

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ACCIÓN DE CULTIVOS PROBIÓTICOS  
(*Bifidobacteria*) SOBRE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS (*E. coli*,  
*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* ) NOSOCOMIALES CON  
RESISTENCIA MICROBIANA**

**ALEXANDRA MONTIEL BLANCO  
CODIGO 107409**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
BOGOTÁ D.C  
2.010**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ACCIÓN DE CULTIVOS PROBIÓTICOS  
(*Bifidobacteria*) SOBRE CEPAS DE ENTEROBACTERIAS (*E. coli*,  
*Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter* ) NOSOCOMIALES CON  
RESISTENCIA MICROBIANA**

**ALEXANDRA MONTIEL BLANCO  
CODIGO 107409**

**Trabajo Final presentado para optar al título de Especialista en Ciencia y  
Tecnología de Alimentos.**



**DIRECTORA  
MARTHA STELLA HOLGUÍN  
BACTERIÓLOGA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESPECIALIZACIÓN EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS  
BOGOTÁ D.C  
2.010**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

**Director**

**Bogotá, Julio 2010**

*A mi padres y hermanas en especial a Maribel que siempre me apoyan y creen en cada una de las nuevas metas que me propongo y por supuesto a tí Dios que me permites ser cada día un mejor profesional llenando cada momento de mi vida de ilusión y fuerza para no desistir y alcanzar mis metas.*

*ALEXANDRA MONTIEL BLANCO*

## **AGRADECIMIENTOS**

La autora expresa sus agradecimientos

A la Profesora Martha Stella Holguín quien con su gran labor docente y académica me prestó colaboración y orientación en el desarrollo de mi trabajo.

A los Doctores Carlos Mario Montoya, Guillermo Alvarez y Martha Garzón quienes siempre me acompañaron desde mi sitio de trabajo.

A mis compañeros Carolina Suarez, Carolina Vives y Luis Carlos Veloza quienes compartieron sus conocimientos y experiencias para enriquecer mi trabajo.

A todo el personal del ICTA, en especial a Gregorio Medina quienes me acogieron en su laboratorio para poder ejecutar este proyecto.

## INDICE DE CONTENIDO

	Pag
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>12</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>16</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
3.1 GENERAL .....	18
3.2 ESPECÍFICOS .....	18
<b>4. MARCO TEORICO.....</b>	<b>19</b>
4.1 ALIMENTOS FERMENTADOS .....	19
4.2 PROBIÓTICOS .....	20
4.2.1 Mecanismo de acción de los probióticos. ....	21
4.2.2 Microorganismos usados como probióticos. ....	22
4.3 PROBIÓTICOS Y ENTEROBACTERIAS .....	25
4.3.1 <i>Eschericha coli</i> .....	26
4.3.2 <i>Klebsiella</i> .....	29
4.3.3 <i>Enterobacter</i> .....	29
4.4 INFECCIÓN NOSOCOMIAL .....	30
4.5 RESISTENCIA MICROBIANA.....	30
<b>5. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>33</b>

5.1 CEPAS BACTERIANAS .....	33
5.1.1 Activación de cepas.....	35
5.2 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE <i>Bifidobacterium bifidus</i> .....	37
5.3 ANALISIS DE LOS DATOS.....	39
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>40</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>47</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>49</b>

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pag</b>
<b>Tabla 1.</b> Microorganismos comúnmente usados como probióticos.....	24
<b>Tabla 2.</b> Características de las enteritis por <i>E. coli</i> .....	28
<b>Tabla 3.</b> Resultados de prueba de inhibición enterobacterias vs..... <i>Bifidobacterium bifidus</i> a una concentración de $34 \times 10^8$ ufc/ml	40
<b>Tabla 4.</b> Resultados de prueba de inhibición para <i>E.coli</i> ATCC y <i>E.coli</i> ..... BLEA a diferentes concentraciones del probiótico	42
<b>Tabla 5.</b> Resultados de prueba de inhibición para <i>K. pneumoniae</i> ATCC ..... y <i>K. pneumoniae</i> BLEA a diferentes concentraciones del probiótico	43
<b>Tabla 6</b> Resultados de prueba de inhibición para <i>Enterobacter</i> spp ..... BLEA y <i>Enterobacter</i> spp sin BLEA a diferentes concentraciones del probiótico	44



## INDICE DE FIGURAS

	Pag
<b>Figura 1.</b> <i>E.coli</i> ATCC 25922 en medio MacConkey.....	33
<b>Figura 2.</b> <i>E.coli</i> BLEA en medio MacConkey.....	34
<b>Figura 3.</b> <i>Enterobacter</i> spp en medio MacConkey.....	34
<b>Figura 4.</b> <i>Bifidobacterium bifidus</i> en medio MRS.....	35
<b>Figura 5.</b> Activación del patógeno.....	36
<b>Figura 6.</b> <i>Bifidobacterium bifidus</i> a concentración $34 \times 10^8$ ufc/ml en medio MRS antes de ser inoculado con el patógeno. ....	37
<b>Figura 7.</b> <i>Bifidobacterium bifidus</i> en medio MRS a diferentes concentraciones antes de ser inoculado con el patógeno.....	38
<b>Figura 8.</b> Prueba de inhibición para <i>E.coli</i> ATCC 25922 a concentración de $34 \times 10^8$ ufc/ml de <i>Bifidobacterium bifidus</i> .....	41
<b>Figura 9.</b> Prueba de inhibición para <i>E.coli</i> ATCC 25922 a diferentes concentraciones de <i>Bifidobacterium bifidus</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Prueba de inhibición para <i>K.pneumoniae</i> BLEA a diferentes concentraciones de <i>Bifidobacterium bifidus</i> .....	43
<b>Figura 11.</b> Prueba de inhibición para <i>Enterobacter</i> spp a diferentes concentraciones de <i>Bifidobacterium bifidus</i> .....	44
<b>Figura 12.</b> Halos de inhibición de <i>Bifidobacterium</i> a diferente concentración vs enterobacterias. ....	45

