

1 Título: Evaluación del efecto antimicrobiano de la reuterina en bacterias
2 multirresistentes aisladas de hospital
3 Title: Evaluation of the antimicrobial effect of reuterin in multiresistant bacteria isolated
4 from hospital

5 Título breve: Reuterina contra bacterias nosocomiales multirresistentes

6

7 Autores:

8 Ortiz-Rivera Yuridia ^{1*}, Doctora en Ciencias

9 Aboites-Quiriarte Diana Laura¹, Licenciada en Química

10 Romero-Córdova Samuel Ivan¹, Licenciado en Química

11 Suarez-López Eduardo¹, Estudiante de la Licenciatura en Biotecnología

12

13 ¹ Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Instituto de Ciencias Biomédicas

14 Av. Benjamín Franklin # 4650, Zona PRONAF alfa

15 Ciudad Juárez, Chihuahua, México C.P. 32315

16 *Autor responsable de correspondencia

17 Teléfono: +52 656 688 1800

18 Dirección electrónica: yuridia.ortiz@uacj.mx

19

20

21

22

23

Resumen

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

Objetivo: Evaluar el efecto antimicrobiano de la reuterina contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*. **Material y métodos:** Se realizaron antibiogramas a cepas recolectadas de un hospital de segundo nivel en Ciudad Juárez para determinar resistencia a reuterina. **Resultados:** La reuterina inhibió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a concentración de 4 mM y *Klebsiella pneumoniae* no fue inhibida por la concentración más alta probada (40 mM), probablemente por la capsula. **Conclusión:** La reuterina puede ser una opción viable para el control de bacterias multirresistentes.

Palabras clave: Farmacorresistencia Bacteriana Múltiple, Antibacterianos, *Lactobacillus reuteri*, Probióticos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

46 **Title:** Evaluation of the antimicrobial effect of reuterin in multiresistant bacteria isolated
47 from hospital

48

49 Abstract

50

51 **Objective:** To evaluate the antimicrobial effect of reuterin against *Pseudomonas*
52 *aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. **Material and methods:** Bacterial strains were
53 recollected from a second level hospital in Ciudad Juarez, antibiograms tests were
54 performed to determine resistance to Reuterin. **Results:** Reuterin inhibited growth of
55 *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 4mM and *Klebsiella pneumoniae* was not
56 inhibited by the highest concentration tested (40mM), probably due to the capsule.

57 **Conclusion:** Reuterin can be a feasible option for the control of multiresistant bacteria.

58

59 **Keywords:** Multiple Bacterial Drug Resistance, Anti-Bacterial Agents, *Lactobacillus*
60 *reuteri*, Probiotics, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*

61

62

63

64

65

66

67

68

69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91

1. Introducción

La resistencia antimicrobiana es actualmente el problema más alarmante para la salud humana. Provoca 700.000 muertes/año y se estima que después de 2050 ocurrirán 10 millones de muertes anuales por esta causa.¹ Las bacterias resistentes de mayor importancia según la Organización Mundial de la Salud (OMS) son: *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Serratia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Sreptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella*, entre otras.² *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* son importantes patógenos multirresistentes causantes de enfermedades nosocomiales, *Pseudomonas aeruginosa* es un oportunista responsable de un gran número de infecciones invasivas, además es capaz de sobrevivir en una gran variedad de superficies, ambientes acuosos y no tiene requerimientos nutricionales exigentes.³ Por otra parte, *Klebsiella pneumoniae* es una bacteria con cápsula, lo que favorece su patogenicidad y resistencia a antibióticos, generando su adaptación al ambiente hospitalario.⁴ Estas bacterias han sido capaces de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos por lo que las opciones de tratamiento son limitadas. Una opción aun escasamente explorada es la utilización de probióticos, como *Lactobacillus reuteri* que produce diferentes antimicrobianos como algunas bacteriocinas y reuterina, sustancia antimicrobiana de amplio espectro que inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y protozoos⁵, la reuterina ha sido evaluada en conservación de alimentos, sin embargo, no se ha probado su efectividad para inhibir el crecimiento de bacterias multirresistentes de origen hospitalario.

92

93

2. Material y Métodos

94

95

2.1 Recolección de cepas bacterianas y antibiogramas

96

97 Las cepas fueron colectadas en un hospital de segundo nivel de Ciudad Juárez,
98 Chihuahua, donde se aislaron, identificaron y se evaluó la resistencia a antibióticos
99 mediante antibiogramas.

100

101

2.2 Producción y cuantificación de la reuterina

102

103 La producción de reuterina se llevó a cabo siguiendo un proceso⁶ que consiste en la
104 producción de biomasa de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 en caldo MRS (Man Rogosa
105 and Sharp, Sigma-aldrich®), para posteriormente colectar las células y suspenderlas en
106 solución de glicerol 200 mM. La suspensión se centrifugó para obtener el sobrenadante
107 donde se encontraba la reuterina, que fue cuantificada mediante una reacción
108 colorimétrica y medida por espectrofotometría.⁷

109

110

2.3 Evaluación del efecto antimicrobiano de la reuterina

111

112 Las bacterias fueron sembradas e incubadas a 37 ° C bajo condiciones aeróbicas por 24
113 horas, las células se lavaron y suspendieron en búfer de fosfato de sodio (pH 7.5) hasta
114 alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 595 nm. Esta suspensión fue diluida 1:10 y se

115 mezcló con la reuterina a diferentes concentraciones en la microplaca, se incubo a 37 °
116 C por 24 horas.⁸

117

118 2.4 Análisis estadístico

119

120 Se realizó análisis de varianza con la utilización del programa Infostat (Versión 2018), la
121 diferencia significativa entre medias fue establecida en $\alpha=0.05$ usando pruebas de Tukey.
122 Todos los experimentos fueron hechos por triplicado.

