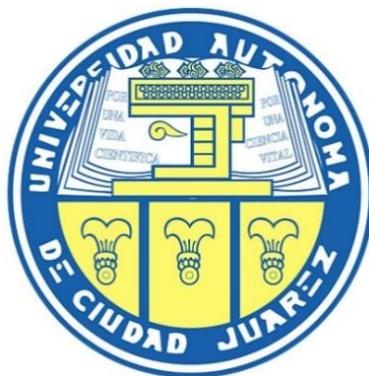


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS



DETERMINACION DE PERFILES DE REISTENCIA A  
ANTIBIOTICOS Y SUSCEPTIBILIDAD A REUTERINA DE CEPAS  
NOSOCOMIALES DE *Pseudomonas aeruginosa*

POR

SAMUEL IVÁN ROMERO CÓRDOVA

TESIS

LICENCIATURA EN QUÍMICA

CD. JUÁREZ, CHIH.

NOVIEMBRE 2019

DETERMINACION DE PERFILES DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS Y  
SUSCEPTIBILIDAD A REUTERINA DE CEPAS NOSOCOMIALES DE *Pseudomonas*  
*aeruginosa*

POR

SAMUEL IVAN ROMERO CORDOVA

TESIS

---

DRA. YURIDIA ORTIZ RIVERA  
DIRECTORA DE LA 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 2019

## DEDICATORIA

A quien se me adelanto en el camino y no logro verme culminar mis metas, mi hermano que me acompaña en este camino desde el cielo. A mi abuela Alicia un gran ejemplo y motivación para mí. Pero sobre todo a Dios por tanto amor y a mi Madre y Padre por tantos sacrificios y apoyo a lo largo de estos años.

*“El éxito es la suma de pequeños esfuerzos repetidos día a día”*

*-Robert Collier*

## AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a mi directora de tesis, la Dra. Yuridia por el apoyo, paciencia y dedicación al trabajo realizado y también por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. A mis compañeros de laboratorio, por las risas que hacían que nos olvidáramos un poco del estrés y por tener la disponibilidad de ayudarnos unos a otros cuando lo necesitábamos.

A la Dra. Gwendolyne Peraza Mercado, por ayudarnos y corregirnos nuestros errores con tanta paciencia. Por los regaños que nos hicieron crecer y por los cuestionamientos, porque sin ello no hubiésemos investigado más sobre nuestro trabajo.

A mis maestros porque algunos creían que solo teníamos su materia, por su entrega y dedicación a la docencia, por enseñarme no solo sobre su materia, sino también de la vida.

A mis compañeros de clase que se convirtieron en amigos, por hacer mejor la estancia en la universidad, porque sin ellos no hubiese aguantado estar tantas horas dentro de ella. Por compartir conmigo cinco años de carrera, por las experiencias dentro y fuera de la escuela y por lo que cada uno trajo a mi vida. A mis mejores amigos Alain, Saul y Rafael, por estar al pie del cañón y ser un gran equipo.

A mi familia por tantas palabras de motivación, por el apoyo y estar conmigo siempre y por las tantas muestras de cariño que me hicieron ser mejor persona. A mi mamá y mi papa, mis hermanos y mis abuelos, por ser mi fortaleza y motivación, y recordarme día a día porque elegí esta carrera. Y finalmente, a mi segunda familia mis amigos; por apoyarme siempre y tenerme en sus oraciones cuando más estresado estaba.

## RESUMEN

La evolución de la resistencia bacteriana ha provocado un grave problema de salud en la población, esto debido al abuso en el consumo de antibióticos, la aplicación de dosis no óptimas y la forma irregular del consumo de estos han llevado a un aumento de la resistencia antimicrobiana. Debido a esto es importante generar nuevas estrategias que ayuden a disminuir no solo la resistencia antimicrobiana sino también el consumo de antibióticos y la búsqueda de nuevos antibióticos. Asimismo, La reuterina es un producto metabólico resultado de la fermentación de *Lactobacillus reuteri* el cual es utilizado para la fabricación de diferentes antimicrobianos, además es eficiente al inhibir el crecimiento de bacterias gram negativas que presentan multirresistencia a antibioticos como lo es *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* se obtuvo de un aislado nosocomial, para el análisis de susceptibilidad se utilizaron diferentes concentraciones de reuterina y por medio de la técnica MICS se determinó la susceptibilidad al observar disminución en la turbidez y crecimiento bacteriano. Por lo que se determinó que la reuterina es eficiente al inhibir el crecimiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 4mM.

**Palabras clave:** reuterina, *Pseudomonas aeruginosa*, resistencia, antibioticos

## ABSTRACT

Bacterial resistance's evolution has provoked a serious health problem in the population, due to antibiotics consumption, the application of non-optimal doses and the irregular consumption, it has increased an antimicrobial resistance. Due to this, it is important to produce new strategies that help diminish not only antimicrobial resistance but also the antibiotics' consumption and to search for new antibiotics. In addition, reuterine is a metabolic product resulting from the fermentation of *Lactobacillus reuteri*, which is used in the fabrication of different antimicrobials, further to this, it's efficient in inhibiting the growth of gram-negative bacteria that show multi-resistance to antibiotics, such as *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa* was obtained from a nosocomial isolation, for the susceptibility analysis, different concentrations of reuterine were used and was later determined, along with a decrease in turbidity and bacterial growth, through the MICS technique. Therefore, it was determined that reuterine is efficient in the inhibition of the bacterial growth of *Pseudomonas aeruginosa* to a 4mM concentration.

**Key words:** reuterin, *Pseudomonas aeruginosa*, resistance, antibiotics

## CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| RESUMEN.....  | v  |
| ABSTRACT.....   | vi |
| Índice de Figuras.....  | ix |
| Índice de Cuadros.....  | x  |
| INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| 1. Antecedentes.....  | 1  |
| 1.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....   | 1  |
| 1.1.1 Generalidades.....  | 1  |
| 1.1.2 Importancia clinica.....  | 5  |
| 1.2 Reuterina.....  | 9  |
| 1.3 Antibioticos.....   | 10 |
| 1.3.1 Resistencia.....  | 11 |
| 1.4 Hipotesis.....  | 15 |
| 1.5 Objetivos.....  | 15 |
| 1.5.1 Objetivo general.....   | 15 |
| 1.5.2 Objetivos especificos.....  | 15 |
| 2. Materiales y Métodos.....  | 16 |
| 2.1 Preparacion del medio de cultivo.....   | 16 |
| 2.2 Preparacion del inculo.....   | 16 |
| 2.3 Siembra de muestra.....   | 16 |
| 2.4 Determinacion de los perfiles de resistencia.....   | 16 |
| 2.5 Concentracion minima inhibitoria de reuterina en <i>P. aeruginosa</i> .....   | 16 |
| 3. Resultados y Discusión.....  | 18 |
| 3.1 Determinacion de sensibilidad y resistencia de las cepas <i>Pseudomonas 1</i> , <i>pseudomonas 2</i> y <i>Pseudomonas 3</i> .....                       | 18 |
| 3.2 Analisis de la concentración minima inhibitoria de <i>Pseudomonas 1</i> , <i>pseudomonas 2</i> y <i>Pseudomonas 3</i> al tratamiento con reuterina..... | 19 |
| 3.3 Conclusiones.....   | 21 |
| 3.4 Recomendaciones.....  | 22 |