## RESUMEN

Los probióticos han mostrado ser de utilidad para el tratamiento de ciertos problemas en la salud gracias a la gran cantidad de sustancias que producen como bacteriocinas, y péptidos antimicrobianos, que tienen capacidad antagónica contra otros microorganismos. Este poder inhibitorio se analizó frente a ciertas enterobacterias que generan afecciones de tipo gastrointestinal y enfermedades de tipo nosocomial como la *E. coli*, *K.pneumoniae* y *Enterobacter* spp, que además han desarrollado resistencia a los antibióticos, debido a las llamadas betalactamasas de espectro extendido o ampliado (BLEE y BLEA) capaces de lograr resistencia a las cefalosporinas de tercera generación, monobactámicos y aminoglucósidos, lo cual es un serio problema tanto en el tratamiento de las sepsis nosocomiales en pacientes hospitalizados como de salud pública. El probiótico analizado fue el *Bifidobacterium bifidus* que se emplea en gran cantidad de alimentos funcionales que se encuentran en el mercado. El método utilizado para evaluar este poder fue una técnica modificada de gota en doble capa de agar MRS y nutritivo con la cual se valora la presencia de halo de inhibición y el tamaño en mm de diámetro del halo.

Todas las enterobacterias analizadas fueron inhibidas por el probiótico y la que mayor sensibilidad presentó fue la *E.coli* seguida de la *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp, confirmándose así que los probióticos y alimentos funcionales con estos, se podrían convertir en una excelente alternativa para complementar terapias antimicrobianas.

Palabras clave: Probiótico, Betalactamasas, Infección Nosocomial, Enterobacteria, Inhibición de crecimiento.

## ABSTRACT

The probiotics have proved to be usefulness for the treatment of certain problems in the health thanks to the great quantity of substances that produce like bacteriocins, and antimicrobial peptides, which have antagonistic capacity against other microorganisms. Its inhibitory power was analyzed opposite to certain enterobacterias that generate affections of gastrointestinal type and diseases of nosocomial type as *E. coli*, *K.pneumoniae* and *Enterobacter* spp, in addition, they have developed resistance to the antibiotics, due to the named beta-lactamases of extended spectrum (ESBL) capable of achieving resistance to the cephalosporins of third generation, monobactamic and aminoglycosides, which is a serious problem so much in the treatment of the sepsis nosocomiales in patients hospitalized like of public health. The analyzed probiotic was the *Bifidobacterium bifidus* that is used in great quantity of functional food that is found on the market. The method used to evaluate this power was a modified of drop technology in double cap of agar MRS and nutrient with which is valued the presence of a halo of inhibition and the diameter size in mm of it.

All the analyzed enterobacterias were inhibited for the probiotic and the one which presented more sensibility was the *E.coli* followed by *K. pneumoniae* and *Enterobacter* spp, being confirmed this way that the probiotics and functional food might turn into an excellent alternative to complement antimicrobial therapies.

**Key words:** Probiotic, Beta-lactamases, nosocomial infection, enterobacteria, inhibition of growth

## INTRODUCCIÓN

El consumo de alimentos que proporcionen beneficios para la salud y que además tengan un alto valor nutritivo están generando gran interés, tal es el caso de los alimentos con probióticos definidos como “*organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped*”. (FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, y La OMS Organización Mundial de la Salud (2002); uno de los más usados es el género *Bifidobacterium* que comprende bacterias gram positivas, anaeróbicas, no móviles, con frecuencia ramificadas. Este género de bacterias ha mostrado eficiencia en la inhibición frente a patógenos <sup>1,2,3,4,5,6,7,8</sup> del intestino como la *E.coli*, enterobacteria que origina algunas enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), que también se puede asociar como causa frecuente de infecciones intrahospitalarias o nosocomiales.

Así mismo, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp, son epidemiológicamente las más involucradas con infecciones nosocomiales y además están en el grupo de las enterobacterias productoras de betalactamasas de tipo BLEA y BLEE<sup>9</sup>, lo cual es un serio problema en el tratamiento de estas infecciones.

Para el control de estos brotes nosocomiales<sup>10</sup> se han aplicado algunas medidas como, restricción en el consumo de cefalosporinas de tercera generación, aislamiento cutáneo de los pacientes colonizados/infectados y educación del personal sanitario en el lavado de manos y en el cuidado de la manipulación de los pacientes, pero estas medidas no han sido suficientes.

