

Evaluación del efecto antimicrobiano de la reuterina en bacterias
multirresistentes aisladas de hospital

Tipo de financiamiento

Sin financiamiento

Autores del reporte técnico:

Yuridia Ortiz-Rivera
Diana Laura Aboites Quiarte
Samuel Ivan Romero Cordova
Fabiola Ivonne Ramirez Flores
David Sepúlveda-Ahumada

Resumen del reporte técnico en español

En México hay un número muy limitado de estudios epidemiológicos de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes por lo que el problema de resistencia está muy subestimado en el país; el uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una gran resistencia a los antibióticos disponibles ocasionando que cada vez sean más limitadas las opciones de tratamiento. Estas bacterias generan en el ambiente hospitalario un problema de salud pública; por lo que proponer nuevos métodos de control y evitar su diseminación es de importancia internacional. Una opción que está siendo explorada en la actualidad es utilizar probióticos los cuales producen sustancias capaces de controlar microorganismos patógenos; además no han generado resistencia a estos antimicrobianos naturales. Los *Lactobacillus* son de los probióticos más utilizados; entre los cuales se encuentra *Lactobacillus reuteri* que segrega intermediarios antimicrobianos como la reuterina. En esta investigación se evaluó el efecto antimicrobiano de la reuterina contra cepas de bacterias multirresistentes aisladas de hospital, las bacterias estudiadas fueron *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa* y *Klebsiella pneumoniae* mediante el método de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), en el cual se le agregó diferentes concentraciones de reuterina a las bacterias en una placa de 96 pozos hasta identificar la concentración más baja en la que la reuterina inhibe el crecimiento de estas cepas. Los resultados muestran que la reuterina fue capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* a una concentración de 1.5-2 mM, mientras que el crecimiento de *Pseudomonas aureginosa* fue inhibido por una concentración de 4 mM, por otra parte, el crecimiento de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* no fue inhibido ni por la concentración mas alta probada (44.7 mM) probablemente por la capsula que impide el paso de la reuterina a la célula, sin embargo, estos resultados son muy alentadores porque la reuterina fue capaz de inhibir el crecimiento de bacterias multirresistentes lo que representa una excelente opción de control, debido a que es sintetizada a bajo costo, fácil y rápido además de que se obtienen concentraciones muy superiores a las necesarias para inhibir estas bacterias probadas.

Resumen del reporte técnico en inglés

In Mexico there are a very limited number of epidemiological studies of infections caused by multidrug-resistant bacteria so the resistance problem is greatly underestimated in the country; the indiscriminate use of antibiotics and the selective environmental pressure of antiseptics and disinfectants has generated a great resistance to available antibiotics, causing treatment options to become increasingly limited. These bacteria create a public health problem in the hospital environment; so proposing new methods of control and preventing their dissemination is of international importance. One option that is currently being explored is to use probiotics which produce substances capable of controlling pathogenic microorganisms; they have also not generated resistance to these natural antimicrobials. *Lactobacillus* are one of the most widely used probiotics; among which is *Lactobacillus reuteri* which secretes antimicrobial intermediaries such as reuterine. This research evaluated the antimicrobial effect of reuterine against strains isolated from hospital that are multidrug-resistant bacteria, the bacteria studied were *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa* and *Klebsiella pneumoniae* using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method, in which different concentrations of reuterine were added to the bacteria in a 96-well plaque until identifying the lowest concentration at which reuterine inhibits the growth of these strains. The results show that reuterine was able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* at a concentration of 1.5-2 mM, while the growth of *Pseudomonas aureginosa* was inhibited by a concentration of 4 mM, on the other hand, the growth of *Klebsiella pneumoniae* was not inhibited either by the highest concentration tested (44.7 mM) probably by the capsule that prevents the passage of the reuterine to the cell, however, these results are very encouraging because reuterine was able to inhibit the growth of multidrug-resistant bacteria which represents an excellent control option, because it is synthesized at low cost, easy and fast in addition to obtaining concentrations much higher than those needed to inhibit these tested bacteria.

Palabras clave: resistencia, antibióticos, reuterina, inhibición

Usuarios potenciales

El desarrollo de proyectos de investigación enfocados al desarrollo de nuevas opciones de control de microorganismos multirresistentes tiene el potencial de proporcionar las bases para la creación de nuevas opciones de tratamiento más baratas y menos tóxicas para los pacientes, con la finalidad de disminuir la morbilidad y mortalidad asociadas a estas bacterias.

