

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



EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA REUTERINA
CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A
METICILINA (MRSA) RELACIONADAS FILOGENÉTICAMENTE CON
CLONAS PANDÉMICAS INTERNACIONALES

POR

FABIOLA IVONNE FLORES RAMÍREZ

TESIS

LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

CD. JUÁREZ, CHIH.

NOVIEMBRE, 2019.

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA REUTERINA CONTRA
CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)
RELACIONADAS FILOGENÉTICAMENTE CON CLONAS PANDÉMICAS
INTERNACIONALES

POR

FABIOLA IVONNE FLORES RAMÍREZ

TESIS

DRA. YURIDIA ORTIZ RIVERA
DIRECTORA DE INVESTIGACIÓN

DRA. CLAUDIA LUCÍA VARGAS REQUENA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

DR. JOSÉ ALBERTO LÓPEZ DÍAZ
JEFE DEL DEPARTAMENTO

C.D. SALVADOR DAVID NAVA MARTÍNEZ
DIRECTOR DEL INSTITUTO

NOVIEMBRE, 2019

CONTENIDO

DEDICATORA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	12
1 ANTECEDENTES.....	13
1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.1.1 Patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.1.2 Factores de riesgo	15
1.2 Resistencia antimicrobiana.....	15
1.3 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA).....	19
1.3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado al ambiente hospitalario (HA-MRSA)	21
1.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina asociado a la comunidad (CA-MRSA)	22
1.4 Epidemiología MRSA.....	23
1.5 Clonas pandémicas MRSA.....	24
1.5.1 Distribución de las clonas pandémicas	26
1.6 Probióticos	27
1.7 <i>Lactobacillus reuteri</i>	28
1.7.1 <i>Lactobacillus reuteri</i> y producción de antibióticos	28
1.7.2 Reuterina.....	29
1.7.3 Reuterina contra <i>Staphylococcus aureus</i> y MRSA.....	31
1.8 Hipótesis.....	31

1.9	Objetivos	31
1.9.1	Objetivo general	31
1.9.2	Objetivos específicos	31
2	MATERIALES Y MÉTODOS	33
2.1	Resiembra de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.2	Comparación de los perfiles filogenéticos de las cepas MRSA	33
2.3	Producción y cuantificación de reuterina	33
2.3.1	Preparación y siembra del pre cultivo	34
2.3.2	Preparación del medio de cultivo	34
2.3.3	Inoculación del precultivo y el medio de cultivo	34
2.3.4	Producción y cuantificación de reuterina	35
2.4	Evaluación del efecto antimicrobiano de reuterina con cepas MRSA	36
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1	Comparación de los perfiles filogenéticos de las cepas MRSA	37
3.2	Producción y cuantificación de reuterina	39
3.3	Evaluación del efecto antimicrobiano de la reuterina contra cepas MRSA ...	41
3.4	Conclusiones	44
3.5	Difusión de resultados	45
	LITERATURA CITADA	47

DEDICATORIA

**A mis padres y hermanos por estar
conmigo siempre, por tanto amor y
motivación.**

**A Adrián, por ayudarme siempre en
todas las maneras posibles, eres mi todo.**

**A mi asesora de Tesis; Yuridia, por
todo el apoyo, fe en mí.**

**Y a mí perrita Pigeon, por llenarme de
amor siempre.**

**Me inspiran a ser mejor cada día.
Gracias por todo ♡**

AGRADECIMIENTOS

Primeramente quiero agradecer a mis Padres, María de Jesús Ramírez y Edmundo Flores Palacios, No puedo expresar con palabras lo agradecida que estoy, no estaría donde estoy si no fuera por ustedes, me han dado tanto y soy muy afortunada de tenerlos a mi lado, los amo mucho, son los mejores. A mis hermanos, Oscar Flores y Cesar Flores y abuelita, Yolanda Ramírez por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas y por todo el apoyo y amor que me dan, son gran parte de mi motivación.

También quiero agradecer a mi asesora de Tesis, Yuridia Ortiz Rivera, fue un gran honor para mí haber trabajado con usted, la ciencia necesita mujeres inteligentes y valientes como usted, fue mi guía durante esta investigación y aprendí mucho, es una excelente persona, maestra e investigadora, la admiro mucho.

Agradezco a mis maestros de investigación; Raymundo Rene Rivas Cáceres y Dulce María Arzate Vázquez, por todo el tiempo que dedicaron en mí y su paciencia, me ayudaron mucho y aprendí mucho de ustedes, son excelentes personas y maestros, no pude haber tenido mejores, les deseo todo el éxito del mundo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio: Eduardo Suarez, me ayudaste demasiado, estuviste conmigo en el laboratorio en todo momento, fue un placer trabajar contigo, llegarás muy lejos. Laura Aboytes y Samuel Romero, por todo el esfuerzo, apoyo y enseñanzas, tuvimos momentos complicados pero siempre estuvimos apoyándonos, les deseo todo el éxito, son los mejores.

También quiero agradecerle a la mejor persona que he conocido, Adrián Torres Bonilla, por estar a mi lado siempre, por darme motivación y dejarme acurrucarme contigo cuando siento que no puedo más, tus brazos siempre están para mí, por darme todo tu amor y apoyo incondicional y nunca dejar de

creer en mí, sabes que tu existencia alegra mi vida, soy muy afortunada de tenerte en mi vida.

A mis amigos y compañeros de la universidad, Viridiana Reyes, Omar Aponte, Pamela Silva, Alejandra Gómez, Gerardo López, Paola García Vera, Jorge Muñiz, Ámbar Curiel, Juan Carlos Lara, Cynthia Lucas, Juan Carlos Sifuentes, Nohemi Villalpando, Esmeralda Pineda y Marco Uribe. Gracias por su amor, consejos y apoyo, por siempre estar ahí cuando los necesito y contar conmigo siempre, son increíbles.

Y por último pero no menos importante quiero agradecerle al lector, gracias por darme la oportunidad, pongo en tus manos mi tiempo, esfuerzo y dedicación. Es un gran placer para mí poder aportar un poco a la ciencia. Fue todo un reto pero durante este tiempo disfruté de cada momento, experiencia y proyectos que se realizaron.

Lo volvería a hacer una y otra vez.

«Por una vida científica, por una ciencia vital».

RESUMEN

En México hay un número muy limitado de estudios epidemiológicos de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) 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. Las cepas MRSA son muy persistentes y capaces de diseminarse por todo el mundo; existen distintas clonas de estas cepas MRSA conocidas como pandémicas: clona Ibérica, clona brasileña, clona húngara, clona Nueva York/Japón y clona Pediátrica, las cuales son multiresistentes y muy persistentes, encontrándose distribuidas por todo el mundo y son conservadas filogenéticamente. Estas clonas 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; los cuales no han generado resistencia a estos antibióticos naturales. Los *Lactobacillus* spp. son de los probióticos más utilizados; entre los cuales se encuentra *Lactobacillus reuteri* (*Lb. reuteri*) que segrega intermediarios antimicrobiano como la reuterina. En esta investigación se evaluó el efecto antimicrobiano de reuterina contra cepas MRSA mediante el método de Concentración mínima inhibitoria (MIC), en el cual se le agregó diferentes concentraciones de reuterina a diferentes cepas de la clona Nueva York/Japón en una placa de 96 pozos hasta identificar la concentración más baja en la que la reuterina inhibe el crecimiento de estas cepas. La literatura demuestra que *S. aureus* tiene resistencia de hasta una concentración de 1.5 mM de reuterina, mientras que los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que las diferentes cepas MRSA probadas tienen resistencia de 1.5-2.0 mM de reuterina con una diferencia muy mínima a pesar de que son más multiresistentes y persistentes, por lo cual la reuterina si tiene el potencial de ser utilizada como una nueva opción de control de manera internacional contra estas bacterias multiresistentes.

ABSTRACT

In Mexico there is a very limited number of epidemiological studies of the different strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) which makes us underestimate the problem of resistance in this country; the indiscriminate use of antibiotics and the constant selective environmental pressure caused by antiseptics and disinfectants has generated a great resistance to readily available treatment options. The MRSA strains are very persistent and capable of spreading all over the world. There also exist different clones of MRSA strains also known as pandemics: Iberian clone, Brazilian clone, Hungarian clone, New York/Japan clone and pediatric clone, all of which are multiresistant and persistent, they are found distributed all over the world and are phylogenetically conserved. These clones are generated in hospital environments and are a public health problem, which in turn means the proposing new methods of controlling or avoiding their ability to spread is of international importance. One option being currently explored is the use of probiotics that produce substances capable of controlling pathogenic microorganisms; which have not generated a resistance to these natural antibiotics. *Lactobacillus* spp. is one of the most used probiotics, in which are found *Lactobacillus reuteri* (*lb. reuteri*) that segregate intermediary antimicrobials like reuterin. In this investigation it was evaluated the antimicrobial effects of reuterin against MRSA strains using the minimum inhibitory concentration (MIC) method, in which we add different reuterin concentrations to different New York/Japan clone strains to a 96 well tray until identifying the lowest concentration in which the reuterin inhibits the growth of these strains. The literature demonstrates that *s. aureus* has a resistance up to a 1.5 mM of reuterin, while the results obtained in the investigation show that different MRSA strains have a resistance of 1.5-2.0 mM of reuterin with minimal difference despite being multiresistant and persistent, therefore the reuterin has the potential to be used as a new option of internationally controlling these multiresistant bacterias.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Reducción de la elaboración de nuevos antibióticos.....	14
2	Muertes anuales por resistencia antimicrobiana en comparación con otras muertes.....	16
3	Adquisición de la resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a meticilina.....	19
4	Distribución mundial de las clonas MRSA.....	25
5	Metabolismo del glicerol.....	28
6	Electroforesis de campos pulsados clona Nueva York/Japón.....	34
7	Electroforesis de campos pulsados clona Nueva York/Japón.....	35
8	Curva de calibración de acroleína.....	37
9	Prueba exploratoria MIC.....	40
10	Prueba MIC.....	41
11	Grafica de las concentraciones de reuterina la cual se observa inhibición en diferentes cepas MRSA.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
I Principales características y diferencias entre cepas HA-MRSA y CA-MRSA	22
II Distribución de las principales clonas pandémicas.....	24
III Promedio de los valores MIC de la prueba de susceptibilidad a reuterina.....	39
IV Desviaciones estándar de las repeticiones de los valores MIC de cada cepa.....	39

INTRODUCCIÓN

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 asintómicamente. La colonización proporciona un reservorio mediante el cual la bacteria puede introducirse cuando las defensas del huésped están dañadas y producir lesiones. *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 por lo cual se introdujo la meticilina como antibiótico de elección en su tratamiento sin embargo aparecieron cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) un año después. Actualmente el MRSA se ha clasificado como MRSA asociado al ambiente hospitalario (HA-MRSA) y otra clase de MRSA, que surgió en entornos comunitarios entre 1997 y 1999, como MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA). Las técnicas de tipificación molecular se han aplicado ampliamente para estudiar la epidemiología molecular del MRSA surgiendo clones que causan un problema de salud pública mundial, identificando cinco clonas pandémicas: Clona Ibérica, Clona Brasileña, Clona Húngara, Clona Nueva York/Japón, y Clona Pediátrica, los cuales tienen una relación filogenética y poseen una amplia habilidad para causar infecciones, persistir, diseminarse de una región a otra y son multiresistentes. La resistencia antimicrobiana (AMR) 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 la AM, siendo una de las primeras razones por el cual el interés de usar los probióticos ha aumentado significativamente en los últimos años. Los *Lactobacillus* spp. Son uno de los probióticos más utilizados: *Lactobacillus reuteri* produce 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA) o reuterina la cual es una sustancia antimicrobiana eficaz de amplio espectro que inhibe el crecimiento de bacterias, hongos y protozoos.