Si la capacidad antimicrobiana de los probióticos, también se presentara frente a cepas de recuperación hospitalaria con resistencia comprobada a antibióticos, se encontraría una posible alternativa para combatir el uso indiscriminado de estos agentes o se podrían utilizar como terapia complementaria de tratamiento para algunos pacientes, aprovechando que los alimentos con probióticos tienen una gran aceptación.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones de tipo gastrointestinal en especial las originadas por enterobacterias son un gran problema que enfrentan los servicios de salud <sup>11</sup> tanto la población adulta como infantil que en los últimos tiempos también se ha vuelto enfermedad de tipo nosocomial o sea que su contagio se da a nivel hospitalario generando grandes problemas como pequeñas epidemias que pueden prolongar la hospitalización de los pacientes y en ocasiones complicar las patologías de base de los mismos y si a esto se le suma la presencia de fracaso terapéutico en estas infecciones, el problema cada día se hace más grande y complicado. La resistencia que desarrollan estos microorganismos se debe a las llamadas betalactamasas de espectro extendido o ampliado BLEE, BLEA capaces de lograr resistencia bacteriana a las cefalosporinas de 3<sup>ra</sup> generación, monobactámicos y aminoglucósidos lo cual es un serio problema en el tratamiento de las sepsis nosocomiales y un problema de salud pública <sup>12</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado o extendido (BLEA), son un grupo de enzimas de codificación plasmídica, derivadas de las  $\beta$ -lactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV (nombre proveniente de Temoniera, paciente griega en quien primero se detectó) y sulfhidrilo por sustitución de uno o más aminoácidos (denominada SHV).

En 1983, se detectaron en Alemania los primeros aislamientos clínicos de *K.pneumoniae* y *E. coli* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y sensibles a cefoxitina. El análisis de estas cepas, demostró con posterioridad que la resistencia era debida a la producción de una  $\beta$ -lactamasa plasmídica transferible derivada de SHV-1 que se denominó SHV-2. Desde entonces, se han descrito por todo el mundo numerosas enzimas tipo TEM y SHV con este fenotipo de resistencia.

La frecuencia de BLEA difiere según el área geográfica e institución de salud. El programa SENTRY (programa de vigilancia epidemiológica y de resistencia microbiana con sede en Brasil, pero que trabaja para Latinoamérica) las reporta con un 45% de frecuencia en Latinoamérica y solo 7% en los EE.UU. En los EE.UU la *K. pneumoniae* es la más reportada.

Epidemiológicamente, enterobacterias productoras de BLEA se han aislado con mayor frecuencia en muestras procedentes de pacientes hospitalizados, pero también pueden encontrarse en muestras de origen comunitario. Estos aislamientos pueden aparecer de forma esporádica, sin relación epidemiológica, o dar lugar a brotes nosocomiales. La mayoría de estas epidemias afectan a pocos pacientes (10 a 20) en un periodo corto de tiempo, pero cada vez es más frecuente la descripción de brotes nosocomiales más extensos.

El tubo digestivo actúa como reservorio de estos microorganismos multirresistentes; además es el nicho ecológico adecuado para que la resistencia se transmita a otras especies bacterianas. En casos de epidemia, la colonización fecal de los pacientes ingresados en unidades de riesgo puede llegar a más del 40%.<sup>11</sup>

Dentro de las enterobacterias productoras de BLEA, *K. pneumoniae* es la especie que con mayor frecuencia causa brotes nosocomiales, seguida de *E. coli*<sup>11</sup>. También se han encontrado otras especies como *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, etc.

Las primeras epidemias de infección hospitalaria por *K. pneumoniae* productora de BLEA fueron descritos en Francia a finales de los ochenta. Desde entonces se han documentado por todo el mundo numerosos brotes nosocomiales causados por enterobacterias productoras de BLEA. Un estudio multicéntrico realizado en Unidades de Cuidados Intensivos de 10 países europeos, demostró que el 22,8% de aislamientos de *Klebsiella* spp eran productoras de BLEA, siendo *K. pneumoniae* la especie más importante.

La aparición de brotes nosocomiales debido a estos microorganismos depende tanto de las condiciones ambientales (elevado consumo de cefalosporinas de tercera generación, manipulación de los pacientes, etc.) como de las características especiales del microorganismo (factores de virulencia, adherencia, etc.). Los factores de riesgo para adquirir infección/colonización son el consumo de antibióticos (especialmente cefalosporinas) y la cateterización arterial y/o urinaria.

En Latinoamérica no se habían reportado BLEA hasta 1985. En 1985 en Chile se informó la primera *K. pneumoniae* BLEA derivada de SHV y se denominó SHV

En Colombia los servicios de salud a nivel Nacional reportan diariamente las infecciones gastrointestinales<sup>11</sup> como un gran problema y su resistencia a los antibióticos por los agentes causales cada vez más alta, desde 1990 se viene haciendo recuperación de información sobre la presencia de estos microorganismos y se están desarrollando estudios de monitoreo de los mismos.