Reconocimientos

Los autores de este proyecto quieren agradecer al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por el apoyo para realizar este proyecto.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia antimicrobiana es actualmente el problema más alarmante para la salud humana. Provoca 700.000 muertes / año y se estima que cada año después de 2050 ocurrirán 10 millones de muertes por esta causa, por lo cual el desarrollo de antimicrobianos resulta una necesidad prioritaria en la actualidad. 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*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella*, entre otras.

Staphylococcus aureus es una bacteria que posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Aproximadamente, 30% o más de los individuos están constantemente colonizados asintóticamente. La colonización proporciona un reservorio mediante el cual la bacteria puede introducirse cuando las defensas del huésped están dañadas. *S. aureus* es uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones hospitalarias, representando una gran amenaza al

tener un tratamiento difícil de manejar debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos.

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 un 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, 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). Además, *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).

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*), 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 (Quintana, 2019). Debido a la importancia de estas bacterias multirresistentes, resulta indispensable evaluar diferentes opciones de control, la utilización de probióticos es una opción que va adquiriendo popularidad.

Los *Lactobacillus* spp. son importantes probióticos y entre estos *Lactobacillus reuteri* es una bacteria que produce diferentes antimicrobianos como bacteriocinas y reuterina que es una sustancia antimicrobiana eficaz de amplio espectro que inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y protozoos, esta sustancia ha sido evaluada en conservación de alimentos, sin embargo no se ha evaluado su efectividad para inhibir el crecimiento de bacterias multirresistentes de origen hospitalario.

2. PLANTEAMIENTO

Resistencia antimicrobiana

Los antibióticos han ayudado a prolongar la esperanza de vida al cambiar el resultado de las infecciones bacterianas. En 1920, se esperaba que la gente en los Estados Unidos tuviera un promedio de vida de tan solo 56.4 años; ahora, sin embargo, es de casi 80 años. Los antibióticos han tenido efectos beneficiosos similares en todo el mundo (Ventola, 2015). Sin embargo, el uso exitoso de cualquier agente terapéutico se ve comprometido por el posible desarrollo de tolerancia o resistencia a ese compuesto desde el momento en que se emplea por primera vez (Davies & Davies, 2010). Desde su creación millones de toneladas métricas de nuevas clases de antibióticos se han producido en los últimos 60 años. El aumento de la demanda de antibióticos en muchos sectores ha permitido el uso de medicamentos menos costosos y no aprobados. Por el contrario, el uso enorme e irresponsable de los antibióticos, ha contribuido significativamente a la aparición de las cepas resistentes. Los microorganismos resistentes a los antibióticos se conocen como superbacterias y estas no son solo una preocupación de laboratorio sino que se han convertido en una amenaza global responsable de los altos índices de mortalidad e infecciones que amenazan la vida (Zaman et al., 2017). La rápida aparición de bacterias resistentes se está produciendo en todo el mundo, poniendo en peligro la eficacia de los antibióticos, que han transformado la medicina y salvado millones de vidas. Algunas décadas después de que los primeros pacientes fueron tratados con antibióticos, las infecciones bacterianas se volvieron a convertir en una amenaza (Ventola, 2015). Desde fines de la década de 1960 hasta principios de la década de 1980, la industria farmacéutica introdujo muchos antibióticos nuevos para resolver el problema de la resistencia, pero después de eso, los antibióticos comenzaron a agotarse y se introdujeron menos medicamentos nuevos. Esta crisis de resistencia a los antibióticos se ha atribuido al uso excesivo e inadecuado de estos medicamentos, así como a la falta de desarrollo de nuevos medicamentos por parte de la industria farmacéutica. Cuando finalmente se usan nuevos agentes antimicrobianos, la resistencia es casi inevitable. Un fabricante que invierte grandes sumas de dinero en el desarrollo de antibióticos por lo tanto, puede descubrir que los

beneficios se reducen prematuramente cuando se desarrolla resistencia a un nuevo antibiótico. La incertidumbre económica ha tenido un efecto de restricción en los usuarios finales de antibióticos por lo cual el desarrollo de antibióticos ya no se considera una inversión económicamente inteligente para la industria farmacéutica (Ventola, 2015). Además, los microbiólogos y especialistas en enfermedades infecciosas han aconsejado moderación con respecto al uso de antibióticos. Por lo tanto, una vez que se comercializa un nuevo antibiótico, los médicos, en lugar de recetarlo de inmediato, a menudo mantienen este nuevo agente en reserva sólo para los peores casos por temor a promover la resistencia a los medicamentos, y continúan recetando agentes más antiguos que hayan demostrado eficacia comparable. Por lo tanto, los nuevos antibióticos a menudo se tratan como medicamentos de "última línea" para combatir enfermedades graves. Esta práctica conduce a la reducción de la elaboración de nuevos antibióticos y un menor retorno de la inversión (Ventola, 2015).