LITERATURA CITADA ..... 23

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura   | Página |
|--|--------|
| 1 Inhibición de la cepa <i>P1</i> a las 14 horas de incubación a diferente concentración de reuterina . . . . .                      | 19     |
| 2 inhibición de las cepas <i>P2</i> y <i>P3</i> pasadas 24 horas de incubación con diferentes concentraciones de reuterina . . . . . | 20     |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro  | Página |
|---|--------|
| I Antibiograma de las cepas <i>Pseudomonas</i> 1,2 y 3 . . . . .                              | 18     |
| II Concentración mínima inhibitoria de cepas <i>Pseudomonas</i> 1, 2, 3 a reuterina . . . . . | 21     |

## INTRODUCCIÓN

*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) es una especie que pertenece a las bacterias Gram negativas capaces de sobrevivir a una gran variedad de superficies, ambientes acuosos y no requieren muchos nutrientes para poder sobrevivir. Las infecciones con *P. aeruginosa* son de mayor preocupación para los pacientes hospitalizados (James A. Karlowsky 2003). *Pseudomonas* es patógeno oportunista responsable de un gran número de infecciones invasivas (Milena Polotto 2012). El espectro de infecciones humanas causadas por *P. aeruginosa* varía desde infecciones en la piel hasta una sepsis fulminante. *P. aeruginosa* es la causante de infecciones respiratorias nosocomiales y es la principal preocupación para pacientes con neumonía que son dependientes de un respirador (James A. Karlowsky 2003). *P. aeruginosa* es resistente a antimicrobianos de varias clases ya sea de manera intrínseca o mediante la adquisición de determinantes genéticos para su multirresistencia a diferentes fármacos como lo son la ampicilina, amoxicilina, penicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol entre otros (James A. Karlowsky 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo público en febrero del 2017 la primera lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos, siendo esta lista publicada para la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos, se pone como amenaza prioritaria las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos. La multirresistencia es una evolución a consecuencia del uso de antibióticos, siendo esta diferente por variables: Al grado de abuso de los antibióticos y factores externos como el escape de genes de resistencia al ADN móvil y a cepas biológicamente “fijas” (Livermore, 2004) ante este problema es necesario buscar alternativas de control, La reuterina es una sustancia antimicrobiana que se encuentra en el tracto gastrointestinal en los humanos y animales. Esta presenta un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias Gram negativas, donde se encuentra *P. aeruginosa* (Cuenca 2005).

## 1. Antecedentes

### 1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.1.1 Generalidades

El género *Pseudomonas* fue descrito a finales del siglo XIX cuando las descripciones de los géneros se basaban en morfologías macro y microscópicas. Ya en el siglo XX, se propusieron las características fisiológicas como criterios básicos para la taxonomía bacteriana (Peix, Ramírez-Bahena, & Velázquez, 2018). *Pseudomonas* son bacilos gram negativos, móviles, aerobios, algunos de los cuales producen pigmentos hidrosolubles. *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra presente en pequeñas cantidades en la microflora intestinal normal, en la piel del ser humano y es el principal microorganismo patógeno del grupo. Otras *Pseudomonas* pocas veces producen enfermedad. Actualmente la clasificación de las *Pseudomonas* se basa en su homología de rRNA / DNA y en sus características de cultivo comunes (Geo. F. Brooks, Janet S. Butel, & Stephen A. Morse, 2005). *P. aeruginosa* es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de trabajadores de la salud (Luján Roca, 2014). *P. aeruginosa*, tiene forma de bastón, mide casi 0.6  $\mu\text{m}$ . Es gram negativo, muestra disposición en bacterias individuales, en pares y a veces en cadenas cortas (Geo. F. Brooks et al., 2005) *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista responsable de una amplia gama de infecciones principalmente nosocomiales (Polotto et al., 2012). *P. aeruginosa* en ocasiones coloniza al ser humano y es el principal microorganismo patógeno humano del grupo. *P. aeruginosa* es invasiva y toxigenica, produce infecciones en pacientes con defensas anormales y es un microorganismo patógeno importante (Geo. F. Brooks et al., 2005).

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria no fermentativa, esto quiere decir que tiene requisitos nutricionales mínimos y puede sobrevivir a una gran variedad de superficies y ambientes húmedos o acuosos. *P. aeruginosa* es resistente a

diferentes agentes antimicrobianos debido a sus diferentes clases estructurales ya sea intrínsecamente o a través de la adquisición de determinantes genéticos para la resistencia en el tiempo. La mayoría de los aislados de *P. aeruginosa* son resistentes a ampicilina, amoxicilina, penicilinas antiestafilococcal, cefalosporinas, tetraciclinas, macrólidos, rifampin y cloranfenicol. *P.aeruginosa* es mayormente resistente a ampicilina-sulbactam y trimetoprim-sulfametoxazol (Karlowsky, Jones, Thornsberry, Friedland, & Sahm, 2003).

*Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos nosocomiales globalmente dominantes; ocasiona una alta gama de infecciones, algunas como neumonía o bacteriemia, cuadros que se complican más debido a la resistencia a diversos antibióticos y a su capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia, convirtiéndola en un serio problema de salud pública (Luján Roca, 2014). *P. aeruginosa* genera una amplia variedad de factores de virulencia, la patogénesis de esta bacteria puede ser descrita como multifactorial. Algunos de estos factores son el flagelo, fimbrias, matriz exopolisacárida, toxinas, exoenzimas y biopelículas (Polotto et al., 2012).