Para el control de estos brotes nosocomiales<sup>10,12</sup> se han aplicado medidas como restricción en el consumo de cefalosporinas de tercera generación, aislamiento cutáneo de los pacientes colonizados/infectados y educación de personal sanitario en el lavado de manos y en el cuidado de la manipulación de los pacientes. La restricción en el consumo de cefalosporinas se relaciona en muchas ocasiones con el control del brote, señalándose como la medida más efectiva. La descontaminación intestinal selectiva como medida de control en estos brotes, sugerida por algunos autores, puede ocasionar el desarrollo de nuevas resistencias o la selección de otros microorganismos multirresistentes por lo que su utilidad está en entredicho y hoy día no se recomienda.

Sin embargo esta situación se ha vuelto un gran problema en todas las instituciones de salud, buscar soluciones es una premisa actual. Algunos estudios han mostrado que algunos microorganismos utilizados como probióticos, han presentado efectos inhibitorios en el crecimiento de microorganismos como *E.coli*<sup>8,13</sup>, entre otras enterobacterias y otros microorganismos transmitidos por alimentos, confirmando así la capacidad antimicrobiana<sup>14,15,16,17,18</sup> que tienen estos microorganismos.

Si esta capacidad antimicrobiana también se presentara frente a cepas de recuperación hospitalaria con resistencia comprobada a antibióticos se encontraría una posible alternativa para combatir el uso indiscriminado de antibióticos o se podría utilizar como terapia complementaria de tratamiento para algunos pacientes, los alimentos adicionados con probióticos tiene una gran aceptación por toda la población y son de fácil consecución en el mercado.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Ante estas grandes bondades y atributos referenciados de los efectos de los probióticos en la salud cabe la pena seguir explorando sus beneficios, una gran cantidad de los problemas de la salud están asociados a problemas de nutrición; los centros hospitalarios del país atienden diariamente un gran número de pacientes, entre los cuales, los problemas gastrointestinales representan un gran porcentaje.

En el Hospital el Tunal E.S.E., hospital de tercer nivel de atención, las infecciones gastrointestinales tienen un alto porcentaje de incidencia. En el 2008, el hospital, referencia 18 casos de infecciones gastrointestinales, correspondientes a un 2.57% de las infecciones presentadas<sup>11</sup>, los servicios más afectados fueron UCI Neonatal, Pediatría, Neurocirugía, y medicina interna.

En las infecciones presentadas los microorganismos recuperados fueron *E.coli*, *staphylococcus*, *klebsiella* y *Enterobacter* en la mayoría de los casos. Estos microorganismos se han asociado con presencia de resistencia a antibióticos en un alto y creciente porcentaje.

Hoy en día, ante el uso de una gran cantidad de antibióticos en el manejo de patologías en Hospitales se está presentando diseminación de la resistencia bacteriana, considerada actualmente como un fenómeno creciente alrededor del mundo y de gran complejidad<sup>10</sup>. Es por esto, que la Organización Mundial de la Salud, mediante resolución de 1998 la declaró como problema de Salud Pública y por lo tanto ha venido trabajando en la creación de una estrategia global, cuyos objetivos fundamentales, mediante la creación de una serie de intervenciones son, estimular la prevención y control de infecciones, retardar la emergencia de resistencia y reducir la diseminación de microorganismos resistentes.



Si con terapias complementarias que además mejoraran el estado nutricional del paciente se lograra contribuir a la reducción de este problema considerado como de salud pública, la calidad durante su periodo de hospitalización podría ser más corto y se podría reevaluar el uso de ciertos antibióticos, abriéndose la posibilidad de seguir explorando estrategias para el uso de productos (alimentos) con cultivos probióticos como complemento de terapias antimicrobianas; se estaría contribuyendo a la creación de nuevas alternativas para estimular la prevención y control de infecciones por enterobacterias con resistencia antimicrobiana.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GENERAL**

Evaluar *in vitro* la acción de los cultivo probióticos (*Bifidobacterium bifidus*) sobre cepas de enterobacterias nosocomiales (*E.coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp) con resistencia microbiana.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

Analizar la presencia de efecto inhibitorio de los cultivos probióticos (*Bifidobacterium bifidus*) frente a cepas de enterobacterias nosocomiales con resistencia a antibióticos.

Comparar la acción de los cultivos probióticos (*Bifidobacterium bifidus*) en la inhibición de cada una de las cepas de enterobacterias analizadas

## 4. MARCO TEORICO

### 4.1 ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos fermentados son aquellos cuyo procesamiento involucra el crecimiento y actividad de microorganismos como mohos, bacterias o levaduras (hongos microscópicos).

En esta categoría se encuentran el kumis, yogurt, el queso, el kéfir y otros. El hombre los ha consumido desde tiempo inmemorial. Los alimentos fermentados probablemente surgieron de forma accidental, y es gracias a estos afortunados errores que muchos alimentos se pueden conservar en buen estado por grandes períodos de tiempo.

Estos alimentos fermentados se preparan desde hace milenios. Muchos de estos procesos de fermentación se han tecnificado, y en la actualidad poderosas empresas los controlan por medio de la ingeniería bioquímica y frecuentemente usan microbios mejorados genéticamente<sup>19</sup> Aunque hay procesos de fermentación, que ya son muy bien conocidos y por lo mismo estos alimentos se consumen en todo el mundo, también hay muchísimas fermentaciones que son tradicionales y se produce de manera casera.