El costo de la resistencia a los antimicrobianos es inmenso, tanto económico como para la salud y la vida humana. La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) publicó un nuevo informe que predice que 2.4 millones de personas en Europa, América del Norte y Australia morirán por infecciones con microorganismos resistentes en los próximos 30 años y podría costar hasta US \$ 3,5 mil millones de dólares por año. Muchos países de ingresos bajos y medios ya tienen altas tasas de resistencia, que se prevé que aumenten de manera desproporcionada. Por ejemplo, en Brasil, Indonesia y Rusia, 40 a 60% de las infecciones son causadas por microorganismos resistentes, y se pronostica que la resistencia aumentará de 4 a 7 veces más rápido en estos países que en otros países de la OCDE (Hofer, 2018). La resistencia antimicrobiana (AMR) es actualmente el problema más alarmante para la salud humana. La AMR ya provoca 700.000 muertes / año y se estima que cada año después de 2050 ocurrirán 10 millones de muertes por la AMR, más de las 8.2 millones de muertes que causa el cáncer actualmente (Tagliabue & Rappuoli, 2018). 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*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella*, entre otras. Por lo que el

desarrollo de nuevas opciones de control resulta indispensable y urgente a nivel internacional.

Probióticos

Los probióticos se definen por la OMS como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio en la salud al huésped" por lo que el interés de usar los probióticos ha aumentado significativamente en los últimos años principalmente por el aumento de la resistencia a los antibióticos. Los probióticos promueven un cuerpo sano a través de diversos mecanismos. Una generalización que describe mecanismos comunes entre los géneros probióticos estudiados incluye la resistencia a la colonización, la producción de ácido y ácidos grasos de cadena corta (SCFA), la regulación intestinal, la normalización de la microbiota, el aumento del recambio de enterocitos y la exclusión competitiva de patógenos. Aunque no se observa ampliamente, hay muchos efectos entre las especies probióticas específicas, algunas de las cuales son específicas de la cepa. Hay algunos requisitos previos para convertirse en probióticos potenciales: sobrevivir en entornos de pH bajo y enriquecido con enzimas, adherirse al epitelio para la interacción huésped-probiótico y competir con microorganismos patógenos. Los *Lactobacillus* son unos de los probióticos más utilizados y se pueden encontrar en una gran variedad de productos alimenticios en todo el mundo. El género *Lactobacillus* comprende un gran grupo heterogéneo de bacterias anaerobias facultativas, gram positivas, que incluyen *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* y *Lb. reuteri*. (Mu et al., 2018).

Lactobacillus reuteri

Lactobacillus reuteri (*Lb. reuteri*) es una bacteria probiótica bien estudiada que puede colonizar una gran cantidad de mamíferos. En los seres humanos, *Lb. reuteri* se encuentra en diferentes sitios del cuerpo, incluido el tracto gastrointestinal, el tracto urinario, la piel y la leche materna (Mu et al., 2018).

Lactobacillus reuteri y producción de antibióticos

Lactobacillus reuteri es una bacteria heterofermentativa del ácido láctico que puede soportar una amplia variedad de entornos de pH, emplea múltiples mecanismos que le permiten inhibir con éxito los microorganismos patógenos y se ha demostrado que segrega intermediarios antimicrobianos. *Lb. reuteri* produce 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA) a través de la fermentación anaeróbica de glicerol. El 3-HPA es una sustancia antimicrobiana eficaz de amplio espectro que inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y protozoos. Diversos estudios demostraron que la síntesis y la acumulación de 3-HPA tienen lugar en función de diversos factores ambientales y genéticos, como la concentración de biomasa, la edad de las células, la temperatura, el pH, la concentración de glicerol y glucosa, el tiempo de incubación y la presencia de células heterólogas durante la biotransformación del glicerol a 3-HPA (Ortiz-Rivera, 2018). Además de la reuterina, se han determinado varias otras sustancias antimicrobianas, como el ácido láctico, el ácido acético, el etanol y la reuteriicina, con la síntesis de estas sustancias, *Lb. reuteri* ha demostrado ser eficaz contra una variedad de infecciones bacterianas gastrointestinales (Mu et al., 2018).