1 ANTECEDENTES

1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria que pertenece a la familia Micrococcaceae, del género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston (1883) introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula y son anaerobias facultativas (Cervantes-García, 2014). *Staphylococcus aureus* es una bacteria considerada dentro de la flora microbiana sin embargo, es un patógeno potencial. Las narinas anteriores son el nicho principal de *S. aureus*, así como otras áreas del cuerpo humano que pueden ser colonizadas como: las axilas, la ingle y el tracto gastrointestinal, entre otras. 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 como la piel al rasurarse, por aspiración, inserción de catéteres o por cirugía. (Cervantes-García *et al.*, 2015) Las mucosas y la piel ofrecen una barrera mecánica eficiente contra la invasión local de los tejidos. Si esta barrera se rompe a causa de un traumatismo o de cirugía, *S. aureus* puede acceder a los tejidos subyacentes y desarrollar una lesión local característica como abscesos (Cervantes-García *et al.*, 2014).

1.1.1 Patogenicidad de *Staphylococcus aureus*

S. aureus es uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones hospitalarias, posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produciendo desde lesiones superficiales de la piel, abscesos localizados en otros sitios, bacteriemia y endocarditis infecciosa (EI), así como infecciones osteoarticulares, de piel y de tejidos blandos (Tong *et al.*, 2015).

Una pandemia global de especies resistentes de *S. aureus* y especies de *Enterococcus* actualmente representa la mayor amenaza. MRSA mata a más estadounidenses cada año que el VIH / SIDA, la enfermedad de Parkinson, el enfisema y el homicidio combinados (Ventola, 2015). Las infecciones por *S. aureus* son comunes tanto en los entornos adquiridos en la comunidad como en los adquiridos en el hospital y el tratamiento sigue siendo difícil de manejar debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos como la meticilina. *S. aureus* se encuentra en el medio ambiente y también se encuentra en la flora humana normal, que se encuentra en la piel y las membranas mucosas (con mayor frecuencia en el área nasal) en un gran número de las personas sanas (Taylor & Unakal, 2017). Además de producir diversas clases de infecciones en las cuales está presente la bacteria en el sitio infectado, es capaz de producir infecciones distantes del sitio infectado, tales infecciones están mediadas por la secreción de enzimas y toxinas sintetizadas directamente por la bacteria; cuando las toxinas de *S. aureus* se introducen en el torrente sanguíneo o se ingieren a través de comida contaminada. Las enfermedades mediadas por las toxinas de *S. aureus* incluyen: el síndrome de shock tóxico (TSS), síndrome de piel escaldada (SSS) e intoxicación por alimentos. El síndrome de shock tóxico era reconocido por primera vez en 1978, inicialmente entre mujeres sanas que menstrúan, lo que causa referido como TSS menstrual estafilocócico, y más tarde entre casos de TSS por estafilococos no relacionados con la menstruación asociados con infecciones invasivas como la neumonía y la endocarditis infecciosa. El síndrome se caracteriza por síntomas parecidos a la gripe, erupción cutánea, fiebre, hipotensión, dolor muscular, vómitos, diarrea, confusión, dolor abdominal y, finalmente, insuficiencia orgánica múltiple. El síndrome de piel escaldada estafilocócica (SSS) también conocido como Ritter von Ritterschein, es una enfermedad en los recién nacidos, una infección común en los niños pero rara en adultos, el síndrome es causado por la toxina exfoliativa (ET) secretada por *S. aureus*. Se caracteriza por erupciones en todo el cuerpo y descamación de la piel que se resuelve dentro de los 10 días de tratamiento. La intoxicación alimentaria por estafilococos ocurre cuando los alimentos se contaminan con una o más enterotoxinas estafilocócicas (SE).

Generalmente se produce a través del contacto directo de los manipuladores de alimentos colonizados con *S. aureus* productor de enterotoxinas (Samar & Edet, 2018). La heterogeneidad de estas enfermedades y la habilidad única de *S. aureus* para desarrollar resistencia a cualquier agente antimicrobiano reflejan su extraordinaria capacidad para adaptarse y sobrevivir en una gran variedad de ambientes (Cervantes-García *et al.*, 2015).

1.1.2 Factores de riesgo

Los factores de riesgo comúnmente asociados a la infección por *S. aureus* son hospitalización prolongada, ingreso a cuidados intensivos, hospitalización reciente, uso reciente de antibióticos, colonización por las cepas, procedimientos invasivos, infección por VIH, ingreso a hogares de ancianos, heridas abiertas, hemodiálisis, acceso a catéter urinario a largo plazo. También se observa una mayor incidencia de infección de esta bacteria entre los trabajadores de la salud que entran en contacto directo con los pacientes infectados con este organismo (Siddiqui & Whitten, 2018). El área hospitalaria con mayor frecuencia de infecciones nosocomiales es la Unidad de Terapia Intensiva. Las infecciones más frecuentes son en vías urinarias, seguidas por las de herida quirúrgica, bacteremias y neumonías. Otro factor que se relaciona con el desarrollo de infecciones nosocomiales es la edad. El mayor número de muertes se tiene en personas ancianas con infecciones severas (Bustos-Martínez, 2006).

1.2 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 y las 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. Muchas 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, ver Figura 1 (Ventola, 2015).

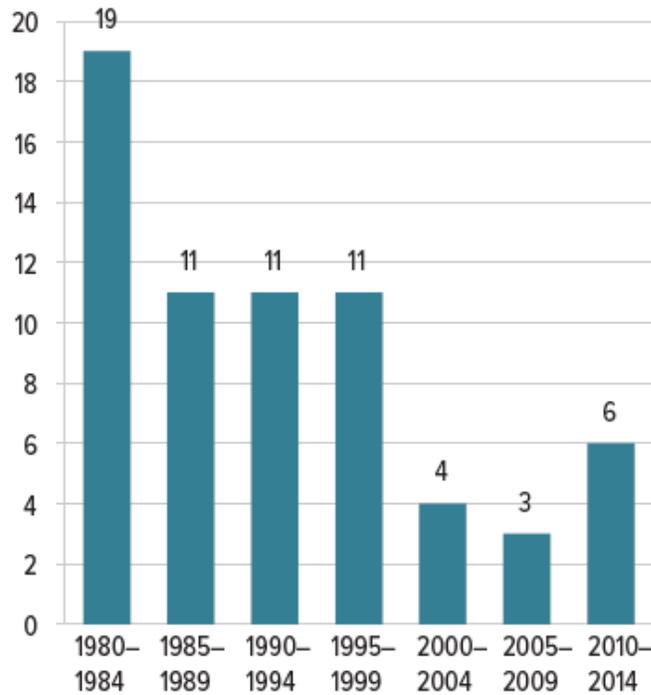


Figura 1. El número de nuevos antibióticos desarrollados y aprobados ha disminuído constantemente en las últimas tres décadas (aunque cuatro nuevos medicamentos fueron aprobados en 2014), dejando menos opciones para tratar bacterias resistentes. Fuente: Ventola, 2015.

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 ya están 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, ver Figura 2 (Tagliabue & Rappuoli, 2018).

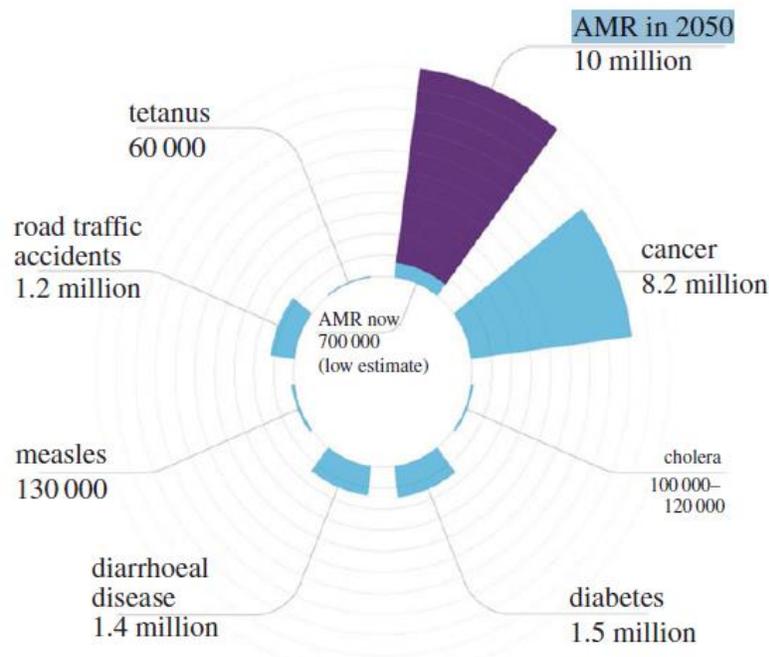


Figura 2. Se muestran las muertes anuales atribuibles a la resistencia antimicrobiana en comparación con otras importantes causas de la muerte actualmente como el tétano, accidentes de tráfico, sarampión, enfermedad diarreica, diabetes, cólera y cáncer. Fuente: Shallcross *et al.*, 2015.