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (científico ruso, premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur en Paris) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) bacterias que son usadas en la fermentación de alimentos ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad. Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microbios útiles para sustituir a los microbios proteolíticos como *Clostridium* — productores de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, índoles, y amoníaco —. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a la que denominó “bacilo búlgaro.”

En 1917, antes del descubrimiento de Alexander Fleming de la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *E. coli* de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote grave de shigelosis. Los trastornos del tracto intestinal frecuentemente eran tratados con bacterias no patógenas viables, para cambiar o reemplazar la microflora intestinal. La cepa de *E.coli* de Nissle 1917 es uno de los pocos ejemplos de un probiótico no BAL.

Henry Tissier (del Instituto Pasteur) aisló por primera vez una Bifidobacteria de un lactante alimentado a pecho, a la que denominó *Bacillus bifidus communis*. Tissier postulaba que las bifidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan la diarrea y recomendó la administración de bifidobacteria a lactantes que padecían de este síntoma.

## 4.2 PROBIÓTICOS

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentos (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS 2.002) han declarado que hay evidencia científica para indicar el potencial de los probióticos que proporcionan beneficios en la salud y las cepas específicas son seguras para uso humano. La FAO y OMS los han definido como «*organismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio saludable en el huésped.*»

Hoy en día los cultivos probióticos poseen gran relevancia a nivel mundial, debido a que mediante numerosos estudios se ha logrado demostrar diversos efectos benéficos para el ser humano, tales como el favorecimiento del equilibrio de la microflora intestinal<sup>21,22,23,24,25</sup>, Estimulación del sistema inmune<sup>26,27</sup>, competencia contra patógenos<sup>19,28,29,30</sup>.

Los probióticos están destinados a ayudar a la microbiota intestinal que se aloja en el organismo naturalmente. Se han utilizado algunos preparados de probióticos para evitarla diarrea provocada por antibióticos<sup>30</sup>, o como parte del tratamiento para la disbiosis vinculada a los antibióticos. Hay estudios que documentan los efectos probióticos en una serie de trastornos gastrointestinales<sup>31,32,33,34,35,37</sup>, y extra intestinales, incluyendo las enfermedades inflamatorias del intestino (EII)<sup>26</sup> el síndrome de intestino irritable (SII), las infecciones vaginales, y las alteraciones de la inmunidad<sup>26</sup>. Algunos probióticos también han sido investigados en relación con el eczema atópico, la artritis reumatoidea, y la cirrosis hepática.

#### **4.2.1 Mecanismo de acción de los probióticos.**

Los mecanismos de acción de estos microorganismos aún se siguen estudiando; algunos autores creen la hipótesis que las bacterias probióticas:

1. Se instalan en la mucosa intestinal y ahí producen las sustancias inhibitorias que combaten la acción de las bacterias toxigénicas.<sup>14,24</sup>

Estas sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas; compuestos que reducen el número de células viables, afectan el metabolismo bacteriano o la producción de toxinas. En la industria alimenticia las BAL son utilizadas como conservadores biológicos por la producción de bacteriocinas que ejercen acción antibacteriana y contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.

2. Disminuyen el pH intestinal favoreciendo el crecimiento de organismos beneficiosos

.

3. Aumentan la resistencia a la colonización por competir con patógenos para unirse a los sitios de adhesión en la superficie del epitelio intestinal. Algunas cepas han sido escogidas por su habilidad de adherencia a las células epiteliales como *Lactobacillus* spp.<sup>24</sup>

4. Compiten por nutrientes. Las bacterias ácido lácticas pueden utilizar los nutrientes consumidos por organismos patógenos.

5. Estimulan la respuesta inmune. Evidencias recientes sugieren que la estimulación de la inmunidad innata y adquirida, protegen contra la enfermedad intestinal.

Estos microorganismos pueden alertar al sistema inmune y favorecer el rechazo de agentes infecciosos estimulando la producción de inmunoglobulina A (IgA), activando macrófagos e incrementando interferón gamma (IFN-gamma) y citoquinas proinflamatorias<sup>22,28</sup>

#### **4.2.2 Microorganismos usados como probióticos.**

Dentro de los cultivos probióticos con mayor aplicación comercial están las especies de Lactobacillo y Bifidobacteria. Existen 56 especies de Lactobacillos y 29 especies de Bifidobacteria, sin embargo, no todas muestran actividad probiótica. Krishnakumar y Gordon, (2001) (ver Tabla1), publicaron una lista de los cultivos comúnmente usados en yogurt y bebidas fermentadas con probióticos. Estos han sido evaluados en estudios clínicos y acreditados como cultivos probióticos. Varios de ellos se utilizan actualmente en el mercado de productos probióticos. La tendencia ha sido el utilizar de uno hasta cinco cultivos probióticos por producto lácteo fermentado, esto dependiendo de la estrategia de mercado, los factores benéficos deseados y la disponibilidad de cultivos.

Las especies que han tenido una mayor aplicación son *Bifidobacterium bifidus*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*, Krishnakumar y Gordon, (2001). En particular las especies de Bifidobacteria han recibido atención especial pues los estudios clínicos indican que, estos organismos predominan en el tracto intestinal de bebés alimentados con leche humana, donde alcanzan hasta un 95% de la flora intestinal. Se cree que las Bifidobacteria en infantes alimentados con leche materna son los responsables de la resistencia a infecciones entéricas. Gyorgy et. al. (1954) demostraron que la predominancia de Bifidobacteria en neonatos esta asociada a la presencia de oligosacáridos no degradables presentes en calostro humano, y leche humana. Estos factores selectivos son conocidos como “factores de crecimiento de Bifidus” y han dado lugar al desarrollo de los ingredientes prebióticos.