Reuterina

Algunas cepas de *Lb. reuteri* pueden sintetizar reuterina (3-hidroxi propionaldehído), un agente antimicrobiano de amplio espectro producido durante el metabolismo anaerobio del glicerol. La reuterina tiene potentes efectos antimicrobianos contra bacterias, levaduras, hongos y protozoos (Ortiz-Rivera, et al., 2017). El 3-HPA en solución acuosa se puede dimerizar y/o hidratar de forma reversible, dando lugar a un equilibrio entre las tres formas (3-HPA, HPA-hidrato y HPA dímero), que se conoce como “reuterina o sistema-HPA” (Vollenweider & Lacroix, 2004).

Se han propuesto varias hipótesis sobre posibles mecanismos de acción de la reuterina. Inicialmente se observó que la reuterina su forma dimerica pudiera actuar sobre la síntesis de ADN inhibiendo las enzimas sulfhidrilo implicadas en la actividad de la enzima ribonucleótido reductasa (Talarico & Dobrogosz, 1989). Posteriormente se le atribuyó la acción antimicrobiana de la reuterina al monómero por su capacidad para reaccionar con

los grupos sulfhidrilo de las ribonucleótido reductasas y de las tioredoxinas. (Schauenstein, et al., 1977). Finalmente, se ha demostrado que induce estrés oxidativo en una amplia gama de microorganismos gastrointestinales, ya que modifica el grupo tiol en ensayos *in vitro* (Schaefer y col., 2010).

3. METODOLOGÍA

Producción de reuterina

La producción de reuterina se llevo a cabo siguiendo un proceso de dos pasos descrito por Doleyres et al., (2005). Un stock congelado de una cepa de *Lb. reuteri* ATCC 55730 se inoculo al 1% en caldo MRS (Man Rogosa and Sharp, Agar Sigma-aldrich®) y se incubo (Incubadora VWR 16 International®) a 37°C por 15 h, manteniendo el pH a 5.5 usando NaOH (5M, Alfa Aesar®). Las células fueron recolectadas por centrifugación a 1, 500 x g por 10 minutos a 20 ° C (Centrífuga 5430R Eppendorf®) después de la incubación, se lavaron dos veces con búfer fosfato de potasio (0,1 M, pH 7, Golden Bell Reactivos®). Las células obtenidas del procedimiento anterior fueron suspendidas en solución de glicerol 200 mM e incubadas a 37°C durante 120 min para la producción de reuterina. Para recuperar la reuterina, la suspensión celular se centrifugo a 12,000 x g por 20 min a 4°C para obtener el sobrenadante que es donde se encontraba la reuterina.

Cuantificación de la reuterina

Se realizo una disolución del sobrenadante que se obtuvo en el paso anterior, donde se colocaron 297 µL de agua y 33 µL de reuterina. Posteriormente, se mezclaron 330 µL de la solución filtrada diluida (295 µL de agua y 33 µL reuterina) con 945 µL de HCl concentrado (J.T Baker), 150 µL de etanol al 95% y 75 µL de solución de triptófano. Esta mezcla se incubo a 40°C durante 50 minutos y posteriormente se leeyo la absorbancia a 560 nm mediante espectrofotometria.

Evaluación del efecto antimicrobiano de la reuterina

La evaluación del efecto antimicrobiano de reuterina sobre las bacterias se realizó mediante el método de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC), el cual se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante la noche (JM, 2002). Pasado el tiempo de incubación de la re siembra de cada cepa bacteriana se midió la absorbancia en la cual su densidad óptima debe de ser 0.6 a 595 nm. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 con caldo nutritivo, agregando 5 mL del cultivo (con abs de 0.6) en 4.5 mL de caldo nutritivo (MCD LAB). Después las suspensiones bacterianas se inocularon en una placa de 96 pozos en un medio de crecimiento líquido en presencia de diferentes concentraciones de reuterina. El crecimiento se evaluó después de la incubación durante un periodo de 24 horas.

4. RESULTADOS

Producción y cuantificación de reuterina

La reuterina producida fue cuantificada mediante la técnica colorimétrica de Circle et al. 1945, resultando una producción de 43.32 mM, a partir de esta reuterina obtenida se realizaron diluciones para tener las diferentes concentraciones probadas.

