios de Klebsiella pneumoniae en un hospital terciario Characterization of nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae in a tertiary hospital*. *54*(4), 323–336.
- Suárez, C., & Gudíol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, *27*(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sylvana Belén Valdiviezo Ayala. (2019). No. Análisis de la estructura de covarianza de los indicadores relacionados con la salud en los ancianos en el hogar con un enfoque en la salud subjetiva Title. *Duke Law Journal*, *1*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Talarico, T. L., & Dobrogosz, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *33*(5), 674–679. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.5.674>
- Vargas-Alzate, C. A., Higuera-Gutiérrez, L. F., & Jiménez-Quiceno, J. N. (2019). Costos médicos directos de las infecciones del tracto urinario por bacilos

Gram negativos resistentes a betalactámicos en un hospital de alta complejidad de Medellín, Colombia. *Biomédica*, 39, 35–49. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i1.3981>

Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., ... González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34(5), 476–484. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>

Vignoli, R., & Seija, V. (2006). Principales. En R. Vignoli, & V. Seija, *Temas de Virología y Bacteriología Médica* (págs. 649-662). FEMUR 2da Edición .