**Tabla 1.** Microorganismos comúnmente usados como probióticos

Especie	Cultivos
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La2, La5 (conocida como La1), Johnsonii (La1; conocida como Lj1), NCFM, DDS-1, SBT-2062
<i>L. bulgaricus</i>	Lb12
<i>L. lactis</i>	La1
<i>L. plantarum</i>	299v, Lp01
<i>L. rhamnosus</i>	GG, GR-1, 271, LB21
<i>L. reuteri</i>	SD2112 (conocida como MM2)
<i>L. casei</i>	Shirota, Immunitass, 744, 01
<i>L. paracasei</i>	CRL 431
<i>L. fermentum</i>	RC-14
<i>L. helveticus</i>	B02
<i>Bifidobacterium longum</i>	B536, SBT-2928
<i>B. breve</i>	Yakult
<i>B. bifidus</i>	Bb-11, Bb12
<i>B. essensis</i>	Danone (Bio Activia)
<i>B. animalis</i>	subsp lactis Bb-02
<i>B. infantis</i>	Shirota, Immunitass, 744, 01

Fuente: Krishnakumar y Gordon, (2001)



### 4.3 PROBIÓTICOS Y ENTEROBACTERIAS

Los probióticos han mostrado eficiencia inhibiendo patógenos del intestino como enterobacterias y otros<sup>28,29,30</sup>. Las enterobacterias son bacilos entéricos gram negativos, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa, no producen oxidasa y tienen una movilidad variable (que depende de la presencia de flagelos). Son la causa más frecuente de infecciones intrahospitalarias<sup>9,11</sup>, seguidas del *estafilococo*.

Se encuentran en el suelo, el agua y la vegetación; algunos forman parte de la flora intestinal normal del hombre. Algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (p.ej. *Yersinia pestis*, *Shigella* y *Salmonella*) se consideran patógenos primarios y se asocian siempre con enfermedad cuando se aíslan de muestras clínicas, mientras que otros (p.ej. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*) forman parte de la flora comensal normal y pueden causar infecciones oportunistas.

En pacientes hospitalizados las enterobacterias pueden producir brotes epidémicos debido a su transmisión a través del personal sanitario o por la instrumentación médica. Tienen un mecanismo fisiopatológico común: liberación de endotoxinas, que pueden causar sepsis por gramnegativos.

Son responsables de:

- 1/3 de los cultivos positivos de bacteriemia
- 2/3 de los cultivos positivos de gastroenteritis
- 3/4 de los cultivos positivos de infecciones urinarias.

En pacientes inmunocompetentes producen infecciones del tracto urinario o entéricas. Y En pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos: neumonías, sepsis, meningitis, abscesos abdominales, además de infecciones urinarias.

Entre las especies más importantes de enterobacterias encontramos: *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Morganella*, *Klebsiella*, *Providencia*, *Edwardsella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Yersenia*. Y estas además se relacionan con infecciones hospitalaria. Algunos Factores que han contribuido al incremento de infecciones por enterobacterias en hospitales son:

- uso frecuente de técnicas diagnósticas y terapéuticas agresivas
- empleo de potentes inmunosupresores
- estancias hospitalarias prolongadas
- desarrollo de resistencias
- ciertas enfermedades predispones a estas infecciones: enf. hematológicas, neoplasias, cirrosis uremia, diabetes.

#### **4.3.1 *Escherichia coli* .**

Es una enterobacteria generalmente móvil, reductora de nitratos, catalasa positiva, oxidasa negativa, y en su mayoría fermentan la glucosa. Existen centenares de serotipos, pero sólo algunos serotipos O tienen capacidad enteropatógena e invasora.

En pacientes inmunodeprimidos (neutropénicos con mucositis, cirróticos) hay paso directo desde el tubo digestivo a la sangre produciendo bacteriemias.

*E. coli* es el agente responsable de una porción importante de gastroenteritis agudas, la primera causa de infección urinaria y el bacilo gramnegativo causante de bacteriemia con mayor frecuencia, entre otras afecciones abdominales y sistémicas.

Principal agente etiológico de problemas gatrointestinales se observa sobretodo en niños menores de 2 años. En los adultos es la causa principal de la diarrea del viajero. Puede estar producida por 4 variedades diferentes: como se ve en la tabla 2. La diarrea del viajero se caracteriza por dolor abdominal cólico y deposiciones líquidas. Afecta a personas que residen en países industrializados y que visitan regiones tropicales o subtropicales sin condiciones higiénicas adecuadas. El microorganismo se adquiere por vía fecal-oral, habitualmente por el consumo de agua no embotellada o de verduras no cocinadas. Esta diarrea es debida a la copiosa secreción de líquidos que causan la acción de 2 enterotoxinas, una termolábil y una termoestable, sobre las células intestinales.