Susceptibilidad de las bacterias a reuterina

Los resultados muestran evidencia que entre más alta era la concentración de reuterina que se le agregó a la bacteria *Staphylococcus aureus* fue disminuyendo su turbidez. Primeramente, se realizó un experimento MIC exploratorio en los cuales se agregaron diferentes concentraciones de reuterina para determinar a partir de cual valor ya no se observa turbidez. Posteriormente, a partir de este resultado se fue disminuyendo la concentración de reuterina para los próximos experimentos. Las concentraciones

seleccionadas fueron 2mM, 4mM, 6mM, 8mM y 10mM y se probaron cinco cepas al azar: C21, G39, C07, G10 y G26.

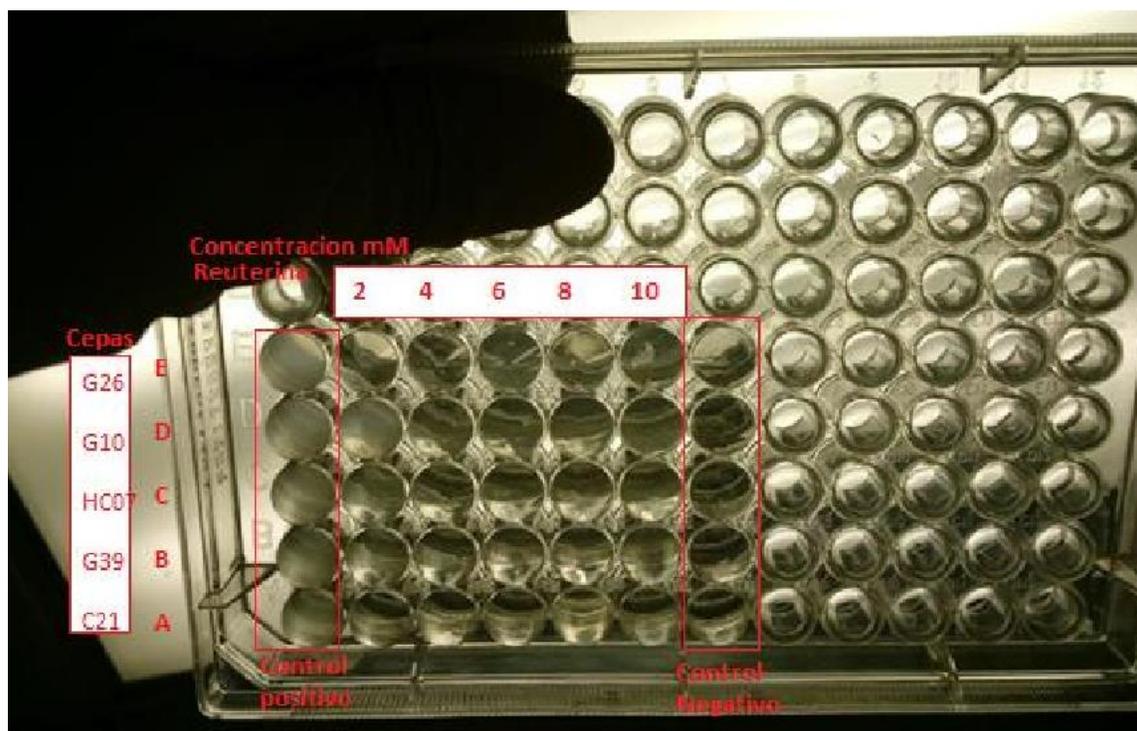


Figura 1. Disminución de turbidez de *Staphylococcus aureus* con diferentes concentraciones de reuterina A (C21) B (G39) C (HC07) D (G10) E (G26) 1(Control positivo agua y bacteria) ,2 (Reuterina 2mM),3 (4mM),4 (6mM),5 (8mM) 6 (10mM) y 7 (Control - caldo y agua inyectable).

En las cepas C21, HC07, G39 y G26 no se observó turbidez a partir de 2 mM y en la cepa G10 a partir de 4 mM, ver Figura 9. Demostrando que la reuterina sí tuvo efecto antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus*, a partir de estos resultados el rango de inhibición de la reuterina contra cepas fue de 2mM a 4mM. Con base en los resultados anteriores se realizó el experimento con las mismas cepas refinando las concentraciones de reuterina haciéndolas más específicas: 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM y 4mM. En el control + solo hay cultivo sin reuterina por lo cual se observa la turbidez del crecimiento de la bacteria mientras que en los pocillos con distintas concentraciones de reuterina se observa la disminución de turbidez, mostrando similitud al control -; en el cual no hay

cultivo, observándose claramente la inhibición de las bacterias a partir de la concentración de 2 mM.