*P. aeruginosa* prolifera adecuadamente en temperaturas de 37 a 42 °C su crecimiento a 42 grados ayuda a diferenciarla de otras especies de *Pseudomonas* en el grupo fluorescente. *P. aeruginosa* es oxidasa-positiva, esto quiere decir que no puede fermentar los carbohidratos, pero varias cepas pueden oxidar la glucosa. La identificación de las cepas de *Pseudomonas* se basa en su morfología y en las pruebas de oxidasa ya que presenta un resultado positivo. La diferencia de *P. aeruginosa* con otras *Pseudomonas* se basa en su actividad bioquímica ya que requiere una mayor cantidad de pruebas con diferentes sustratos. Las infecciones con *P. aeruginosa* no deben tratarse a base de un solo fármaco ya que la eficiencia puede ser baja y la bacteria puede desarrollar resistencia con mayor rapidez, para el tratamiento se emplea una penicilina activa contra *P. aeruginosa* (tetraciclina, piperacilina) en combinación con un aminoglucósido que suele ser tobramicina. Algunos otros fármacos incluyen

aztreonam, imipenem y las quinolonas más recientes, incluso se puede añadir ciprofloxacina (Geo. F. Brooks et al., 2005). Contra *P. aeruginosa* existe un fuerte argumento para el uso de meropenem en lugar de algunos  $\beta$ -lactamos, debido al desarrollo de resistencia (Livermore, 2002). Los patrones de susceptibilidad de la *P. aeruginosa* varían según la región geográfica y deben de emplearse pruebas de susceptibilidad para ayudar a seleccionar la terapéutica antimicrobiana. *P. aeruginosa* es principalmente un patógeno nosocomial y los métodos para controlar las infecciones son similares a los de otros patógenos nosocomiales, ya que *Pseudomonas* prolifera en ambientes húmedos. para controlar al patógeno se debe presentar especial atención a vertederos, tinas de baño, regaderas, tuberías de agua caliente y otras áreas húmedas. Las cepas pueden tipificarse mediante piocinas y por inmunotipos lipopolisacáridos.(Geo. F. Brooks et al., 2005).

*P. aeruginosa* presenta resistencia adquirida a  $\beta$ -lactamos lo que la hace uno de los objetivos más importantes para los tratamientos antimicrobianos ya que es responsable de un incremento en los índices de mortalidad y añadido al costo del tratamiento, *Pseudomonas* presenta determinantes de resistencia los cuales son las  $\beta$ -lactamasas de clase A y B lo que hace que presente un gran impacto en el área clínica. Las metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL) representan el principal mecanismo adquirido de resistencia a los betalactámicos en *P. aeruginosa*, estas enzimas hidrolizan a la mayoría de los medicamentos betalactámicos y ponen en riesgo la utilidad clínica de los carbapenems, estos son los agentes más potentes para tratar las infecciones causadas por cepas que presentan multirresistencia a múltiples fármacos. Con la aparición de las enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) se han convertido en un problema grave para la salud pública ya que estas enzimas aportan resistencia a todas las cefalosporinas y afectan la eficacia de compromiso de ceftazidima, un régimen antibiótico importante para el tratamiento de *P. aeruginosa* (Polotto et al., 2012).

Las mutaciones de topoisomerasas II y IV aportan resistencia a fluoroquinolonas con mayor facilidad a *P. aeruginosa* que a cualquier otra enterobacteria, debido a que *P. aeruginosa* tiene una susceptibilidad inherente, al bajar la ampC- $\beta$  lactamasa cromosómica esta reduce la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a las penicilinas y las cefalosporinas. Múltiples mutaciones aportan multirresistencia a fármacos ya que una sola mutación por sí sola no compromete a todos los fármacos, sin embargo, el aumento considerable de estas puede comprometer la eficacia de las fluoroquinolonas y a la mayoría de los  $\beta$ -lactamos, dejando a los aminoglucósidos e imipenem. Cada una de las mutaciones que surge en una célula está en un rango de  $10^7$  a  $10^9$ , la emergencia secuencial de estas mutaciones son las infecciones resistentes a los primeros antibióticos que se administran, lo que lleva a una segunda administración de antibiótico, esto dificulta la expresión de las enzimas necesarias para llevar a cabo el tratamiento a bacterias que presentan resistencia (Livermore, 2002).

### **1.1.2 Importancia Clínica**

La infección nosocomial es una infección relacionada con un hospital o una institución de salud. A medida que han transcurrido los años, se observa el carácter cambiante y creciente de infecciones nosocomiales. Si los primeros hospitales conocieron las grandes infecciones epidémicas, todas causadas por gérmenes comunitarios y que provenían de un desconocimiento completo de las medidas de higiene, las infecciones nosocomiales han aportado el aumento de número de servicios médicos, la aplicación de agentes antimicrobianos cada vez más potentes, así como el uso excesivo de fármacos inmunosupresores, ha hecho más difícil el control de las infecciones (Hernández, 2002). Las infecciones nosocomiales constituyen un problema importante para la salud a nivel mundial (*WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*, 2001).

Afectan a las instituciones hospitalarias y resultan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. Las infecciones nosocomiales son una medida de

calidad de los servicios prestados, actualmente la eficacia de un hospital no se mide por los índices de mortalidad, sino que se toma en cuenta el índice de infecciones hospitalarias (Hernández, 2002).

Las infecciones resistentes a los antibióticos ya se han generalizado en los EE. UU y alrededor del mundo, una encuesta realizada por IDSA encontró que más del 60% de los participantes habían sido diagnosticados con alguna bacteria que presentaba resistencia. Muchas organizaciones de salud pública han descrito a las bacterias que presentan resistencia como una crisis que podría tener consecuencias graves; en 2014 la Organización Mundial de la Salud advirtió que la crisis de la resistencia a antibióticos se vuelve cada vez más grave. Las bacterias MDR han sido declaradas una amenaza importante para la salud pública. Los patógenos gramnegativos son particularmente preocupantes porque se están volviendo cada vez más resistentes a todos los antibióticos disponibles, las infecciones gramnegativas más graves ocurren en entornos de atención médica y son causados con mayor frecuencia por *Enterobacteriae*, *Pseudomonas* y *Acinetobacter* (Ventola, 2015).

*Pseudomonas aeruginosa* es una causa común de infecciones intrahospitalarias, incluidas neumonía y flujo sanguíneo, tracto urinario e infecciones en el sitio quirúrgico, más de 6,000 (13%) de las 51,000 infecciones por *P. aeruginosa* asociadas a la atención médica cada año. Aproximadamente 400 muertes por año se atribuyen a estas infecciones. Se ha demostrado que algunas cepas de *P. aeruginosa* son resistentes a casi todos los antibióticos, incluidos aminoglucósidos, cefalosporinas, fluoroquinolonas y los carbapenems (Ventola, 2015).