Cada día se están presentando y propagando alrededor de todo el mundo nuevos mecanismos de resistencia en las bacterias que dificulta cada vez más nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Debido a este problema la OMS en el año 2017 publicó una lista de las bacterias que necesitan el desarrollo de nuevos antibióticos; en la cual *S. aureus* se posiciona en el nivel 2 que corresponde a la

prioridad elevada. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que posee características particulares de virulencia y resistencia a los antibióticos, el principal impacto de este microorganismo se debe a que las cepas han adquirido resistencia, por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) y no sólo son resistentes a este antibiótico, sino también a múltiples antimicrobianos; limitando sus opciones de tratamiento, por ejemplo la vancomicina se utilizó de manera global a principios de los años 90 como único antibiótico efectivo, sin embargo ya se han encontrado algunas cepas con susceptibilidad disminuida.

1.3 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

La resistencia bacteriana es un proceso continuo, que inició con la resistencia a penicilina por *S. aureus*. La introducción de las penicilinas resistentes a penicilinasas en la década de los 60 condujo al desarrollo de resistencia a meticilina surgiendo la aparición de cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina poco tiempo después de la introducción de este antimicrobiano en el tratamiento de infecciones por *S. aureus* (Cervantes-García, et al, 2014). Esta resistencia se debe a que las bacterias portan el gen *mecA*, localizado en un elemento genético móvil llamado cassette cromosomal estafilocócico (SCCmec). Este gen codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a) que se diferencia de la PBP natural (penicillin binding protein 2A), no permite la unión a los β lactámicos. Por lo tanto la penicilina no inhibe la síntesis de la pared celular de la bacteria, ver Figura 3 (Cervantes- Garcia, 2015).

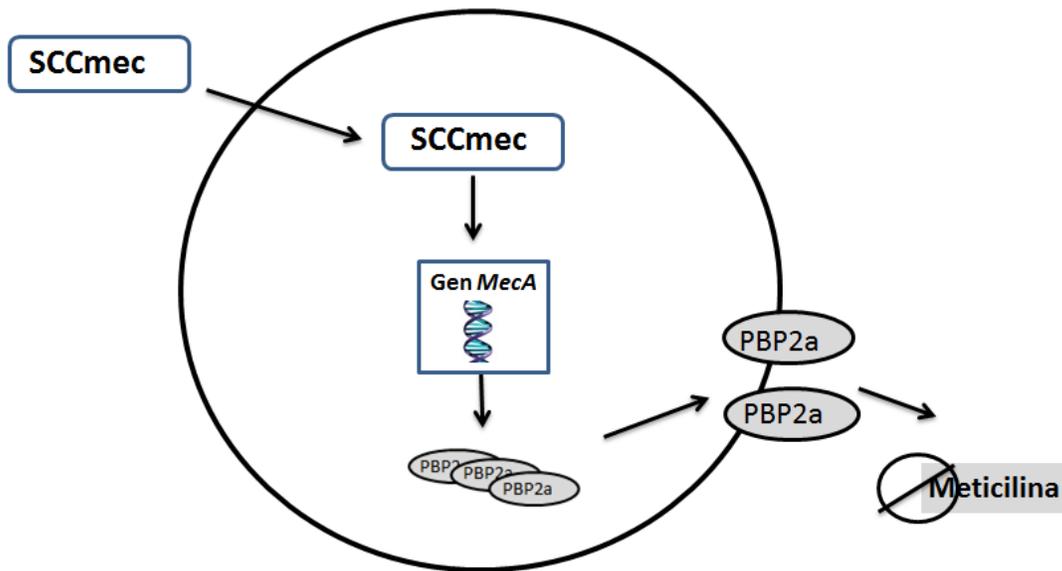


Figura 3. El elemento central de la resistencia a la meticilina en *S. aureus* es la adquisición horizontal del gen *mecA*, el cual se encuentra en un elemento genético móvil grande, conocido como casete cromosomal estafilocócico *mec* ("staphylococcal cassette chromosome *mec*", SCCmec). Fuente García, 2015.

Las cepas MRSA se están extendiendo rápidamente a nivel mundial (Zaman *et al.*, 2017). Además de que ha sido identificado como uno de los principales patógenos de riesgo asociados con el desarrollo de resistencia antimicrobiana (AMR). La aparición de la resistencia a los antimicrobianos en *S. aureus* está bien documentada y la especie ha demostrado ser especialmente hábil en la evolución de la resistencia frente a nuevos desafíos de antibióticos (Harkin *et al.*, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista en el 2017 de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, los criterios para incluir patógenos en la lista fueron los siguientes: el grado de letalidad de las infecciones que provocan; el hecho de que el tratamiento requiera o no una hospitalización larga; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan. En la que se incluye *Staphylococcus aureus* en las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, la cual se ha elaborado para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatir el creciente problema mundial de la

resistencia a los antimicrobianos, posicionando a las cepas MRSA en el nivel Prioridad 2: ELEVADA (OMS, 2017). El MRSA está clasificado como MRSA asociado a la atención médica (HA-MRSA) y otra clase de MRSA, que surgió en entornos comunitarios entre 1997 y 1999, como MRSA asociado a la comunidad (CA-MRSA). Tanto HA-MRSA como CA-MRSA tienen el gen *mecA* en el SCC *mec* y cada uno tiene varios antecedentes genéticos, que generalmente se identifican en función de los tipos de secuencia multilocus (tipos ST), proteína A tipos de genes (*spa*) y tipos de SCC *mec*. (Khokhlova *et al.*, 2015). En la mayoría de las cepas CA-MRSA se ha observado que portan el SCC*mec* tipo IV y algunas el tipo V. Mientras que los adquiridos en el hospital por lo general portan los SCC*mec* tipo I, II y III, ver Cuadro I (García, 2015).

Cuadro I. Principales características y diferencias entre las cepas HA-MRSA y CA-MRSA.

Cepas MRSA hospitalarias (HA-MRSA)	Cepas MRSA adquiridas en la comunidad (CA-MRSA)
Resistentes a múltiples antibióticos	Resistentes por lo general sólo a antibióticos β -lactámicos y ocasionalmente a eritromicina
Contienen SCC <i>mec</i> tipos I, II y III	Contienen SCC <i>mec</i> tipos IV y V
Presentan una gran cantidad de toxinas	Presentan sólo unas pocas toxinas en especial la Leucocidina Pantón-Valentine
Producen una gran cantidad de procesos infecciosos	Producen principalmente infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía necrotizante y septicemia
Cepas aisladas en pacientes con factores de riesgo nosocomiales	Cepas aisladas en la comunidad en pacientes que no tienen los factores de riesgo de una infección nosocomial
Cinco clonas pandémicas: Ibérica, Brasileña, Húngara, Nueva York/Japón y Pediátrica	Dos clonas principales, la USA300 y la USA400.

Fuente: Bustos-Martínez *et al.*, 2006.

1.3.1 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado al ambiente hospitalario (HA-MRSA)

Las cepas de HA-MRSA son la causa más común de infecciones adquiridas en el hospital. *S. aureus* resistente a la meticilina es la principal causa de infección de la piel y tejidos blandos en pacientes que acuden a los servicios de urgencias para tratamiento, con una tasa creciente en clínicas de atención primaria y unidades de cuidados

intensivos (Green *et al.*, 2012). Las infecciones por HA-MRSA han sido causadas por clones diseminados internacionalmente, estos clones resistentes a múltiples fármacos se diseminaron a nivel mundial y representaron la mayoría de las infecciones por HA-MRSA en varias regiones (Gordon & Lowy 2008). A principios de la década de 1990, el MRSA representaba del 20% al 25% de los aislamientos de *S. aureus* de pacientes hospitalizados. En 1999, MRSA representaba más del 50% de los aislamientos de *S. aureus* de pacientes en unidades de cuidados intensivos (UCI) de acuerdo con el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales. En 2003, ese porcentaje se acercaba al 60%. Ahora se estima que aproximadamente el 70% de todos los *S. aureus* aislados de las UCI son MRSA (Raygada & Levine, 2009). Las infecciones asociadas a la atención médica causadas por HA-MRSA incluyen infecciones del torrente sanguíneo, infecciones del tracto urinario, infecciones del tracto respiratorio, heridas quirúrgicas e infecciones asociadas con dispositivos (Samar & Edet, 2018). Entre los factores de riesgo para la infección por HA-MRSA están la hospitalización prolongada, inserción de catéter venoso central, dependencia de ventilador y hemodiálisis y proximidad a un paciente con colonización o infección por MRSA (Raygada & Levine, 2009).

1.3.2 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad (CA-MRSA)

Durante décadas, MRSA ha afectado más a los pacientes hospitalizados, pero en los últimos 15 años, también se ha convertido en un problema grave en el ámbito extra hospitalario (Oquendo *et al.*, 2017). En los años 90 se empezaron a describir infecciones por MRSA en grupos sin factores de riesgo como los presentes en los hospitales, iniciándose con esto el reconocimiento de infecciones por MRSA contraídas en la comunidad conociéndose como CA-MRSA para diferenciarlos de los MRSA adquiridos en el hospital (HA-MRSA) (Cervantes-García *et al.*, 2015). Los pacientes con infecciones adquiridas en la comunidad son definidos por Los Centros para la Prevención y Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés “Centers for Disease Control and

Prevention”) como aquellos con signos de infección que vienen de la comunidad o están hospitalizados menos de 48 horas, sin historia clínica de infección previa de colonización o infección por MRSA, sin antecedentes de hospitalización o internamiento en una casa de reposo en el último año y sin haber sido sometido a diálisis, cirugías o catéteres permanentes. El surgimiento de patógenos en la comunidad depende de su habilidad para sobrevivir en diferentes ambientes e interactuar exitosamente con el hospedero. Se ha reportado, que *S. aureus* es uno de los patógenos más exitosos y adaptables al ser humano ya que es altamente resistente a los ambientes desfavorables (ambientes secos, concentraciones altas de sales), conduciendo a que la bacteria permanezca temporal o permanentemente en el ser humano colonizando tanto la piel como la mucosa del mismo (Cervantes-García *et al.*, 2015).