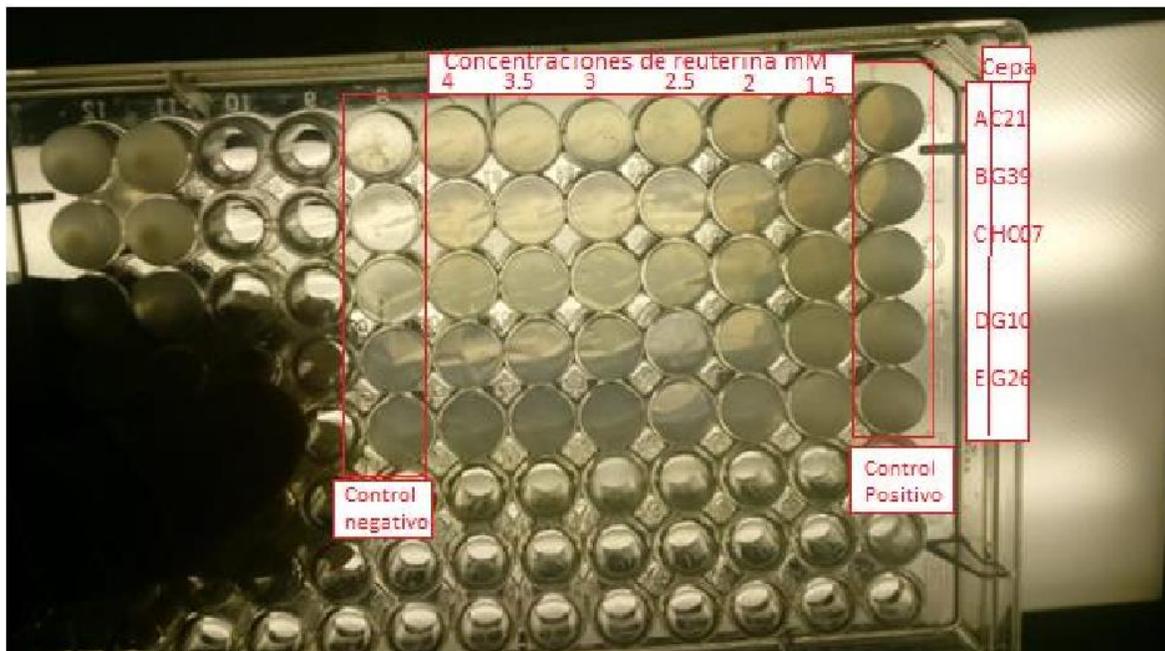


Figura 2. Disminución de turbidez de *Staphylococcus aureus* con diferentes concentraciones de reuterina A (C21) B (G39) C (HC07) D (G10) E (G26) 1(Control positivo agua y bacteria) ,2 (Reuterina 1.5mM),3 (2mM),4 (2.5mM),5 (3mM) 6 (3.5mM), 7 (4mM) 8 (Control - caldo nutritivo y agua inyectable).

Los resultados obtenidos mostraron que en todas las cepas ya no se observó turbidez a partir de la concentración de 1.5-2mM. Se compararon los resultados con la literatura lo cual indica que el valor de la concentración mínima inhibitoria de *S. aureus* es de 1.5mM (Ortiz-Rivera et al., 2017). Sin embargo, las cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas en este estudio son de origen hospitalario además de multirresistentes, sin embargo, la reuterina logro efectivamente inhibir su crecimiento.

Pseudomonas aureginosa presento una concentración minina inhibitoria en la concentración de 4mM de reuterina.

Como menciona (Ortiz-Rivera et al., 2017) cada patógeno tiene variación en la susceptibilidad a reuterina, esto debido a sus características morfológicas, bacterias como *Escherichia coli*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* 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 la ribonucleótido reductasa y tioredoxina, inactivando proteínas y moléculas que contienen estos grupos (Vollenweider et al., 2010). De igual forma la inhibición se puede deber 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. (Talarico et al., 1989).

En cuanto a la bacteria *Klebsiella pneumoniae* se probaron 4 cepas, 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. 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 los demás experimentos realizados en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* estas bacterias si presentan sensibilidad ante la reuterina. 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).