La Organización Mundial de la Salud publicó su primera lista de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos, se elaboró con la finalidad de desarrollar nuevos antibióticos. En la lista se pone como principal amenaza las bacterias gramnegativas resistentes a múltiples antibióticos. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en

hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre las bacterias se incluyen *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (OMS 2017). Ocasionalmente *P. aeruginosa* puede colonizar partes del cuerpo humano, sin embargo, la prevalencia de esta colonización en personas saludables es baja (casi todos los casos clínicos de infección existen relación con las defensas del hospedero). Las infecciones ocasionadas por este patógeno están relacionadas con el ambiente hospitalario. En los pacientes adultos con bronquiectasias *P. aeruginosa* es uno de los patógenos más frecuentemente aislados con efectos negativos con cuanto a la morbimortalidad y a la calidad de vida de los pacientes. La presencia de *P. aeruginosa* está asociada con una mayor producción de esputo, mayor extensión de la bronquiectasias y mayor frecuencia de hospitalizaciones (Luján Roca, 2014).

*P. aeruginosa* produce infecciones en heridas y quemaduras, formando una característica pus de color azul verdoso; cuando esta se produce por una punción lumbar esta causa meningitis, e infecciones del aparato urinario cuando se introduce la bacteria por catéteres, instrumentos o soluciones irrigantes. La afección del aparato respiratorio, en especial en aparatos respiradores contaminados, produce neumonía necrosante. En pacientes diabéticos puede causar otitis externa invasora. En lactantes o personas debilitadas, *P. aeruginosa* puede invadir el torrente sanguíneo y causar septicemia mortal: esto se puede observar con mayor frecuencia en pacientes que presentan leucemia o linfoma a quienes se administran antineoplásicos o radioterapia, y en pacientes con quemaduras graves. En la mayoría de los casos de infecciones por *P.aeruginosa* los síntomas son inespecíficos y suelen relacionarse con el órgano afectado (Geo. F. Brooks et al., 2005).

Al realizar el análisis y diagnóstico de laboratorio deben de recolectarse muestras de lesiones cutáneas, pus, orina, sangre, líquido cefalorraquídeo, esputo y otros

materiales según el tipo de infección, al realizar el frotis con frecuencia se pueden observar bacilos gram negativos. No presentan características morfológicas específicas para poder diferenciar *Pseudomonas* de bacilos entéricos u otros bacilos gram negativos en las muestras. Para poder diferenciar las muestras se utilizan medios diferenciales que comúnmente se utilizan para crecer bacilos entéricos gramnegativos; las *Pseudomonas* proliferan con facilidad en la mayor parte de estos medios (Geo. F. Brooks et al., 2005).

Para el establecimiento de una terapia antimicrobiana, evaluación y control de propagación de *P. aeruginosa* resistente a antibióticos, es cada vez más importante conocer su estructura molecular y la vigilancia de los genes de resistencia. Sin embargo los datos epidemiológicos que informan la prevalencia de MBL y ESBL que producen *P. aeruginosa* son escasos, debido a la falta de métodos estandarizados para la detección fenotípica de la producción de estas enzimas y lo difícil que es implementar métodos basados en PCR realizados en laboratorios clínicos, para contrarrestar la dificultad de implementar PCR, se están desarrollando pruebas moleculares más eficientes comerciales que identifican patógenos y la presencia de determinantes genéticos que muestran la resistencia antimicrobiana, estos métodos pueden mejorar la capacidad de los laboratorios de proporcionar resultados más precisos y rápidos que ayudan a tratar a los pacientes (Polotto et al., 2012).

## 1.2 Reuterina

La producción de reuterina, el sistema de cocultivo que contiene células de *L. reuteri* y *E. coli* produjo reuterina en concentraciones de aproximadamente 100 unidades  $mL^{-1}$ . Las fermentaciones de *L. reuteri* de control produjeron suficiente reuterina en ausencia de clorhidrato de semicarbazida para poder inhibir las células productoras, y la reintroducción de glicerol con la posterior incubación no produjo fermentaciones de glicerol agregado. La producción de reuterina no es afectada por la presencia de glucosa cuando las concentraciones de glicerol 100 mM, mientras que niveles más bajos de glicerol, disminuyeron ligeramente la producción de reuterina, la producción de reuterina alcanzó un máximo después de una incubación de aproximadamente 2 horas las células de *L. reuteri* se suspendieron a concentraciones de 2.5 y 4.5 mg de células en glicerol 200 mM y se incubaron. Las células extraídas de los sistemas de producción después de este tiempo no eran variables, lo que indica que la reuterina había matado a los organismos productores. La reuterina expuesta a pH 11 se degradó inmediatamente y no se pudo recuperar ajustando a pH 5, lo que indicó una degradación irreversible de las moléculas de reuterina tras la exposición de un medio alcalino; se encontró que la producción de reuterina se inhibe mediante la adición de clorhidrato de semicarbazida neutralizado a las mezclas de reacción. La semicarbazida se compleja con un intermediario que es 3-hidroxi propionaldehído, este proceso explica la inhibición de la síntesis de reuterina por parte de la semicarbazida, cabe mencionar que el 3-hidroxi propionaldehído puede ser un precursor de la reuterina (Axelsson 1989).

Se encontró que la producción de reuterina llegó a su máximo aumento después de 2 horas de incubación a 37 grados centígrados; ya que la producción de reuterina fue acompañada por la producción de PHPA, lo que resultó en la acidificación del sistema de producción, la estabilidad de la reuterina fue examinada en condiciones ácidas y neutras debido a que en estas presentó un mayor incremento en su producción, la reuterina que se obtuvo en el medio neutro tuvo una vida de 2 semanas, mientras que la reuterina incubada en medio

ácido tuvo una vida del doble de tiempo que la reuterina en condiciones neutras. Se descartó el medio básico ya que la exposición a este medio dio lugar a una inactivación inmediata irreversible (Talarico, Casas, Chung, & Dobrogosz<sup>1</sup>, 1854).