1.4 Epidemiología MRSA

MRSA se ha convertido en un patógeno hospitalario endémico en muchos países. El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de EE. UU. Informan que las infecciones por MRSA ahora representan el 63% de las infecciones por estafilococos en los EE. UU., Después de haber aumentado desde el 2% en 1974 y el 22% en 1995. En el Estudio de Evaluación y Vigilancia de Tigecycline (TEST), en el cual se recolectaron datos de 33 centros en 11 países latinoamericanos (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Panamá, Puerto Rico y Venezuela), la prevalencia general de MRSA (incluidas las cepas HA y CA-MRSA) entre los aislamientos de *S. aureus* fue de 48.3% en 2004-2007. El Programa de Vigilancia Antimicrobiana SENTRY en América Latina reveló un aumento en la prevalencia de MRSA entre las infecciones estafilocócicas en los centros médicos, del 33,8% en 1997 al 40,2% en 2006 (Mejía *et al.*, 2010). En EUA se reporta una incidencia promedio del 3 al 5%. En México se tiene reportado un promedio del 10 al 15%. El impacto más importante de este problema es la mortalidad, la cual se estima en promedio de un 5%. Así, por ejemplo, se estima que en México, en 1996 de los 6 600 000 pacientes que recibieron atención médica hospitalaria, entre 600 000 y 750 000 presentaron infección nosocomial y de éstos

murieron entre 30 000 y 45 000 por esta causa (Bustos-Martínez, 2006). *S. aureus* es uno de los agentes etiológicos más comunes de la infección del torrente sanguíneo, así como una causa frecuente de endocarditis infecciosa en el mundo. Entre estas infecciones por *S. aureus*, MRSA representa más del 60% de los aislamientos en la configuración de la UCI. Según la estimación de los CDC, la septicemia por SARM fue responsable de más de 30,000 hospitalizaciones en 2000 en los Estados Unidos. Desde 1999 hasta 2005, se ha estimado que las hospitalizaciones por MRSA han aumentado más del 80%. Durante el estudio canadiense de vigilancia de salas (CANWARD) de 2007 a 2009, se recolectaron 3,589 aislamientos de *S. aureus* de todas las regiones geográficas de Canadá. Entre esos aislamientos, 889 fueron identificados como MRSA. HA-MRSA comprendió 72,4% (644) de aislados. En el ámbito de la atención médica, se predice que las infecciones por MRSA afectarán a más de 150,000 pacientes dentro de la Unión Europea (UE) anualmente, lo que agregará € 380 millones en costos a los sistemas de atención médica de la UE. Entre los estados miembros de la UE, existe una marcada variabilidad en la proporción de cepas de *S. aureus* que son resistentes a la meticilina, que van del 1% a más del 50%. En 2008, se estimó que más de 380,000 infecciones adquiridas en el hospital debido a bacterias resistentes a los antibióticos se adquirieron en los estados miembros de la UE, Islandia y Noruega cada año. De estas bacterias, MRSA representó el 44% de las infecciones, el 22% del exceso de muertes y el 41% de los días extra de hospitalización (Lakhundi *et al.*, 2018).

1.5 Clonas pandémicas MRSA

Han surgido clones de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina que causan un problema de salud pública mundial (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2010). La OMS define como pandemia a la propagación mundial de una nueva enfermedad. La epidemiología global requiere una colección de cepas de gran tamaño representativa de todos los MRSA que circulan en diferentes áreas geográficas y en diferentes periodos (Velazquez-Meza, 2005). Las técnicas de tipificación molecular se han aplicado ampliamente para estudiar la epidemiología molecular del MRSA, con el objetivo de distinguir los aislados

que están relacionados de aquellos que no están relacionados epidemiológicamente. Dos esfuerzos independientes y a gran escala han sido descritos recientemente para establecer las relaciones epidemiológicas de los MRSA. El primero es la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE, por sus siglas en inglés) esta técnica se basa en la digestión de ADN bacteriano con endonucleasas de restricción que reconocen un número limitado de sitios en el genoma bacteriano, generando fragmentos que van desde 30 Kb hasta más de 1 Mb. (Lakhundi *et al.*, 2018). Se identificaron alrededor de 3000 cepas de MRSA recolectadas en estudios de vigilancia e investigaciones de brotes de 1994 a 2000, la iniciativa CENMET, (Lencastre 2011) (Rodríguez-Noriega, *et al.*, 2010). Dando como resultado la identificación de cinco clonas pandémicas: Clona Ibérica, Clona Brasileña, Clona Húngara, Clona Nueva York/Japón, y Clona Pediátrica (Velazquez-Meza, 2005). Las cuales representaron el 68% de los aislamientos. (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2010) y el segundo es el análisis por la tipificación de secuencias multilocus (MLST) el cual analiza siete genes expresados de manera constitutiva que son esenciales para el funcionamiento celular de los organismos y por lo tanto, están presentes en todos los organismos, basándose en el perfil alélico de los siete loci, MLST asigna un tipo de secuencia numérica (ST) a cada aislamiento. La conclusión global de estos estudios después de analizar una gran colección de cepas MRSA que circulan en diferentes áreas geográficas del mundo y de diferentes periodos se encontró que las cepas MRSA tienen una estructura clonal conservada y que se cuenta con un número reducido de clonas con la capacidad de diseminación global (Velázquez-Meza, 2006). Éstas se conocen como clonas pandémicas MRSA. En el año 2000, Enright *et al.* aplicaron y validaron el esquema MLST para *S. aureus* contra PFGE. Los autores observaron que los tipos de cepas agrupados vía MLST tenían perfiles PFGE similares, mientras que aquellos que tenían perfiles PFGE diferentes también fueron diferentes cuando se describe con la técnica MLST (Lakhundi *et al.*, 2018).

1.5.1 Distribución de las clonas pandémicas

La clona Ibérica se describió primeramente en España en 1989 y posteriormente se reportó en Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Suiza, Francia, Polonia, República Checa y EUA. La clona Húngara se encontró por primera vez en hospitales de Hungría en 1998 y después se localizó en Tailandia. La clona Nueva York/Japón se determinó como una clona dominante en hospitales de Nueva York en 1998 y posteriormente se encontró en Japón. La clona Pediátrica se identificó en 1992 en un hospital pediátrico de Portugal y después se localizó en Polonia, EUA, Argentina, Colombia y Brasil. La clona Brasileña descrita en un principio en Brasil en 1995, se ha diseminado en Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa. La determinación de las clonas MRSA en América Latina es reciente y se encontró que la clona Brasileña es la que predomina y persiste en Brasil (97%), Argentina (86%), Uruguay (100%) y Chile (56%), ver Cuadro II (Lakhundi *et al.*, 2018).

Cuadro II Distribución de las principales clonas pandémicas MRSA.

<i>Clona</i>	<i>País o ciudad</i>	<i>Año de descripción</i>
Clona Ibérica	España, Portugal, Italia, Reino Unido, Alemania, Bélgica, Francia, República Checa y EUA	1989
Clona Brasileña	Brasil, Portugal, Argentina, Uruguay, Chile y República Checa	1992
Clona Pediátrica	Portugal, Polonia, EUA y Argentina	1992
Clona Húngara	Hungría, Taiwán y China	1997
Clona Nueva York/Japón	Nueva York, Nueva Jersey, Pensilvania, Connecticut, EUA; Tokio, Japón, y México	1998

Fuente: Velázquez-Meza, 2005.

MRSA es ahora una pandemia con transmisión mundial de cepas, incluyendo la diseminación de clones de HA-MRSA de la década de 1960 y clones de CA-MRSA de mediados de los 90 (Figura 4). Aunque los años mencionados marcan los inicios oficiales de estas cepas particulares de MRSA, existieron en la naturaleza durante bastante tiempo antes de que se informaran por primera vez (Lakhundi *et al.*, 2018).

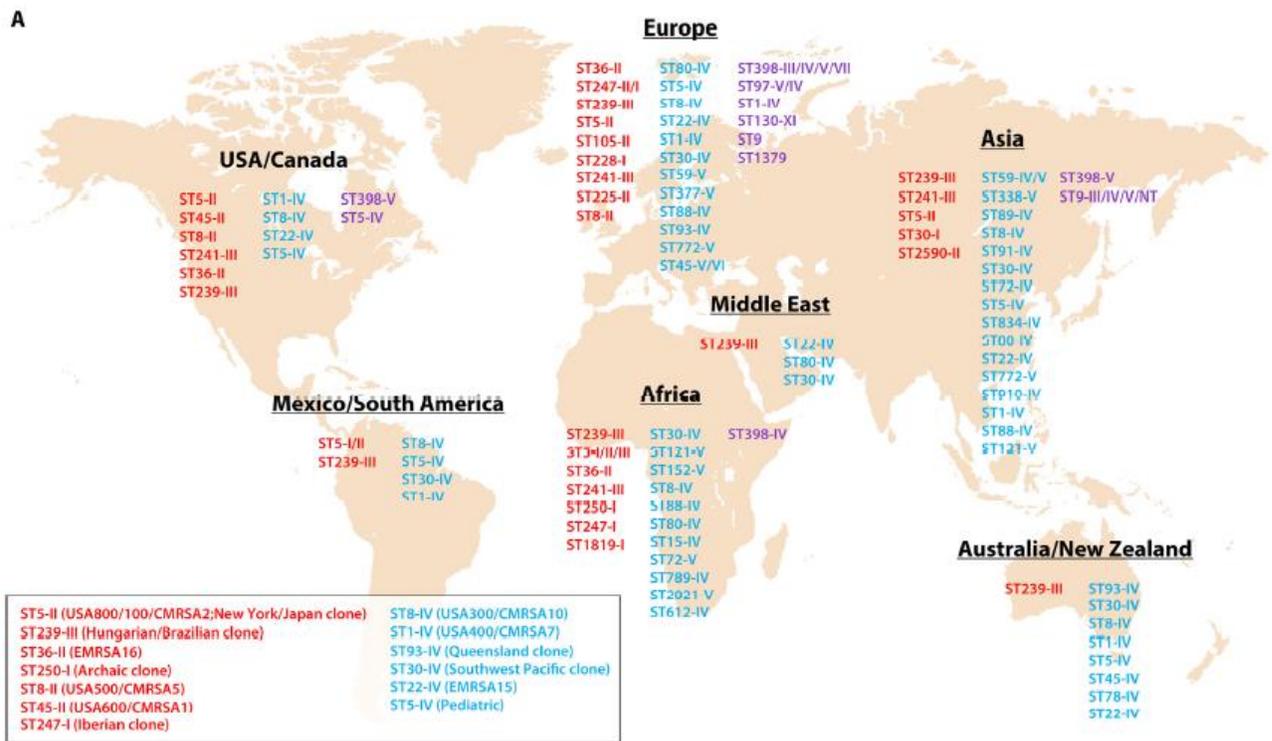


Figura 4. Distribución mundial de las principales clonas pandémicas MRSA informadas en cada continente o región por ambas tipificaciones. El rojo representa las que pertenecen a HA-MRSA, el azul representa las que pertenecen a CA-MRSA. Fuente: Lakhundi, et al, 2018.