La diarrea del viajero se caracteriza por dolor abdominal cólico y deposiciones líquidas. Afecta a personas que residen en países industrializados y que visitan regiones tropicales o subtropicales sin condiciones higiénicas adecuadas. El microorganismo se adquiere por vía fecal-oral, habitualmente por el consumo de agua no embotellada o de verduras no cocinadas. Esta diarrea es debida a la copiosa secreción de líquidos que causan la acción de 2 enterotoxinas, una termolábil y una termoestable, sobre las células intestinales.

*E. coli* se aísla con frecuencia en pacientes con apendicitis, diverticulitis perforadas, abscesos subfrénicos, formando parte de una infección polimicrobiana (especialmente anaerobios). Además es una de las causas más frecuentes de infecciones de la vía biliar (colecistitis, colangitis) e incluso abscesos hepáticos múltiples por colonización ascendente. En pacientes cirróticos causa con frecuencia cuadros de peritonitis bacteriana espontánea.

En las infecciones con *E. Coli* se Precisa de un tratamiento con antibiótico adecuado usando con trimetoprim, sulfametoxazol (TMP-SMX) o una quinolona y en paciente embarazada: amoxicilina o nitrofurantoina durante 7 días.

**Tabla .2** Características de las enteritis por *E. coli*

Grupo de <i>E. coli</i>	Mecanismo patológico	Clínica	Epidemiología
Enteropatógena (ECEP clásica)	Desconocido. Asociado a lesiones de borrado de las microvellosidades de los enterocitos	Diarrea líquida con moco. Vómitos Fiebre	Frecuente en países desarrollados incluyendo el nuestro. Frecuente en niños menores de 2 años.
Enteroinvasora (ECEI)	Invasión de la mucosa, como shigellas	Diarrea isenteriforme (moco , sangre) abdominal Fiebre	Frecuente en países subdesarrollados. Muy infrecuente en nuestro país. Generalmente son casos de diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados.
Enterotoxigénica (ECET)	Producción de enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST)	Diarrea líquida profusa Náuseas	Frecuente en países subdesarrollados. Muy infrecuente en nuestro país, generalmente son casos de diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados.
Enterohemorrágica (ECEH)	Borramiento de las microvellosidades de los enterocitos y producción de verotoxinas (VT)	Diarrea sanguinolenta afebril Síndrome hemolítico urémico	Frecuente en países desarrollados. Relativamente infrecuente en nuestro país.

Fuente: Revista salud pública (1997) V 71 N 5

#### 4.3.2 *Klebsiella*

.Es responsable del 14% de la infecciones intrahospitalarias. Origina sobretudo bacteriemias, infecciones urinarias y neumonías. Es colonizadora habitual del tracto gastrointestinal. Son bacterias inmóviles y disponen de una gruesa cápsula de aspecto mucoide. El antígeno cápsular K evita la fagocitosis de la bacteria por parte de los macrófagos y retrasa la migración de los leucocitos al área infectada.

Hay 4 especies:

- *K. pneumoniae* (bacilo de Friedlander)
- *K. ozaenae*
- *K. rhinoscleromatis*
- *K. Oxytoca*

El tratamiento de elección es: cefalosporinas de 3ª generación. Pueden asociarse aminoglucósidos por la acción sinérgico.

#### 4.3.3 *Enterobacter*.

Son bacterias oportunistas que colonizan a pacientes hospitalizados. Causan infecciones de cualquier localización, sobretudo en pacientes tratados con antibióticos de amplio espectro, especialmente cefalosporinas. Son BGN móviles.

Son 5 especies:

- *E. cloacae*
- *E.gergoniae*

- *E. aerogenes*
- *E. agglomerans*
- *E. sakazakii*

#### **4.4 INFECCIÓN NOSOCOMIAL**

Una infección nosocomial puede definirse de la manera siguiente:

Una infección contraída en el hospital por un paciente internado por una razón distinta de esa infección<sup>31</sup>. Una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internado.

Estas infecciones crean problemas como pequeñas epidemias y están relacionadas con la presencia de resistencia a antibióticos de amplio espectro.

#### **4.5 RESISTENCIA MICROBIANA**

La resistencia microbiana se debe a las llamadas betalactamasas de espectro extendido o ampliado BLEE, BLEA<sup>32,33</sup> capaces de lograr resistencia bacteriana a las cefalosporinas de 3<sup>ra</sup> generación, monobactámicos y aminoglucósidos lo cual es un serio problema .

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado o extendido (BLEA), son un grupo de enzimas de codificación plasmídica, derivadas de las  $\beta$ -lactamasas clásicas (TEM-1, TEM-2 y SHV (nombre proveniente de Temoniera, paciente griega en quien primero se detectó) y sulfhidrilo por sustitución de uno o más aminoácidos (denominada SHV).

La diferencia de estas últimas, es que confieren resistencia a amino y ureidopenicilinas, amplían el espectro hidrolítico a cefalosporinas de tercera generación y monobactames.

Las BLEAS hidrolizan amino y ureidopenicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas) y monobactámicos; no hidrolizan carbapenemes. La acción hidrolítica de estas enzimas se ve contrarrestada por los inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). En la clasificación de Bush *et al* de 1995 se las engloba en el grupo 2be, debido a sus características de hidrólisis (oxiimino- $\beta$ -lactamasas) y a su origen en las  $\beta$ -lactamasas plasmídicas clásicas (TEM y SHV pertenecientes al grupo 2b).