### **1.3 Antibióticos**

El manejo de infecciones por microorganismos está documentado desde hace muchos años en Egipto, Grecia y China. La era moderna de los antibióticos inició con el descubrimiento de la ampicilina por Fleming en 1928, desde ese momento los antibióticos han transformado la medicina moderna y han salvado vidas. La penicilina se popularizó para controlar infecciones bacterianas durante la segunda guerra mundial, hacia 1950 se presenta la resistencia a la ampicilina convirtiéndose así en un problema clínico importante para esos años, en respuesta a la aparición de la resistencia a este antibiótico, se descubrieron y desplegaron nuevos antibióticos beta-lactamos para combatir la resistencia que se presentó a la ampicilina. Desafortunadamente, la resistencia se ha observado en casi todos los antibióticos que se habían desarrollado; la utilización de vancomicina para el tratamiento de resistencia comenzó en 1972. Los antibióticos no solo han salvado la vida de personas infectadas, sino que son precursores de avances importantes en el área clínica, estos han prevenido y tratado infecciones que pueden ocurrir en pacientes inmunosuprimidos, que tienen enfermedades crónicas como es la diabetes, enfermedad renal en etapa terminal o artritis reumatoide; o pacientes que han tenido cirugías de alto riesgo, como lo es un trasplante de órganos, reemplazos articulares o alguna cirugía cardíaca los antibióticos también han ayudado a extender la esperanza de vida al cambiar el resultado de infecciones bacterianas (Ventola, 2015). Los antibióticos han tenido un efecto similar en todo el mundo, en los países que están en vías de desarrollo donde el saneamiento sigue siendo deficiente, los antibióticos ayudan a disminuir los índices de mortalidad y morbilidad causadas por las infecciones causadas por

los alimentos y otras infecciones causadas por la pobreza (*WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*, 2001).

### **1.3.1 Resistencia**

En 1945 Alexander Fleming tras la aparición de los primeros casos de resistencia a penicilina advirtió sobre la causa de este problema, atribuyendo al uso excesivo de antibióticos, el uso excesivo de antibióticos claramente impulsa la evolución de resistencia. Los estudios epidemiológicos relacionan directamente entre la aparición de cepas de bacterias de resistencia y el abuso de antibióticos.

En bacterias los genes pueden heredarse o adquirirse a través de elementos genéticos móviles como lo son los plásmidos, esta transferencia genética horizontal puede permitir que la resistencia a los antibióticos se transfiera entre las especies bacterianas, cabe mencionar que la resistencia también puede darse por medio de la mutación (Ventola, 2015).

Hay cinco mecanismos de resistencia adquirida que las bacterias pueden utilizar para evadir el ataque con antibióticos: la modificación enzimática o destrucción del antibiótico, este mecanismo el que utilizan algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos, un ejemplo representativo son las betalactamasas, estas enzimas inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula, otro tipo de antibiótico que es inactivado por este tipo de resistencia son los aminoglucósidos, hay tres tipos de modificaciones que inactivan estos medicamentos que son catalizadas por O-fosfatotransferasas, la O-adeniltransferasa, N-acetiltransferasas (Eugenia Cabrera, Fabián Gómez, & Edmundo Zúñiga, 2007; Karlowsky et al., 2003; Livermore, 2002).

Impermeabilidad al antibiótico: esta se da por la diferencia en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial del peptidoglucano; además en las gramnegativas se muestra una membrana que consiste en lipopolisacáridos y lipoproteína que se unen al peptidoglucano, esta membrana se llama porina, *Pseudomonas aeruginosa* se caracteriza por tener poca cantidad de porinas lo

que ayuda a su multirresistencia a los antibióticos. Alteración o producción de nuevos sitios blancos: evita el efecto bactericida y bacteriostático que estimula la resistencia, el ejemplo más común de resistencia a macrólidos en gramnegativas implica la modificación del sitio blanco del ribosoma, la metilación de un residuo de adenina en un dominio V del ARNr 23S. Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico: este mecanismo contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra los agentes antimicrobianos. Este mecanismo puede llegar a disminuir e inclusive a eliminar la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. Sobre expresión del sitio blanco: este mecanismo solo se ha presentado en aislados clínicos de micobacterias, este mecanismo se debe a la duplicación genética o las mutaciones de los promotores que se ven involucrados en la transcripción de estos genes (Eugenia Cabrera et al., 2007; Karlowsky et al., 2003; Livermore, 2002).

Los antibióticos eliminan a los competidores que son susceptibles a los medicamentos, dejando atrás a las bacterias resistentes para que se reproduzcan como resultado de la selección natural. A pesar de la advertencia sobre la resistencia a antibióticos, los antibióticos se siguen recetando en exceso en todo el mundo. Los antibióticos recetados incorrectamente contribuyen a la aparición de bacterias resistentes. Además, el 30% al 60% de los antibióticos prescritos en unidades de cuidados intensivos, se consideran innecesarios ya que son de cuestionables beneficios terapéuticos y pueden exponer a los pacientes a complicaciones durante la terapia. Las concentraciones de antibióticos sub inhibitorios y sub terapéuticos pueden promover el desarrollo de resistencia a los antibióticos al respaldar alteraciones genéticas, como los son los cambios en su expresión, HGT y mutagénesis. Demostrando que niveles bajos de antibióticos contribuyen a la diversificación de cepas como *Pseudomonas aeruginosa*. (Ventola, 2015).

Hoy en día se ha obtenido un gran avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. Como se ha mencionado la

resistencia puede ser una propiedad natural o adquirida a través de los plásmidos o transposones, los genes de resistencia naturales en plásmidos se originan como mutaciones puntuales en los genes blanco de bacterias susceptibles y también de genes que les proveen protección contra otras bacterias. La resistencia intrínseca se ha demostrado para bacterias gramnegativas, esporas bacterianas, micobacterias y bajo ciertas condiciones. Las bacterias gramnegativas por lo general son más resistentes a los desinfectantes y antisépticos que las bacterias grampositivas. Se han realizado estudios con concentraciones mínimas inhibitorias y se ha establecido que hay grandes diferencias significativas entre las bacterias gramnegativas y las grampositivas; *Pseudomonas aeruginosa* es más resistente a agentes antimicrobianos incluyendo clorhexidina. (Eugenia Cabrera et al., 2007).