La diseminación de las clonas MRSA en amplias zonas geográficas probablemente refleja su amplia habilidad para causar infecciones, persistir y diseminarse de una región a otra, y aun a diferentes continentes (Bustos, 2006). Por lo cual es de suma importancia investigar nuevas opciones de control para estas cepas.

1.6 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* spp. son uno 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 y no porosas, que incluyen *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* y *Lb. reuteri*. (Mu *et al.*, 2018).

1.7 *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).

1.7.1 *Lactobacillus reuteri* y producción de antibióticos

Lactobacillus reuteri es una bacteria heterofermentativa del ácido láctico que se ha aislado del tracto gastrointestinal, vagina y leche materna. *Lb. reuteri* 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 biotransformación de 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. Se ha realizado una cantidad considerable de investigaciones para determinar los efectos beneficiosos de *Lb. reuteri* contra virus y/u hongos. Existe evidencia que muestra el beneficio de *Lb. reuteri* contra neumovirus, circovirus, rotavirus, coxsackievirus y papilomavirus. Se ha sugerido que mejora la infección viral al regular la microbiota y secretar metabolitos que tienen componentes antivirales. Además, algunos estudios sugieren que también puede tener propiedades antifúngicas, donde *Lb. reuteri* antagoniza, detiene el crecimiento y eventualmente mata varias especies de *Candida* (Mu *et al.*, 2018).

1.7.2 Reuterina

Algunas cepas de *Lb. reuteri* puede 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). En la tercera vía el glicerol se deshidrata, por la acción de una glicerol/diol deshidratasa a 3-hidroxi propionaldehído (3-HPA), el cual se reduce a 1,3-propanodiol (1,3- PDL), mediante una 1,3-propanodiol deshidrogenasa, o se oxida a ácido 3- hidroxi propiónico (3-HP). A partir del 3-HPA se puede formar acroleína mediante deshidratación química espontánea en condiciones de pH ácido o temperatura elevada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Con respecto al 3-HPA, se ha comprobado que en solución acuosa se puede dimerizar y/o hidratar de forma

reversible, dando lugar a un equilibrio entre las tres formas (3-HPA, HPA-hidratada y HPA-dímero), que se conoce como “reuterina o sistema-HPA” (Vollenweider & Lacroix, 2004).

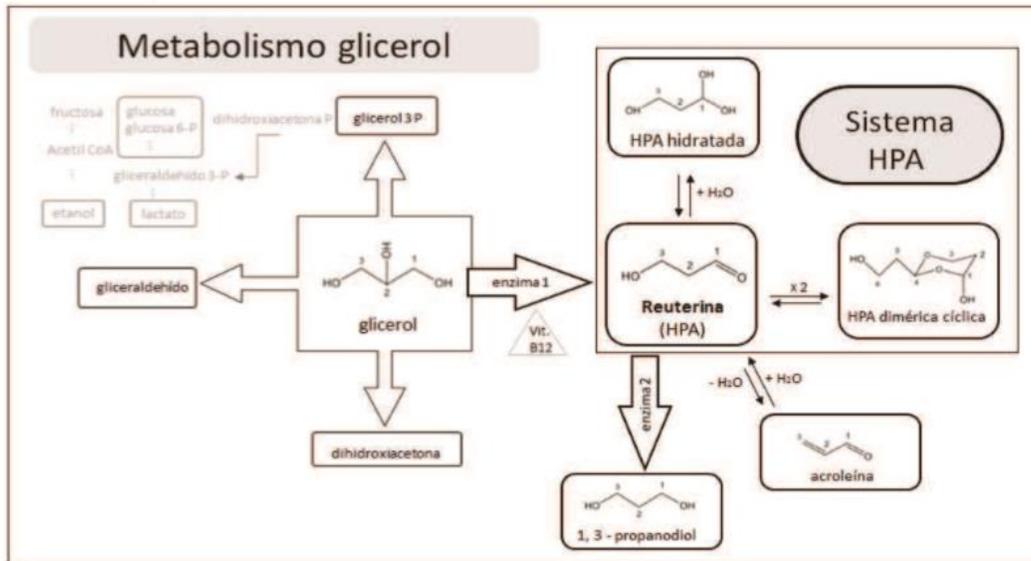


Figura 5. Vía del glicerol para generar 3-HPA; reuterina y acroleína. Fuente: Martín-Cabrejas, 2017.

Se han propuesto varias hipótesis sobre posibles mecanismos de acción de la reuterina. Inicialmente se observó que la reuterina actuaría sobre la síntesis de ADN inhibiendo las enzimas sulfhidrilo implicadas en la actividad ribonucleótido reductasa (Talarico & Dobrogosz, 1989), al situarse el dímero en el lugar de reconocimiento de la ribonucleótido reductasa. Posteriormente se le atribuyó la acción antimicrobiana de la reuterina a 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*. Añadiendo cisteína (aminoácido con grupo tiol) al medio se comprobó que la reuterina sólo actúa en una concentración muy alta, mientras que adicionando valina o serina (aminoácidos sin grupo tiol) el aldehído demuestra su actividad antimicrobiana desde bajas concentraciones (Schaefer y col., 2010). Siendo altamente eficaz para inhibir el crecimiento de muchos patógenos (Navarro *et al.*, 2017).

1.7.3 Reuterina contra *Staphylococcus aureus* y MRSA

Chimchang J y *et al*, (2015) realizaron un estudio para detectar sustancias antimicrobianas y actividad en 200 aislados de *Lactobacillus*. Se produjo reuterina y se demostró una potente actividad antimicrobiana contra siete cepas indicadoras patógenas con actividades inhibitorias muy fuertes contra *S. aureus*. (Chimchang *et al.*, 2015). Rivera-Ortiz y colaboradores (2017) realizaron una investigación en la cual se midió el efecto de la concentración de reuterina en la inhibición de diferentes microorganismos, entre ellos *Staphylococcus aureus*; el cual fue el patógeno más resistente que mostró resistencia de hasta 1,5 mM de reuterina, demostrando que si tiene efecto antimicrobiano contra estos patógenos sin embargo hay escasa información acerca del potencial de la reuterina para inhibir cepas de MRSA y no se ha demostrado la relación filogenética con clonas pandémicas internacionales.

1.8 Hipótesis

La reuterina es capaz de inhibir las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina relacionadas filogenéticamente con clonas pandémicas, por lo tanto, tiene el potencial de ser utilizada como un método para su control.

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto antimicrobiano de la reuterina sobre cepas de MRSA filogenéticamente relacionadas con clonas de circulación internacional.

1.9.2 Objetivos específicos

- Comparación de los perfiles filogenéticos de las cepas aisladas de trabajos anteriores (Ortiz-Rivera, 2009) con clonas pandémicas de circulación internacional.
- Producción y cuantificación de reuterina
- Determinación de la susceptibilidad a diferentes concentraciones de reuterina contra cepas MRSA.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Resiembra de *Staphylococcus aureus*

Se resembraron las cepas de MRSA en caldo nutritivo, 100 µL de la cepa en 5 mL de caldo nutritivo y fueron incubadas por 24 horas a 37 °C en agitación.

2.2 Comparación de los perfiles filogenéticos de las cepas MRSA

Se realizó el análisis visual de los perfiles filogenéticos de trabajos obtenidos anteriormente mediante electroforesis de campos pulsados (Ortiz-Rivera, 2009) comparando entre sí los carriles identificando las diferencias y similitudes en el patrón de bandeo de las diferentes cepas MRSA seleccionando las que pertenecen a la clona Nueva York/Japón.

2.3 Producción y cuantificación de reuterina

La producción de reuterina se llevó a cabo utilizando un protocolo de dos pasos, el cual consiste en la producción de células de *Lb. Reuteri* en condiciones óptimas para el crecimiento celular, seguido por la biotransformación de glicerol a 3-HPA por células en reposo incubadas en solución acuosa de glicerol (Dolyeres *et al.*, 2005).

2.3.1 Preparación y siembra del pre cultivo

Se preparó caldo MRSA (para inocular *Lb. reuteri*) del cual se pesaron 2.55 g de polvo de caldo MRS y se disolvieron en 50 mL de agua. Posteriormente se transfirió el caldo a tubos de 5 mL, obteniéndose 10 tubos con 5 mL de caldo MRS cada uno. Una vez transferidos se procedió a esterilizarlos en la autoclave.

Se inoculó al 1% en caldo MRS el cultivo de *Lactobacillus reuteri* cepa ATCC 55730, la cual se encontraba refrigerada a -70 °C, posteriormente se incubó a 37°C durante 15 horas.

2.3.2 Preparación del medio de cultivo

Se pesaron 25.5 g de polvo del caldo MRS los cuales se disolvieron en 500 mL de agua. Este procedimiento se realizó por duplicado para obtener 1 litro de caldo MRS, y posteriormente, se disolvieron 3.5 mL de glicerol en un litro de caldo MRS.

2.3.3 Inoculación del precultivo y el medio de cultivo

Una vez que el precultivo de *Lactobacillus reuteri* ya había crecido en su periodo de incubación en los tubos de 5 mL, se transfirió un tubo de 5 mL con el precultivo a 500 mL de caldo MRS (quedando al 1%). Se realizó el mismo procedimiento por duplicado (se obtuvo 1 litro de caldo MRS) y posteriormente se incubaron a 37°C por 15 horas.

Pasado el tiempo de incubación del cultivo del caldo MRS al 1% se transfirieron a tubos Falcon de 50 mL colocándose 50 mL del cultivo. Posteriormente, se centrifugaron a 1500 rpm a 20°C por 10 minutos. Al centrifugarse se formó un

sedimento de color blanco, la pastilla de *Lactobacillus reuteri* y el sobrenadante fue desechado por completo. Después se realizaron los lavados de *Lb reuteri* con 10 mL de buffer fosfato a pH 7 y se desechó el sobrenadante.

Se pesó un tubo Falcon vacío con su tapadera y sobre ese peso se le agregó 1 g del sedimento de *Lb. reuteri*. Se obtuvieron 4 g totales del sedimento, por lo cual, fueron 4 tubos diferentes pesados con 1 g de sedimento de *Lb. reuteri*.