5. CONCLUSIONES

Staphylococcus aureus fue inhibido a partir de la concentración 1.5-2mM de reuterina, demostrando que si tiene efecto antimicrobiano contra las cepas hospitalarias por lo cual tiene el potencial de ser utilizada para su control. Por otra parte, la reuterina también resulto eficaz como antimicrobiano para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 4mM. Finalmente, 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. La reuterina resulto una opción viable de control de bacterias multirresistentes a bajas concentraciones, además de que su síntesis resulta fácil y económica.

REFERENCIAS

- Bart N. Green, Claire D. Johnson, Jonathon Todd Egan, Michael Rosenthal, Erin A. Griffith, Marion Willard Evans. (2012), Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview for manual therapists. *Journal of Chiropractic Medicine*. doi: 10.1016/j.jcm.2011.12.001.
- Bustos-Martínez, Jaime A. Hamdan-Partida, Aída. Gutiérrez-Cárdenas, Marcia (2006) *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev Biomed* 2006; 17:287-305.
- Cabrejas, Izaskun Martín (2017). Potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* y aplicación de la reuterina como bioconservante alimentario. Tesis doctoral. Universidad complutense de Madrid facultad de Veterinaria. Madrid.
- Chimchang J, Theparee T, Ladda B, Tanasupawat S, Wongsatayanon BT, Taweechotipatr M (2015). Antimicrobial Properties of a Potential Probiotic *Lactobacillus* from Thai Newborn Feces. *J Med Assoc Thai*.
- Cervantes- Garcia, E., Garcia-Gonzalez, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus*. *Revista Latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio* , 28-40.
- Cervantes- Garcia, E., Garcia-Gonzalez, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2015). *Staphylococcus aureus* asociado a la comunidad (CA-MRSA). *Revista latinoamericana de patología clínica* , 100-111.
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and molecular Biology reviews*, 417–433. doi:10.1128/MMBR.00016-10.
- Doleyres, Y., P. Beck, S. Vollenweider, and C. Lacroix. (2005). Production of 3hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:467–474. DOI 10.1007/s00253005-1895-4.
- E. Khokhlova, Olga , Wei-Chun Hung, Tsai-Wen Wan, Yasuhisa Iwao, Tomomi Takano, Wataru Higuchi, Svetlana V. Yachenko, Olga V. Teplyakova, Vera V. Kamshilova, Yuri V. Kotlovsky, Akihito Nishiyama, Ivan V. Reva, Sergey V. Sidorenko, Olga V. Peryanova, Galina V. Reva, Lee-Jene Teng, Alla B. Salmina, and Tatsuo Yamamoto. (2015). Healthcare- and CommunityAssociated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*

(MRSA) and Fatal Pneumonia with Pediatric Deaths in Krasnoyarsk, Siberian Russia: Unique MRSA's Multiple Virulence Factors, Genome, and Stepwise Evolution. PLoS ONE 10(6): e0128017. doi:10.1371/journal.pone.0128017.

Gordon, R. J., & Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 Suppl 5(Suppl 5), S350–S359. doi:10.1086/533591

Harkin , Catriona P.; Pichon, Bruno; Doumith, Michel; Parkhill, Julian; Westh, Henrik; Tomasz, Alexander; De Lencastre, Herminia; Bentley, Stephen D.; Kearns, Angela M. and Holden, Matthew T. G. (2017) Harkins et al. *Genome Biology*. Cross Mark. DOI 10.1186/s13059-017-1252-9.

JM, Andrews (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother*

Lakhundi, Sahreena. Zhanga, Kunyan. (2018) Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 31:e00020-18.

Lencastre Herminia de. Tomasz, Alexander. The CEM-NET initiative: Molecular biology and epidemiology in alliance – tracking antibiotic-resistant *Staphylococci* and *Pneumococci* in hospitals and in the community *Int J Med Microbiol*. 2011 December; 301(8): 623–629. doi:10.1016/j.ijmm.2011.09.010.

Navarro, Jason B. Mashburn-Warren, Lauren. Bakaletz, Lauren O. Bailey, Michael T. and Goodman, Steven D.. (2017) Enhanced Probiotic Potential of *Lactobacillus reuteri* When Delivered as a Biofilm on Dextranomer Microspheres That Contain Beneficial Cargo. *Front. Microbiol*. 8:489. doi: 10.3389/fmicb.2017.00489.

Maye Bernal R. Miguel Guzman U. (1984) El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Revista biomédica*.