La membrana externa de las bacterias gramnegativas actúa como barrera que limita la entrada de agentes antibacterianos, las moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular pasan fácilmente a través de las porinas, en cambio las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de la bicapa de la membrana. Se ha descrito una tercera vía para agentes catiónicos como los CAC, son biguanidas y diamidinas, las cuales causan un daño a la membrana y facilitan su captación. Un ejemplo conciso de resistencia mediada por la membrana externa es el caso de *P. aeruginosa* que presenta una diferencia en la composición del lipopolisacárido (LPS) y el contenido de cationes como el magnesio, estos producen enlaces estables entre moléculas de LPS y como un complemento al mecanismo, *P. aeruginosa* posee porinas pequeñas lo que impide el paso por difusión de algunas sustancias. La presencia de un LPS menos ácido en la membrana externa puede ser un punto que contribuye a la resistencia. A parte de la membrana externa se puede presentar la resistencia a través de varios mecanismos como lo son: Transducción: la transferencia de cualquier parte de genoma bacteriano, cuando un fagocito atemperado en la parte de ensamblaje atrapa este material; si la parte del DNA capturada es de procedencia total bacteriana, se denomina transducción generalizada y si solo se atrapa una parte

del genoma bacteriano se le denomina transducción especializada. Conjugación: la conjugación es la transferencia de material genético que se encuentra en plásmidos, se da una transferencia de una bacteria a otra a través de una hebra sexual; los plásmidos contienen genes que le aportan resistencia a antibacterianos, antisépticos y desinfectantes. Transformación: esta es la transferencia de genes de una hebra de DNA desnuda a una bacteria previamente lisada y está la añade a su genoma. Transposición: es el movimiento de un parte del DNA que puede tener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y algunos genes cadete que van unidos para expresión de un promotor particular (Eugenia Cabrera et al., 2007; Livermore, 2002).

## **1.4 Hipótesis**

**La reuterina es eficaz como antimicrobiano para inhibir el crecimiento microbiano de *P. aeruginosa*.**

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo general**

Demostrar la efectividad de reuterina para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de cepas nosocomiales.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Aislar *P. aeruginosa* en un periodo de tiempo establecido de cepas nosocomiales.
- Determinar los perfiles de resistencia de *P. aeruginosa* a antibióticos
- Probar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a reuterina

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Preparación del medio de cultivo.**

Suspender 8 g del medio (caldo nutritivo, MCD LAB Cat. No: 7341) en 1 litro de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer. Calentar con agitación suave sobre una platina (Thermo scientific) o mechero hasta completa disolución del polvo. Dispensar en tubos falcon, tapar y esterilizar en autoclave (Autoclave E-015R) a 121 °C (15 libras de presión) por 15 minutos.

### **2.2 Preparación del inóculo**

En este proceso se tomaron colonias del microorganismo en estudio, obtenidas de un cultivo donde se obtuvo el aislamiento previo del microorganismo. No se utilizaron cultivos de más de 24 horas. Las colonias se transfirieron, tocando la parte superior de cada una con un asa bacteriológica a un tubo falcón que contenía 5 mL de caldo estéril. Se incubó a 35 °C. por un tiempo de 24 horas en una incubadora (GENERAL PURPOSE INCUBATOR, SHELDON MANUFACTURING, INC) hasta que se produjo un crecimiento moderado. Esto se diluyó en caldo estéril hasta que se obtuvo una turbidez cercana a 0.6 de la escala de Mc Farland esto se midió en un espectrofotómetro (UNICO modelo 1000) los valores nos indican que había aproximadamente 108 microorganismos viables por mililitro. Después se transfirieron a tubos Eppendorf en relación 1:1 con glicerol al 30%.

### **2.3 Siembra de muestra.**

En cuanto a la siembra de la muestra se tomó una alícuota de la suspensión diluida del microorganismo. Posteriormente, se colocó la alícuota en un tubo falcón con caldo nutritivo. Se hizo la siembra tratando de evitar contaminaciones con agentes externos.

### **2.4 Determinación de los perfiles de resistencia**

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con un dispensador o con pinzas estériles; se presionaron ligeramente sobre la superficie del agar para así asegurar un contacto uniforme. Para evitar que las zonas de inhibición queden juntas. Se colocaron los antibióticos que generan un halo de inhibición grande en la parte externa y aquellos que producen un halo pequeño en la parte central.

## **2.5 Concentraciones mínimas inhibitorias de reuterina sobre *P. aeruginosa***

Se colocaron 150 µl del medio de cultivo en cada uno de los pozos de la placa a emplear con una micropipeta (TopPette Pipettor PRO1004006).. Después se colocaron 150 µl de la solución madre de reuterina a diferentes concentraciones, 4, 5, 6, 7 y 8 mM, dejando un pozo como control de crecimiento negativo y otro pozo como control de crecimiento positivo. El control de crecimiento positivo tiene medio de cultivo más el inóculo bacteriano y el control negativo tiene el medio de cultivo y agua esterilizada inyectable para un volumen de 300 µl en cada pozo. En los primeros pozos se colocaron 150 µl de las disoluciones de reuterina haciendo 3 repeticiones de cada concentración utilizada. Por último, se colocaron 150 µl del inóculo bacteriano estandarizado para lograr un volumen total de 300 µl por pozo. La placa se incubó a 35 °C por 18 a 24 horas, cubierta, con la tapa de la placa. Una vez transcurrido el tiempo se leyó la placa en un lector de placas de ELISA.

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1 Determinación de sensibilidad y resistencia de las cepas *Pseudomonas 1*, *pseudomonas 2* y *Pseudomonas 3*

*Pseudomonas aeruginosa* es capaz de desarrollar múltiples mecanismos de resistencia lo que la convierte en una bacteria de gran relevancia ya que estos mecanismos afectan directamente a varios antimicrobianos o antibióticos de uso común para el control de estas bacterias como lo son carbencilinas, penicilinas, ampicilinas, etc. Para determinar la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* se realizó un antibiograma con 12 antibióticos de uso común en el control de infecciones por bacterias. En el cuadro 1 se presenta la sensibilidad o resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* donde solo una de las cepas, la numero 3, fue resistente a 8 de los 12 antibióticos probados, de esta manera comprobando la capacidad de las bacterias de adquirir genes de resistencia a los antibióticos.

**Cuadro I.** Antibiograma de las cepas *Pseudomonosa 1*, *pseudomonas 2* y *Pseudmonas 3*

| Antibiótico    | <i>Pseudomonas 1</i> | <i>Pseudomonas 2</i> | <i>Pseudomonas 3</i> |
|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Amikacina      | sensible             | sensible             | resistencia          |
| Aztreonam      | sensible             | no probado           | no probado           |
| Ceftazidina    | sensible             | sensible             | no probado           |
| Ciprofloxacina | sensible             | sensible             | resistencia          |
| Cefepima       | no probado           | no probado           | resistencia          |
| Gentamicina    | no probado           | sensible             | resistencia          |
| Imipinem       | sensible             | sensible             | resistencia          |
| Levofloxacina  | sensible             | sensible             | resistencia          |
| Meropenem      | sensible             | sensible             | resistencia          |
| Pip/Tazo       | sensible             | sensible             | sensible             |
| Piperencilina  | sensible             | no probado           | sensible             |
| Tobramicina    | sensible             | sensible             | resistencia          |

**Cuadro 1.** Determinación de la sensibilidad y resistencia de diferentes muestras de *Pseudomonas* a los antibióticos utilizados para el análisis

se esperaba el patrón de resistencia a diferentes fármacos que presenta *P.aeruginosa* ya que las cepas resistentes a carbapenems exhiben una resistencia a los  $\beta$ -lactamos y usualmente se presenta un fenotipo de resistencia a otros fármacos como los aminoglucósidos (Polotto et al., 2012).