123

124 3. Resultados

125

126 3.1 Aislamiento de cepas y antibiogramas

127

128 En un periodo de 6 meses, se lograron aislar 5 cepas de *Klebsiella pneumoniae* y 3 cepas
129 de *Pseudomonas aeruginosa*. El 60% de las cepas de *Klebsiella penumonie* presentaron
130 resistencia a Tetraciclina, Trombamicina y Piperaciclina, además a las combinaciones de
131 Ampicilina con Sulbactam y de Piperaciclina con Tazobactam, el 40% es resistente a
132 Ciprofloxacina y a la combinación de Trimetoprima con Sulfametoxazol y el 20% presentó
133 resistencia a Gentamicina y Levofloxacina. En cuanto a las cepas aisladas de
134 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 resultaron sensibles a los antibióticos probados y una
135 multirresistente (Tabla 1).

136

137 3.2 Producción y susceptibilidad a reuterina

138

139 La concentración de reuterina producida fue $101.54 \text{ mM} \pm 3.48$. *Klebsiella pneumoniae*
140 no fue inhibida por la reuterina, a pesar de ser probada con una concentración máxima
141 de 40 mM. Por otra parte, *Pseudomonas aeruginosa* fue efectivamente inhibida por la
142 reuterina en una concentración de 4 mM (Figura 1).

143

144

4. Discusión

145

146 Una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resultó resistente a casi todos los antibióticos:
147 Ciprofloxacina, Cefepima, Ertapenem, Imipenem, Levofloxacina, Meropenem y
148 Trobamicina, estas cepas multirresistentes representan una gran preocupación y
149 amenaza a la salud por las escasas opciones de tratamiento que existen.⁹

150 Entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, no hubo diferencia significativa ($p \geq 0.05$), lo
151 que significa que la reuterina logro inhibir aun a la cepa multirresistente (P3). Los estudios
152 publicados indican que las bacterias Gram negativas tienen mayor susceptibilidad a la
153 reuterina,⁸ sin embargo, no hay reportes de bacterias de origen nosocomial y
154 multirresistentes.

155 En cuanto a *Klebsiella pneumoniae* que no fue inhibida por reuterina a 40mM, es
156 probable que fuera debido a la presencia de la cápsula de polisacáridos que impide la
157 entrada de esta sustancia a la célula.¹⁰

158

159

5. Conclusiones

160

161 La reuterina resulto eficaz como antimicrobiano para inhibir el crecimiento de
162 *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 4mM, incluso en la cepa
163 multirresistente probada, pero no resultó ser efectiva para inhibir el crecimiento de
164 *Klebsiella pneumoniae*, probablemente porque posee cápsula, que puede estar
165 confiriendo protección y resistencia a antibióticos incluida la reuterina. Finalmente, la
166 reuterina puede ser una opción viable para el control de bacterias multirresistentes al ser
167 una sustancia cuya síntesis es fácil y económica.

168

169 6. Agradecimientos

170

171 Los autores agradecen al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por
172 el apoyo para la síntesis y cuantificación de la reuterina.

173

174 7. Referencias

175

176 1. Tagliabue A, Rappuoli R. Changing priorities in vaccinology: antibiotic resistance
177 moving to the top. Front Immunol [serie en internet] 2018 [consultado 2020 septiembre
178 18];9:[1-8]. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01068>.

179

180 2. World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics
181 are urgently needed [Internet]. Ginebra: World Health Organization, 2017- [Consultado
182 2020 septiembre 19]. Disponible en: [https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-
183 who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed) .

184

185 3. Polotto M, Casella T, de Lucca-Oliveira MG, Rubio FG, Nogueira ML, de Almeida MT,
186 *et al.* Detection of *Pseudomonas aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and
187 blaGES-5, blaIMP-1 and blaSPM-1 causing infections in brazilian tertiary-care hospital.
188 BMC Infect Dis 2012 [consultado 2020 septiembre 19];176:[8]. Disponible en:
189 <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/12/176> .

190

191 4. Tan YH, Chen Y, Chu WH, Sham L, Gan YH. Cell envelope defects of different capsule-
192 null mutants in K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* can affect bacterial pathogenesis.
193 Mol Microbiol 2020;113:889-905

194

195 5. Casas IA, Dobrogisz WJ. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri*
196 confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals.
197 Microb Ecol Health Dis 2000;12:247-285

198

199 6. Doleyres Y, Beck P, Vollenweider S, Lacroix C. Production of 3-
200 hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobcillus reuteri*. Appl
201 Microbiol Biotechnol 2005;68:467-4724

202

203 7. Circle SJ, Stone L, Boruff CS. Acrolein determination by means of tryptophane a
204 colorimetric method. Ind Eng Chem Anal Ed 1945;17:259-262

205

- 206 8. Arques JL, Fernandez J, Gaya P, Nuñez M, Rodriguez E, Medina M. Antimicrobial
207 activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens. Int J Food
208 Microbiol 2004;95:225-229
209
- 210 9. O'Donnell JN, Bidell MR, Lodise TP. Approach to the treatment of patients with serious
211 multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Pharmacotherapy 2020;40:952-
212 969
- 213 10. Valdiviezo-Ayala SB. Análisis de la estructura de covarianza de los indicadores
214 relacionados con la salud en los ancianos en el hogar con un enfoque en la salud
215 subjetiva. Duke Law J 2019;1:1-13
216