2.3.4 Producción y cuantificación de reuterina

A cada uno de los cuatro tubos obtenidos en el apartado anterior, se agregaron 30 mL de glicerol, se disolvió bien y se incubaron por 2 horas a 37°C. Una vez terminado el periodo de incubación, se centrifugaron a 4°C por 20 minutos a 12,000 rcf. Una vez separadas las fases, se formó una vez más un sedimento de *Lb. reuteri* el cual se desechó; el sobrenadante se recuperó, se filtró y se transfirió a otros tubos nuevos, limpios y estériles, el filtrado es considerado el extracto acuoso de reuterina. Se cuantificaron los cuatro tubos Falcon de reuterina que se obtuvieron, para esto se realizó una disolución 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 fue incubada a 40°C durante 50 minutos y posteriormente se leyó la absorbancia a 560 nm, en donde el blanco utilizado fue la misma preparación de la mezcla pero sin la dilución de reuterina. Se realizó una curva de calibración con acroleína; la cual resulta de la transformación del 3-HPA, misma vía de la reuterina que a condiciones de temperatura elevadas se puede deshidratar a acroleína. Se utilizaron diferentes concentraciones de acroleína midiéndose su absorbancia a 560 nm, y a partir de la ecuación de la recta se determinaron las concentraciones de reuterina.

2.4 Evaluación del efecto antimicrobiano de reuterina con cepas MRSA

La evaluación del efecto antimicrobiano de reuterina sobre las cepas MRSA se realizó mediante el método de concentraciones inhibitorias mínimas (MIC), el cual se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibirá 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 *S. aureus* se midió la absorbancia en la cual su densidad óptima debía de ser 0.6 a 595 nm sí resultaba mayor se debía hacer una dilución con caldo nutritivo hasta obtenerla. 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 fueron inoculadas las bacterias en una placa de 96 pozos en un medio de crecimiento líquido en presencia de diferentes concentraciones de reuterina. En cada pozo se agregaron 150 μ L de la dilución bacteriana y 150 μ L de cada concentración de reuterina (realizándose por cada cepa). Como control positivo se agregaron 150 μ L de dilución bacteriana y 150 μ L de agua inyectable y como control negativo se agregaron 150 μ L de caldo con 150 μ L de agua inyectable. El crecimiento se evaluó después de la incubación durante un periodo de 24 horas y se leyeron las absorbancias para determinar el valor MIC.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Comparación de los perfiles filogenéticos de las cepas MRSA

Ortiz Rivera (2009) y Delgado Gardea (2011) realizaron la tipificación por electroforesis de campos pulsados a diferentes cepas de *S.aureus* del tipo MRSA y cepas susceptibles a meticilina aisladas de diferentes hospitales en Chihuahua. En la figura 6 se observa que las cepas de los carriles 2 al 10 están conservadas genéticamente y pertenecen al linaje de la clona N/J que se encuentra en el carril 11. Además, se observan las diferencias con las cepas susceptibles a meticilina de los demás carriles (Ortiz-Rivera, 2009).

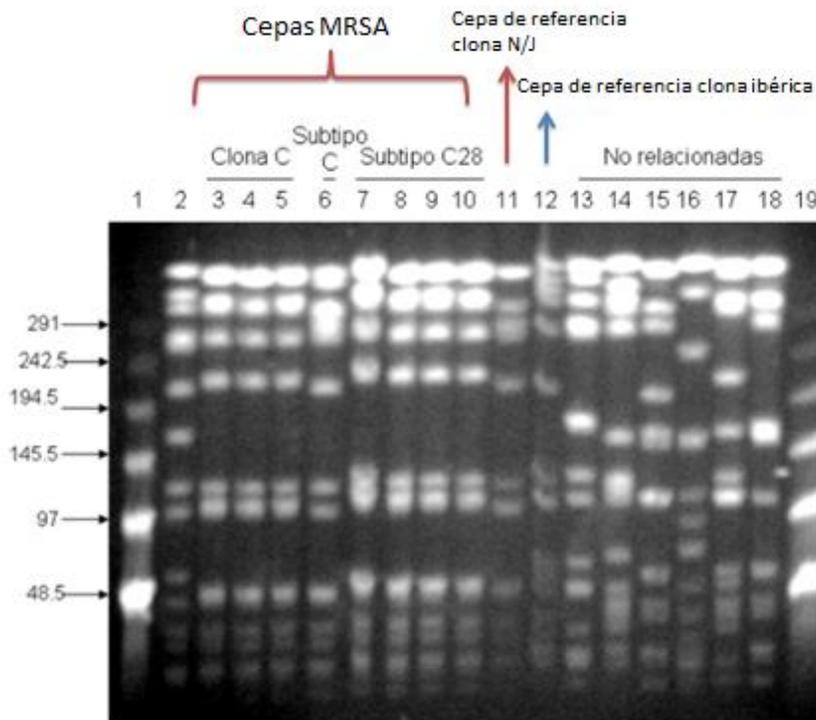


Figura 6. Tipificación por electroforesis de campos pulsados de diferentes cepas *S aureus* susceptibles a meticilina y resistentes a meticilina aisladas en diferentes hospitales en Chihuahua.

En este trabajo también se encontró una clona mayoritaria relacionada con la clona N/J y sus subtipos (Delgado-Gardea, 2011). Como se observa en los carriles 4 a 14 (Figura 7) las cepas encontradas también estuvieron genéticamente relacionadas con la clona NY/J observando claramente las diferencias con la clona ibérica, pediátrica y húngara.

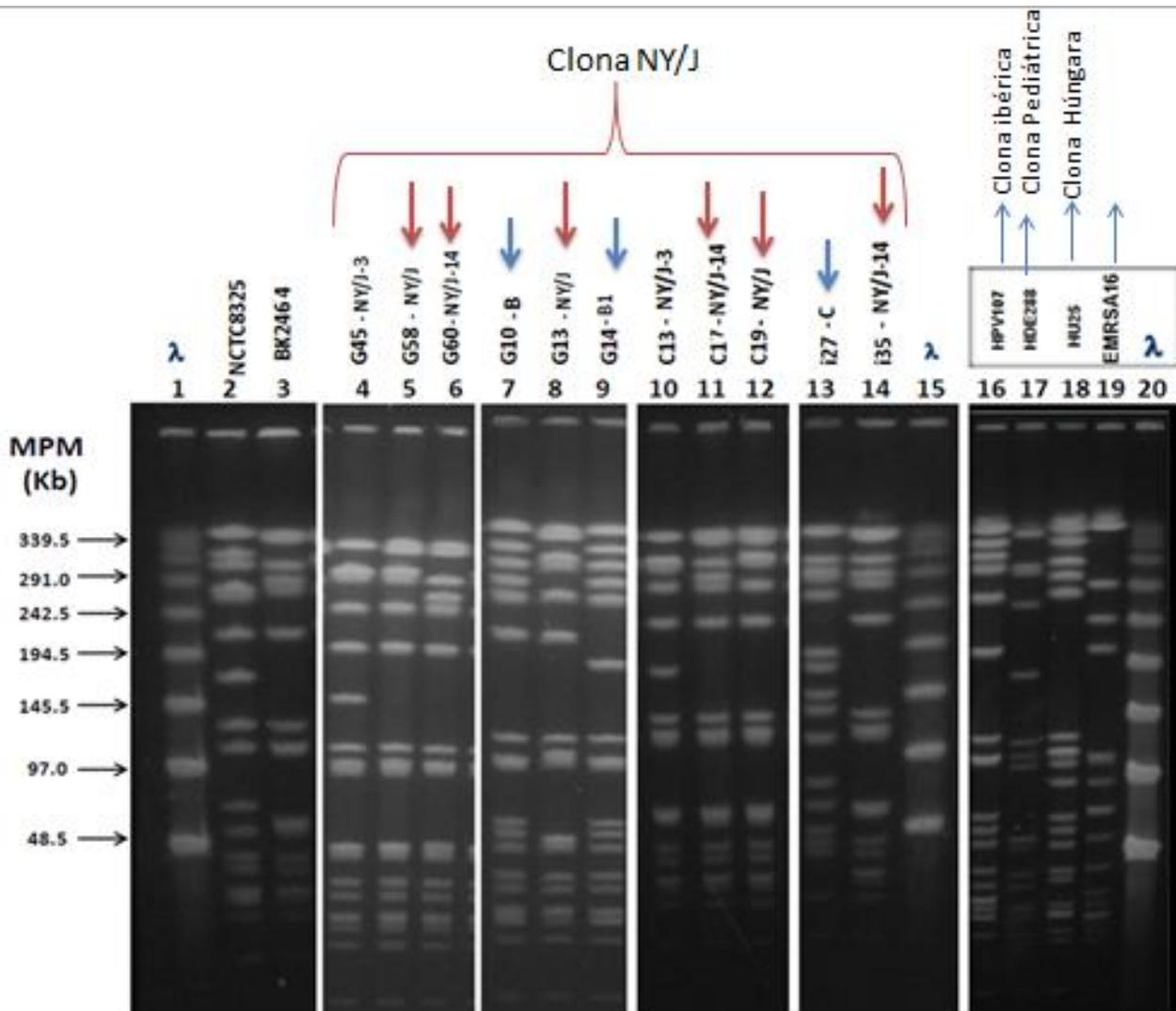


Figura 7. Tipificación por electroforesis de campos pulsados de diferentes cepas *S. aureus* aisladas de diferentes hospitales en Chihuahua.

De esta manera, se identificaron los perfiles genéticos conservados entre las cepas MRSA coincidiendo con la conclusión global de los estudios del proyecto CEM/NET (1997), que los MRSA tienen una estructura clonal conservada en comparación con los *S. aureus* sensibles a meticilina (los cuales tienen patrones electroforéticos muy diferentes), y que un número reducido de clonas cuentan con la capacidad de diseminación global, las clonas pandémicas (Velázquez-Meza, 2005). Las cepas MRSA identificadas pertenecen al linaje de la clona Nueva York /Japón siendo las cepas que se utilizaron en esta investigación.

3.2 Producción y cuantificación de reuterina

Para la cuantificación de reuterina se realizó la curva de calibración con acroleína a partir de estándares con concentración conocida y se realizaron las lecturas a una absorbancia de 560 nm (Figura 8). La acroleína se puede formar a partir del 3-HPA mediante deshidratación química espontánea en condiciones de pH ácido o temperatura elevada.