### 3.2 Análisis de la concentración mínima inhibitoria de *Pseudomonas 1*, *pseudomonas 2* y *Pseudomonas 3* al tratamiento con reuterina.

El análisis de inhibición de reuterina se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos, en el cual se manejaron diferentes concentraciones de reuterina para determinar la concentración mínima inhibitoria de la reuterina en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. La determinación de la inhibición se observa conforme se aclara el cultivo y se reduce la turbidez en el pozo; como se observa en las Figura 1 a) de la cepa *P1*. En la Figura 1 b) se observa la reducción del tamaño de la pastilla, conforme aumenta la concentración de reuterina lo que da como indicativo que la inhibición se está dando. Esta cepa presento una concentración mínima inhibitoria en la concentración de 4mM de reuterina.

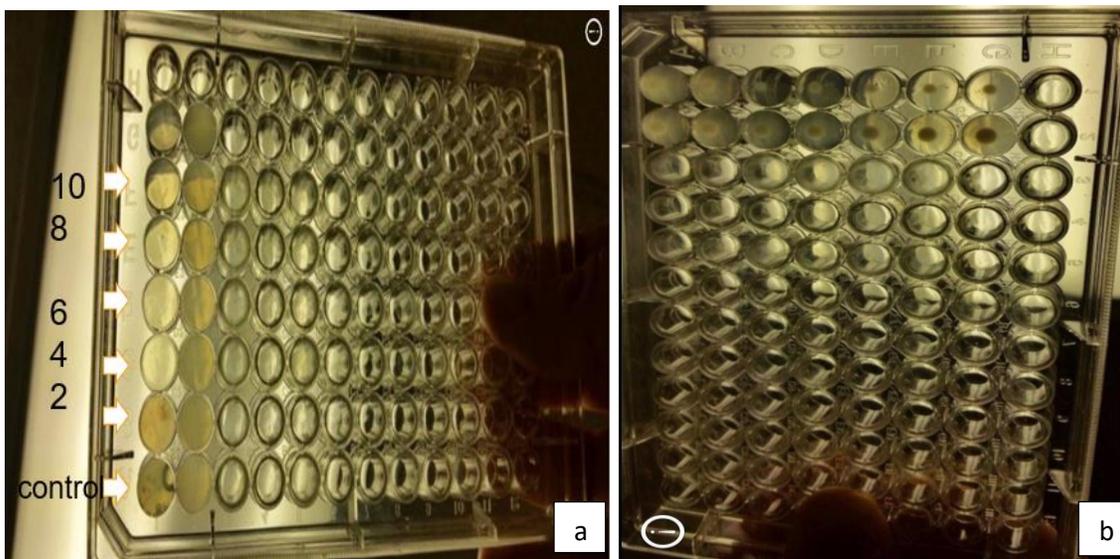


Figura 1.- Susceptibilidad de la cepa numero 1 a las concentraciones de reuterina.

El comportamiento de las demás cepas fue similar al número 1 como se observa en el cuadro 2 donde se observa que la inhibición se presentó en la concentración de 4 mM



Figura 2.- inhibición de las 5 cepas *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones de reuterina.

Para el análisis de inhibición como se observa en el cuadro 2 se utilizaron distintas concentraciones de reuterina 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40 para tener un rango mayor ya que cada cepa presenta una resistencia diferente en cada caso. La concentración mínima inhibitoria se observó en la concentración 4 mM a partir de ahí las demás concentraciones son bactericidas ya que se observa que no hay crecimiento de ningún tipo en la microplaca. Como menciona (Ortiz-Rivera et al., 2017) cada patógeno tiene variación en la susceptibilidad a reuterina, esto debido a sus características morfológicas, bacterias como *E. Coli*, *Shigella* y *Vibrio Cholera* que son bacterias gram negativas, presentan una inhibición del 95% de crecimiento en una concentración de 10mM de reuterina. En general, las bacterias gram negativas muestran una mayor susceptibilidad a la reuterina que las bacterias gram positivas como *S. Aureus* y *L. Monocytogenes* según (Arqués

et al., 2004) esto nos indica directamente que *P. aeruginosa* es inhibida de manera eficaz con reuterina. A pesar de saber que la reuterina es eficaz en el control de bacterias gram negativas, el mecanismo de inhibición de la reuterina sobre los microorganismos aun no es completamente descrito, se habla de la importancia de los grupos hidroxilo y aldehído en la reuterina ya que estos pudieran reaccionar a los grupos sulfamida de ribonucleótido reductasa y tioredoxina, inactivando proteínas y moléculas que contienen estos grupos (Vollenweider, Evers, Zurbriggen, & Lacroix, 2010). De igual forma la inhibición se puede deber según (Talarico et al., 1854) al parentesco estructural de la reuterina a la ribosa, llevando al deterioro de la síntesis de ADN a través de una competencia con ribonucleótidos en el sitio de reconocimiento de la ribosa.

**Cuadro II.** Concentración mínima inhibitoria

| Concentraciones mM | cepas                           |                      |                      |
|--------------------|---------------------------------|----------------------|----------------------|
|                    | <i>Pseudomonas 1</i>            | <i>Pseudomonas 2</i> | <i>Pseudomonas 3</i> |
| 2                  | no inhibió                      | no inhibió           | no inhibió           |
| 4                  | concentracion minima ihibitoria |                      |                      |

**Cuadro 2.** Concentración a la cual la reuterina logro inhibir el crecimiento bacteriano de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

los probióticos pueden suprimir la proliferación y virulencia de patógenos bacterianos por diferentes mecanismos, estas características pueden ofrecer más alternativas terapéuticas en la era de las bacterias multirresistentes (Spinler et al., 2008).