Mejía, Carlos, Jeannete Zurita, Manuel Guzmán-Blanco (2010) Epidemiology and surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Latin America. *Braz J Infect Dis*; Vol 14 (Suppl 2):S79-S86.

Milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *American Dairy Science Association*.

- Mu, Qinghui. Tavella, Vincent J. and Luo, Xin M. (2018) Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Front. Microbiol.* 9:757. doi: 10.3389/fmicb.2018.00757.
- Oquendo, A. M., de Oca Rivero, M. M., Alemañy Co, J. A., & Marrero Silva, I. E. (2017). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima Medisur. ISSN 1727-897X.
- Ortiz-Rivera, Y. (2009) Caracterización molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de la Ciudad de Chihuahua. (Tesis de maestría). Facultad de Ciencias Químicas, UACH, Chihuahua.
- Ortiz-Rivera, Y. Sánchez-Vega, R. Gutiérrez-Méndez, N. León-Félix, J. AcostaMuñiz, C. And Sepulveda, D. R. (2017) Production of reuterin in a fermented milk product by *Lactobacillus reuteri*: Inhibition of pathogens, spoilage microorganisms, and lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 100:4258–4268. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11534>
- Ortiz-Rivera, Yuridia. Sánchez-Vega, Rogelio. Acosta-Muñiz, Carlos Horacio. Gutiérrez-Méndez, Néstor. León-Félix, Josefina. Sepulveda, David R. (2018) Influence of environmental and genetic factors on 3hydroxypropionaldehyde production by *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Basic Microbiology*. DOI: 10.1002/jobm.201800343.
- Raygada, J. L., & Levine, D. P. (2009). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Growing Risk in the Hospital and in the Community. *American health & drug benefits*, 2(2), 86–95.
- Rodríguez-Noriega, Eduardo. Seas, Carlos. Guzman-Blanco, Manuel. Mejía, Carlos. Alvarez, Carlos. Balvastrello, Luis. Zurita, Jeannete. Labarca, Jaime. M. Luna, Carlos. J.C. Salles, Mauro. Gotuzzo, Eduardo (2010) *International Journal of Infectious Diseases*. International Society for Infectious Diseases. Elsevier. doi:10.1016/j.ijid.2009.08.018.
- Samar S. Boswihi, Edet E. Udo (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Current Medicine Research and Practice*.
- Samar S. Boswihi, Edet E. Udo. (2018) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An update on the epidemiology, treatment options and infection control. *Current Medicine Research and Practice* 8.

Shallcross LJ1, Howard SJ2, Fowler T3, Davies SC4. (2015). Tackling the threat of antimicrobial resistance: from policy to sustainable action. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. doi: 10.1098/rstb.2014.0082.

Schauenstein, E., Esterbauer, H., Zollner, H. (1977). Aldehydes biological systems. Pior, Academic Press, Londres.

Siddiqui AH, Whitten RA (2018). Staphylococcus aureus resistente a la meticilina (MRSA). StatPearls, NCBI Bookshelf. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482221/>.

Tagliabue A and Rappuoli R (2018) Changing Priorities in Vaccinology: Antibiotic Resistance Moving to the Top. *Frontiers in Immunology*. 9:1068. doi: 10.3389/fimmu.2018.01068.

Talarico, T. L. Dobrogosz, W. J. (1989). Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Tong, Steven YC , Davis, Joshua S., Eichenberger, Emily. Holland, Thomas L. y Fowler, G, Vance Jr (2015). Infecciones por *Staphylococcus aureus*: Epidemiología, Fisiopatología, Manifestaciones clínicas y Manejo. *Clin Microbiol Rev*.

Tracey A. Taylor; Chandrashekar G. Unakal (2017). *Staphylococcus aureus*. StatPearls – NCBI Bookshelf. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/?report=printable>.

Ursula Hofer (2018) The cost of antimicrobial resistance. *Nature Reviews Microbiology*.

Velázquez-Meza, Maria Elena (2005) Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinorresistente. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca. 47:381-387.

Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis. *P&T*, 277-283.

Wiegand. Irith. Hilpert, Kai. Hancock, Robert EW. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances *Nature Protocols*.

Zaman S, Hussain M, Nye R, et al. (2017) A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus* 9(6): e1403. DOI 10.7759/cureus.1403.

Productos generados

Los productos generados por la realización de este proyecto son 3 tesis de licenciatura y un artículo.