Concentración (µg)	Absorbancia (560nm)
10	0,065
15	0,109
30	0,271
50	0,557
60	0,702
80	0,988
100	1,203
150	1,889

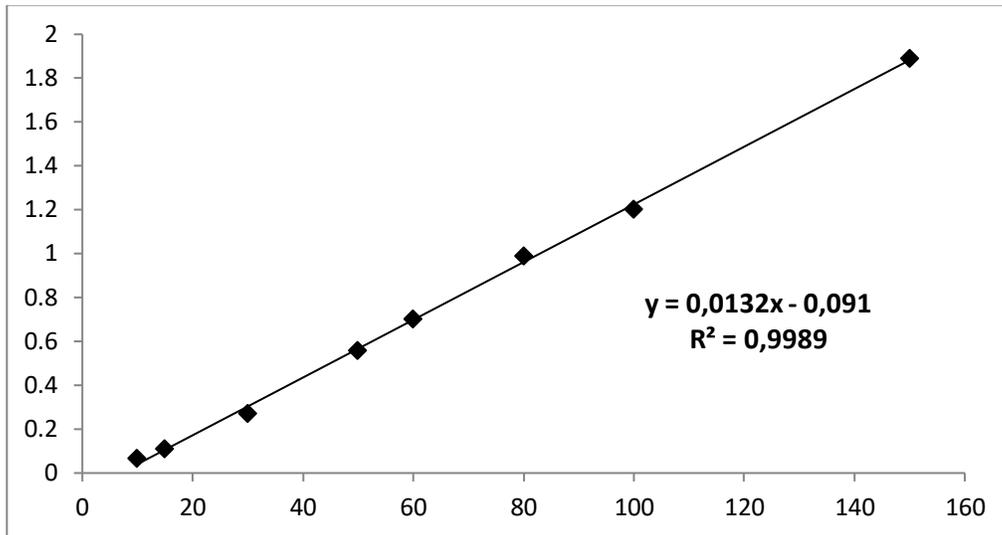


Figura 8. Curva de calibración de acroleína eje (x) diferentes concentraciones de acroleína, eje (y) absorbancia obtenida a 560 nm.

Posteriormente, se realizaron los cálculos para determinar la concentración de reuterina que se produjo a partir de la ecuación de la recta y la absorbancia obtenida de reuterina de 0.922 en la que dio como resultado una concentración de 43.32 mM. La concentración de reuterina es uno de los factores que influyen en su estabilidad. Cuando la concentración de reuterina es superior a 4.9 M la forma que predomina es el dímero; cuando la concentración es menor a 1.4 M, predomina el HPA hidratado, forma que prevalece a concentraciones bajas, incluso menores de 0.03 M, que son las empleadas en la mayoría de las investigaciones en las que la reuterina se utiliza como antimicrobiano. El almacenamiento se mantuvo a 4°C el cual no genera cambios químicos en su estructura y puede durar hasta 150 días (Vollenweider *et al.*, 2003).

3.3 Evaluación del efecto antimicrobiano de la reuterina contra cepas MRSA

Al estar filogenéticamente relacionadas tienen diferencias mínimas por lo cual el efecto que tiene la reuterina en una cepa de una clona MRSA tendrá un efecto similar en las demás cepas. Los resultados muestran evidencia que entre más alta era la concentración de reuterina que se le agregó al cultivo de la clona Nueva York/Japón 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 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.

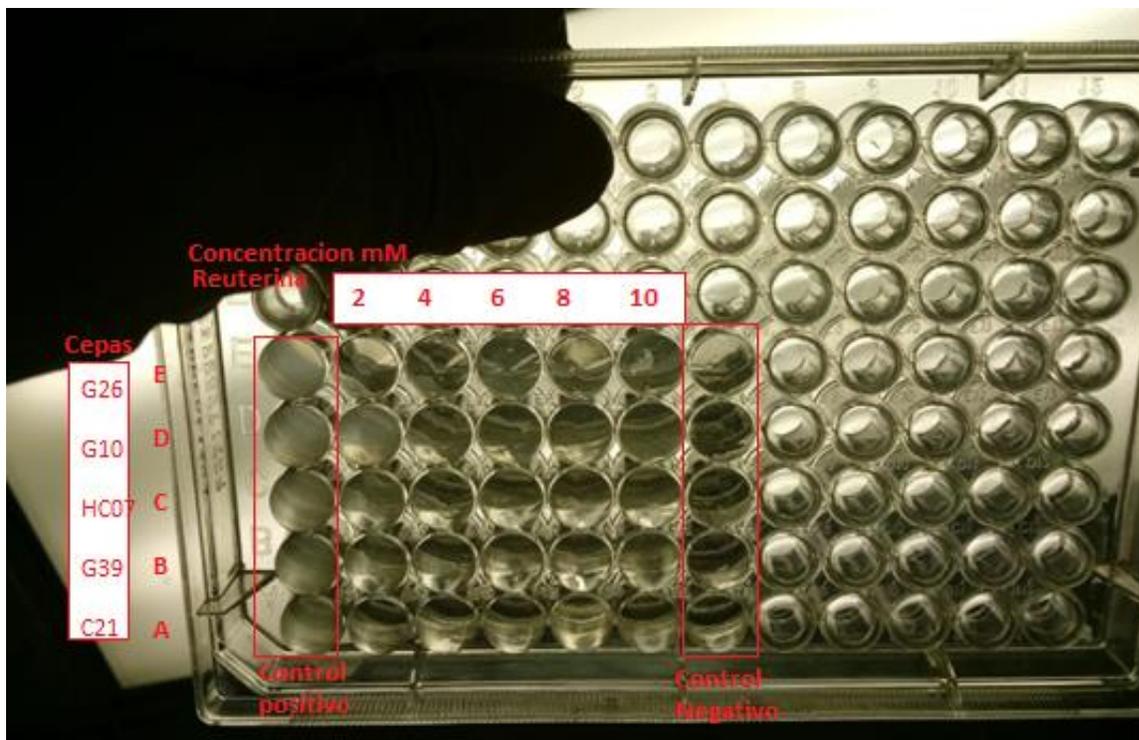


Figura 9. Disminución de turbidez de la clona Nueva York/Japón con diferentes concentraciones de reuterina A (C21) B (G39) C (HC07) D (G10) E (G26) 1(Control positivo agua y bacteria) ,2 (Reuterina 2mM),3 (4mM),4 (6mM),5 (8mM) 6 (10mM) y 7 (Control - caldo y agua inyectable).

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 MRSA, a partir de estos resultados el rango de inhibición de la reuterina contra cepas MRSA 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 la bacterias a partir de la concentración de 2 mM.

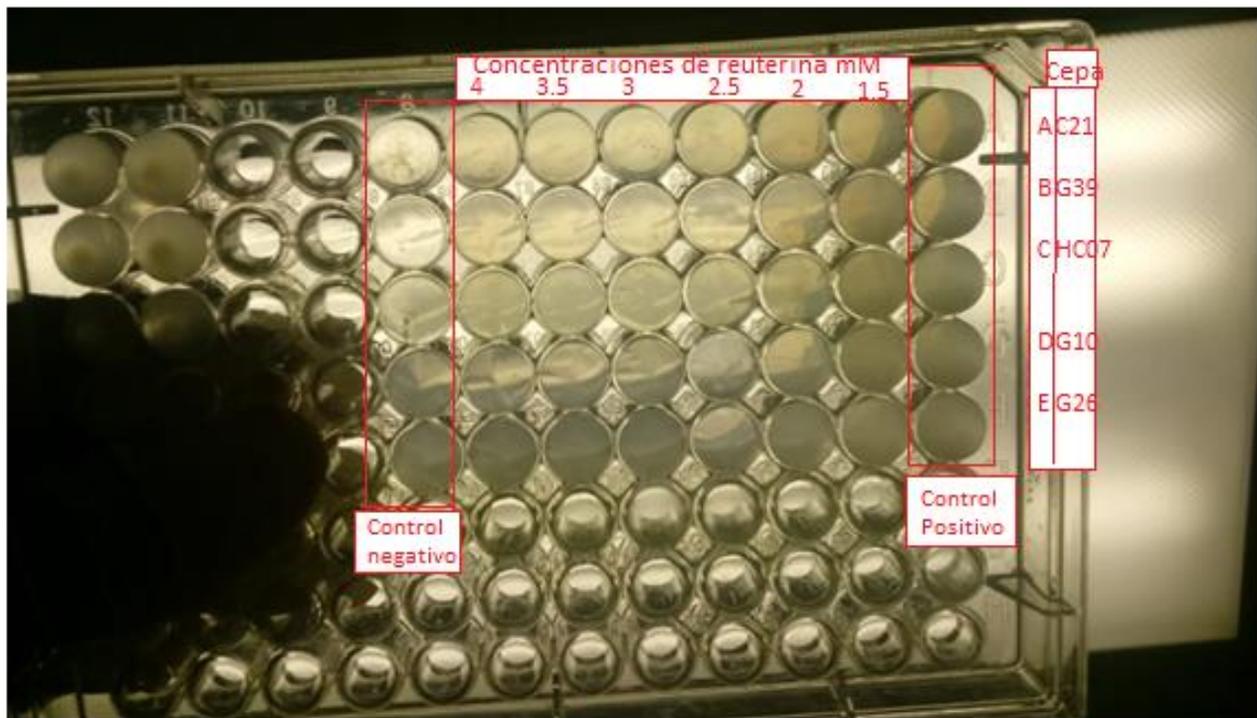


Figura 10. Disminución de turbidez de la clona Nueva York/Japón con diferentes concentraciones de reuterina A (C21) B (G39) C (HC07) D (G10) E (G26) 1(Control positivo agua y bacteria) ,2 (Reuterina 1.5mM),3 (2mM),4 (2.5mM),5 (3mM) 6 (3.5mM), 7 (4mM) 8 (Control - caldo nutritivo y agua inyectable).

Se realizó este procedimiento para todas las cepas, realizándolo por triplicado identificando la concentración en la cual ya no se observó turbidez, graficando los valores en la siguiente gráfica, ver figura 11.