### **3.4 Conclusiones**

El análisis de resistencia a los antibióticos como  $\beta$ -lactamos y aminoglucósidos resulto positivo al identificar a que antibiótico la bacteria es capaz de desarrollar resistencia o mostrar sensibilidad al antibiótico. De igual forma al realizar el análisis de la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a reuterina se obtuvo un resultado positivo dando como resultado que la reuterina es eficaz como antimicrobiano para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 4mM.

### **3.5 Recomendaciones**

Como recomendación sería conveniente para futuras investigaciones sobre la resistencia bacteriana realizar la prueba con los antibióticos de manera manual ya que nos daría un punto de partida para analizar posteriormente los resultados dados por la computadora y saber si concuerdan unos con otros, sería un apoyo visual importante. Así mismo se recomienda plantear otro tipo de estrategias por si el experimento no sucede de la manera esperada de esta manera se llevarían a cabo los diferentes experimentos al mismo tiempo y se optimizaría el tiempo.

## LITERATURA CITADA

- Arequés, Juan L. «Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens .» *ScienceDirect* , 2004 : 5.
- Axelsson, L. T. «Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri* .» *Microbial Ecology in Health Disease* , 1989: 6.
- Bertolesi G, Hehr C, McFarlane S. «Wiring the retinal circuits activated by light during early development .» *Neural development* , 2014: 17.
- Cabrera, Cristina Eugenia, Rommel Fabián Gómez, y Andrés Edmundo Zúñiga. «La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación.» *Colombia Medica*, 2007: 11.
- Casas, Ivan A. «Validation of the Probiotic Concept: *Lactobacillus reuteri* Confers Broad-spectrum Protection against Disease in Humans and Animals. .» *Microbial Ecology in Health and Disease* , 2000: 45.
- Chen, Chiun-Nan. «Feasibility study using a natural compound (reuterin) produced by *Lactobacillus reuteri* in sterilizing and crosslinking biological tissues.» *National Tsing Hua University*, 2001: 10.
- CHUNG, T. C. «In Vitro Studies on Reuterin Synthesis by *Lactobacillus reuteri* .» *MICROBIAL ECOLOGY IN HEALTH AND DISEASE* , 1989: 8.
- Cleusix, Valentine. «Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* against intestinal bacteria .» *BMC Microbiology* , 2007 : 9.
- Cuenca, Maria del Socorro Ramirez. *Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradas de alimentos.* Tesis , Hidalgo: Universidad autónoma del estado de Hidalgo , 2005.

- Dale, Purves; Agustine, George J; Fitzpatrick, David; Katz, Lawrence; LaMantia, Anthony; McNamara, James; Williams, Mark. *Neuroscience*. Sunderland, USA: sinauer associates , 2004.
- DM, Livermore. «Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare?» *OXFORD ACADEMIC*, 2001 .
- Grimsrud, Paul A. «Oxidative Stress and Covalent Modification of Protein with Bioactive Aldehydes.» *JBC*, 2008: 6.
- Hernandez, Rafael Nodarse. «Vision actualizada de las infecciones intrahospitalarias.» *Cubana Med Milit*, 2002: 8.
- James A. Karlowsky, Mark E. Jones, Clyde Thornsberry, Ian R. Friedland, and Daniel F. Sahm. «Trends in Antimicrobial Susceptibilities among Enterobacteriaceae.» *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 2003: 9.
- Kerner, Michel J. *Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in Escherichia coli*. articulo , Germany : departament of cellular biochemistry Max planck , 2005.
- Kolb, Helga. *The organization of the retina and visual system* . 8 de Octubre de 2011. (último acceso: Septiembre de 2014).
- . *Webvision*. 25 de June de 2012. (último acceso: september de 2014).
- kotka, karla. «los pelos de colores.» *moxeate*, 2012: 52-54,65.
- Lei YC, Wang HB, Sun ZY, Shen ZY. «Susceptibility of 570 *Pseudomonas aeruginosa* strains to 11 antimicrobial agents and the mechanism of its resistance to fluoroquinolones.» *Tongji Medical College*, 2003.
- Levin AS1, Barone AA, Penço J, Santos MV, Marinho IS, Arruda EA, Manrique EI, Costa SF. «Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections

- caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*.» *Hospital Infection Control Department*, 1999.
- Liang, Hsiang-Fa. «Natural Antimicrobial Agent (Reuterin) Produced by *Lactobacillus reuteri* for Sanitization of Biological Tissues Inoculated With *Pseudomonas aeruginosa*.» *Wiley InterScience* , 2003: 7.
- Lina M. Villa, Jorge A. Cortés, Aura L. Leal. «*Pseudomonas aeruginosa* resistente a antimicrobianos en hospitales colombianos.» *Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia*, 2012: 6.
- Livermore, D.M. «The need for new antibiotics .» *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2004: 9.
- Mas, Carles Soriano. *Fundamentos de Neurociencia* . Editorial UOC, 2007 .
- Milena Polotto, Tiago Casella,. «Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital .» *BMC Infectious Diseases* , 2012: 8.
- OMS. *Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. comunicado de prensa , Ginebra: Organización Mundial de la Salud , 2017.
- Palczewski, Krzysztof. «Chemistry and biology of vision .» *Journal of biological chemistry* , 2011: 1612-1618.
- Pulido, José S. *Retina, coroides y vítreo. Los requisitos en oftalmología*. . Madrid, España: Elsevier Science, 2003.
- Rasch, Maria. «the effect of reuterin on the lag time of single cells of *listeria innocua* grown on a solid agar surface at different pH an NaCl concentrations.» *ScienceDirect* , 2007: 6.
- rodríguez, Santiago, y José Smith . *Anatomía de los órganos del lenguaje, visión y audición*. Madrid : Medica Panamericana , 2003.

Salceda, Rocío. «Diferenciación de la retina de los vertebrados: Mecanismos celulares y moleculares.» *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat*, 1998: 115-118.

WHO. *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. World, Health Organization, 2001.

Eugenia Cabrera, C., Fabián Gómez, R., & Edmundo Zúñiga, A. (2007). *La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación*. *Colomb Med* (Vol. 38). Abril-Junio.

Geo. F. Brooks, M., Janet S. Butel, P., & Stephen A. Morse, P. (2005). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. (D. M. M. Moreno, Ed.). Mexico D.F: El Manual Moderno, S.A de C.V. Retrieved from file:///C:/Users/zamii/Desktop/tesis/Geo F. Brooks, Janet S. Butel - Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (2005, Manual Moderno).pdf

Hernández, R. N. (2002). Visión actualizada de las infecciones intrahospitalarias. *Revista Cubana de Medicina Militar*.