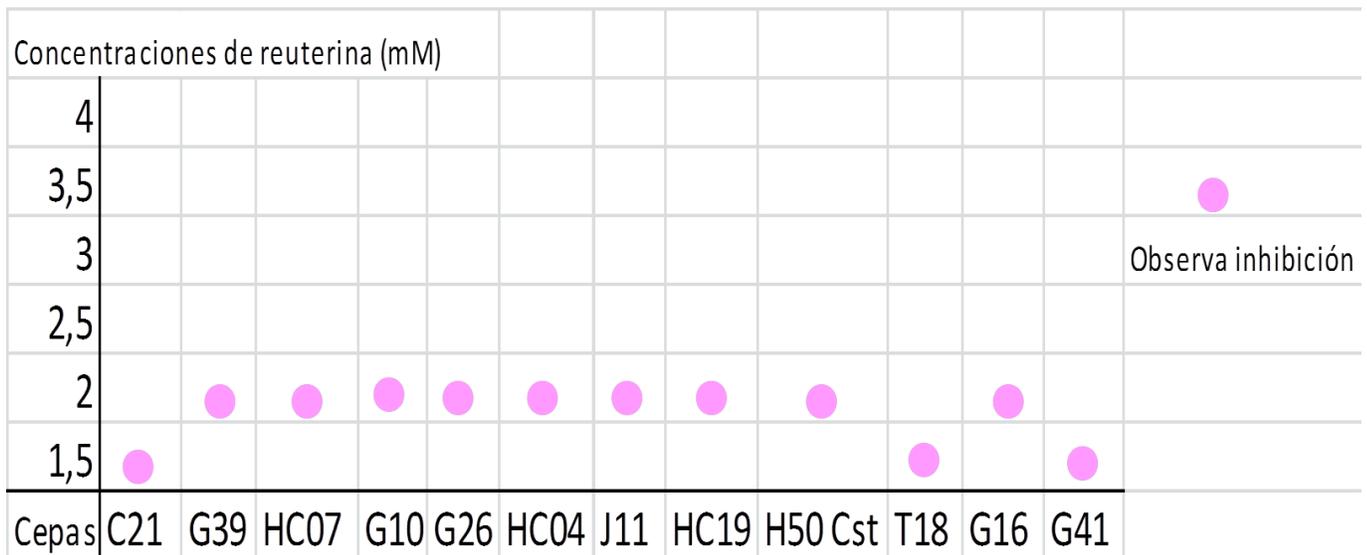


Figura 11. Concentración de reuterina la cual se observa inhibición en diferentes cepas MRSA.

Los resultados obtenidos mostraron que en todas las cepas ya no se observó turbidez a partir de la concentración de 1.5-2mM. Indicando que la concentración mínima inhibitoria está en un rango de 1.5- 2mM.

Por último se midieron los valores MIC de las 3 repeticiones de cada cepa, obteniendo en el Cuadro III el promedio de los resultados, en el cual la fila de la letra A corresponden al control positivo y la fila de la letra H al control negativo ajustado como blanco, en donde se observa el mismo comportamiento de la disminución de la absorbancia acercándose al control negativo.

Cuadro III. Promedio de los valores MIC de cada cepa de la prueba de susceptibilidad a reuterina

	C21	G39	HC07	G10	G26	I 18	G16	G41	HC04	J11	HC19	H50 CST
A	0,466	0,507	0,487	0,394	0,4083	0,459	0,42667	0,31967	0,591	0,506	0,4491	0,733
B	0,049	0,0473	0,088	0,0833	0,143	0,1213	0,026	0,195	0,2232	0,165	0,2133	0,272
C	0,048	0,1593	0,0403	0,048	0,036	0,034	0,02867	0,03067	0,1108	0,04544	0,1878	0,04
D	0,156	0,045	0,0317	0,0527	0,0267	0,0353	0,02933	0,1	0,0624	0,04533	0,0896	0,05
E	0,049	0,0537	0,0437	0,0463	0,0357	0,1357	0,034	0,04833	0,0362	0,06078	0,1176	0,055
F	0,042	0,0437	0,033	0,043	0,029	0,0383	0,02333	0,054	0,0349	0,06267	0,1164	0,068
G	0,028	0,0353	0,0437	0,0287	0,0227	0,035	0,024	0,02667	0,0697	0,03167	0,0469	0,048
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Se calcularon las desviaciones estándar de las tres repeticiones realizadas por cada cepa

Cuadro IV. Desviaciones estándar de las repeticiones de los valores MIC de cada cepa

	C21	G39	HC07	G10	HC04	J11	HCL19	H50CST	G26	I 18	G16	G41
A	0,003	0,0026	0,003	0,0017	0,0564	0,0325	0,0075	0,09107	0,0012	0,002	0,0348	0,16
B	0,001	0,0015	0,001	0,0618	0,0447	0,0117	0,01695	0,03057	0,001	0,15473	0,001	0,098
C	6E-04	0,2084	0,0006	8E-18	0,0101	0,0248	0,03217	0,0019	0	0	0,0006	0,016
D	0,001	8E-18	0,0006	0,0012	0,0506	0,004	0,00608	0,0108	0,0006	0,00058	0,0006	0,05
E	6E-04	0,0021	0,0006	0,0015	0,0056	0,0082	0,00964	0,01577	0,0006	0,17696	0,001	0,024
F	0,002	0,0006	0	0,001	0,0033	0,028	0,03736	0,01469	0,001	0,00058	0,0006	0,027
G	6E-04	0,0012	0,0015	0,0006	0,0674	0,0047	0,00434	0,00379	0,0006	0,001	4E-18	0,013

Se confrontaron 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 MRSA al ser hospitalarias son multirresistentes y persistentes, lo cual puede ser la causa de que su MIC este entre el rango de 1.5-2 mM.

3.4 Conclusiones

A partir de la concentración 1.5-2mM de reuterina se mostró inhibición en las distintas cepas de la clona NY/J demostrando que si tiene efecto antimicrobiano contra las cepas MRSA por lo cual tiene el potencial de ser utilizada para su método de control.

3.5 Difusión de resultados

1er CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA REUTERINA CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA) RELACIONADAS FILOGENÉTICAMENTE CON CLONAS PANDÉMICAS INTERNACIONALES

Fabiola Ivonne Flores Ramírez, Yuridia Ortiz Rivera

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez



Introducción

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria con un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades siendo uno de los microorganismos que se aísla con mayor frecuencia en las infecciones hospitalarias (Tong *et al.*, 2015). Representa una gran amenaza al tener un tratamiento difícil de manejar debido a la aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos como las cepas de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (Taylor & Unakal, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista en el 2017 de las bacteria que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos en la cual se encuentran las cepas MRSA en el nivel **Prioridad 2: ELEVADA**. Además han surgido clones de cepas MRSA que causan un problema de salud pública mundial, identificando por medio de electroforesis en gel de campo pulsado cinco clonas pandémicas: Clona Ibérica, Clona Brasileña, Clona Húngara, Clona Nueva York/Japón, y Clona Pediátrica (Velázquez-Meza, 2005). Actualmente se encuentran distribuidas por todo el mundo reflejando su amplia habilidad para causar infecciones, persistir y diseminarse de una región a otra, y aun a diferentes continentes (Bustos-Martínez, 2006). Por lo cual es de suma importancia investigar nuevas opciones de control para estas cepas. Una opción que está siendo explorada en la actualidad es utilizar probióticos, que son capaces de controlar microorganismos patógenos y no han generado resistencia a estos antibióticos naturales. Los *Lactobacillus* spp. son uno de los probióticos más utilizados en donde se encuentra *Lactobacillus reuteri* (Mu *et al.*, 2018), el cual produce reuterina; una sustancia antimicrobiana altamente eficaz para inhibir el crecimiento de muchos microorganismos (Ortiz-Rivera *et al.*, 2017).

Hipótesis

La reuterina es capaz de inhibir las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina relacionadas filogenéticamente con clonas pandémicas, por lo tanto, tiene el potencial de ser utilizada como un método para su control.

Objetivo

Evaluar el efecto antimicrobiano de la reuterina sobre cepas de MRSA filogenéticamente relacionadas con clonas de circulación internacional.

Metodología



Resultados

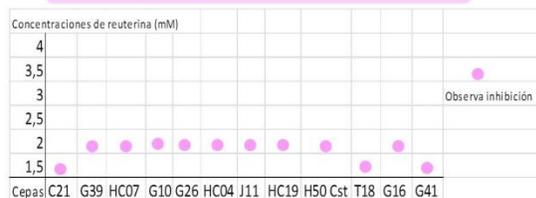


Figura 1. Concentración de reuterina la cual se observa inhibición en diferentes cepas MRSA

Discusión

Al estar filogenéticamente relacionadas tienen diferencias mínimas por lo cual el efecto que tiene la reuterina en una cepa de una clona MRSA tendrá un efecto similar en las demás cepas. 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 la bacterias en las concentraciones que se muestran en la figura 1.

Conclusión

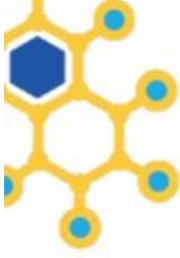
A partir de la concentración 1.5-2mM de reuterina se mostró inhibición en las distintas cepas de la clona NY/J demostrando que si tiene efecto antimicrobiano contra las cepas MRSA por lo cual tiene el potencial de ser utilizada para su método de control.

Bibliografía

- 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.
- Tong, Steven YC, Davis, Joshua S., Eichenberger, Emily, Holland, Thomas L. y Fowler, G. Vance Jr Infecciones por *Staphylococcus aureus* : Epidemiología, Fisiopatología, Manifestaciones clínicas y Manejo. Clin Microbiol Rev, 2015.
- Tracey A. Taylor; Chandrashekar G. Unakal (2017). *Staphylococcus aureus*. StatPearls - NCBI Bookshelf. Recuperado en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/?report=printable>.
- 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.
- Ortiz-Rivera, Y. Sánchez-Vega, R. Gutiérrez-Méndez, N. León-Félix, J. Acosta-Muñiz, 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>
- Velázquez-Meza, Maria Elena (2005) Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas. Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca 47:381-387



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ
 INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS
 DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS BIOLÓGICAS
 OTORGA LA PRESENTE



CONSTANCIA

A: Fabiola Ivonne Flores Ramírez y Yuridia Ortiz Rivera

Por su participación en modalidad *cartel* titulado:

“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA REUTERINA CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA) RELACIONADAS FILOGENÉTICAMENTE CON CLONAS PANDEMICAS INTERNACIONALES”

Impartida en el 1^{er} Congreso Internacional de Ciencias Químico Biológicas
 realizado en Ciudad Juárez, Chihuahua del 4 al 6 de Noviembre del 2019.

“POR UNA VIDA CIENTÍFICA, POR UNA CIENCIA VITAL”



C.D. Salvador David Nava Martínez
 Director del Instituto de Ciencias Biomédicas



Dr. José Alberto López Díaz
 Jefe del Departamento de Ciencias Químico Biológicas



Dra. Coyolxauhqui Figueroa Batalla
 Coordinadora del Comité Organizador



ICB



LITERATURA CITADA

- 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 3-hydroxypropionaldehyde using a two-step process with *Lactobacillus reuteri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:467–474. DOI 10.1007/s00253-005-1895-4.
- 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 Community-Associated 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 methicillinresistant *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. Acosta-Muñiz, 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 3-hydroxypropionaldehyde 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; Chandrashekhar 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.