También se han denominado como BLEAS las derivadas de TEM o SHV que confieren resistencia a inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas. Estas enzimas difieren de las  $\beta$ -lactamasas clásicas TEM o SHV en que su acción hidrolítica sobre penicilinas no se ve inhibida por el ácido clavulánico. Su fenotipo es de resistencia a penicilinas y a combinaciones de penicilinas con inhibidores de las  $\beta$ -lactamasas y pertenecen al grupo 2br de la clasificación de Bush *et al* de 1995.

En los últimos años se han descrito nuevas  $\beta$ -lactamasas, también denominadas  $\beta$ -lactamasas de espectro ampliado que no derivan de TEM ni de SHV. Entre ellas se encuentran las cefalosporinasas derivadas de la integración del gen cromosómico de *ampC* en plásmidos, que confieren resistencia a todas las cefalosporinas, incluyendo cefamicinas; estas enzimas se han descrito en *K. pneumoniae* y *E. coli*. Otras nuevas  $\beta$ -lactamasas, también de espectro ampliado, son las carbapenemasas descritas recientemente en *Enterobacter cloacae* y *Serratia marcescens*

Epidemiología de las enterobacterias productoras de BLEA se han aislado con mayor frecuencia en muestras procedentes de pacientes hospitalizados, pero también pueden encontrarse en muestras de origen comunitario. Estos aislamientos pueden aparecer de forma esporádica, sin relación epidemiológica, o dar lugar a brotes nosocomiales. La mayoría de estas epidemias afectan a pocos pacientes (de 10 a 20) en un periodo corto de tiempo, pero cada vez es más frecuente la descripción de brotes nosocomiales más extensos.<sup>11,34,</sup>

El tubo digestivo actúa como reservorio de estos microorganismos multirresistentes; además es el nicho ecológico adecuado para que la resistencia se transmita a otras especies bacterianas. En casos de epidemia, la colonización fecal de los pacientes ingresados en unidades de riesgo puede llegar a más del 40%.

Dentro de las enterobacterias productoras de BLEA, *K. pneumoniae* es la especie que con mayor frecuencia causa brotes nosocomiales, seguida de *E. coli*<sup>11</sup>. También se han encontrado otras especies como *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, etc.

La aparición de brotes nosocomiales debidos a estos microorganismos depende tanto de las condiciones ambientales (elevado consumo de cefalosporinas de tercera generación, manipulación de los pacientes, etc.) como de las características especiales del microorganismo (factores de virulencia, adherencia, etc.). Los factores de riesgo para adquirir infección/colonización son el consumo de antibióticos (especialmente cefalosporinas) y la cateterización arterial y/o urinaria.



## 5. MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del ICTA, en la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia.

### 5.1 CEPAS BACTERIANAS

Las cepas de las enterobacterias *E.coli*, *K. pneumoniae* y *Enterobacter* spp, con resistencia (BLEA positivas) y ATCC se obtuvieron del laboratorio de microbiología del Hospital el Tunal de Bogotá, las cuales se observa en las figuras 1, 2 y 3.

**Figura 1.** *E.coli* ATCC 25922 en medio MacConkey



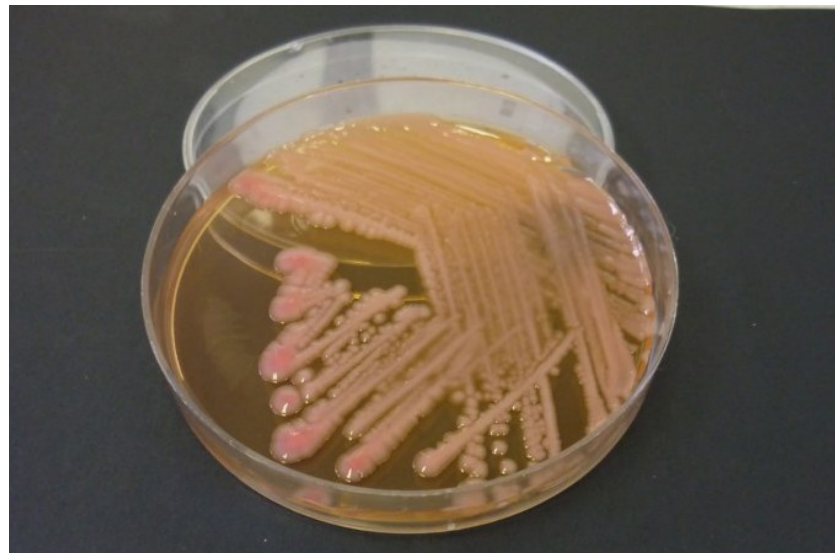
Fuente: la autora

**Figura 2.** *E.coli* BLEA en medio MacConkey



Fuente: la autora

**Figura 3.** *Enterobacter* spp en medio MacConkey



Fuente: la autora

Se utilizó como probiótico una cepa comercial de *Bifidobacterium bifidus*, la cual se observa en la figura 4, utilizada en la elaboración de productos lácteos.

**Figura 4.** *Bifidobacterium bifidus* en medio MRS



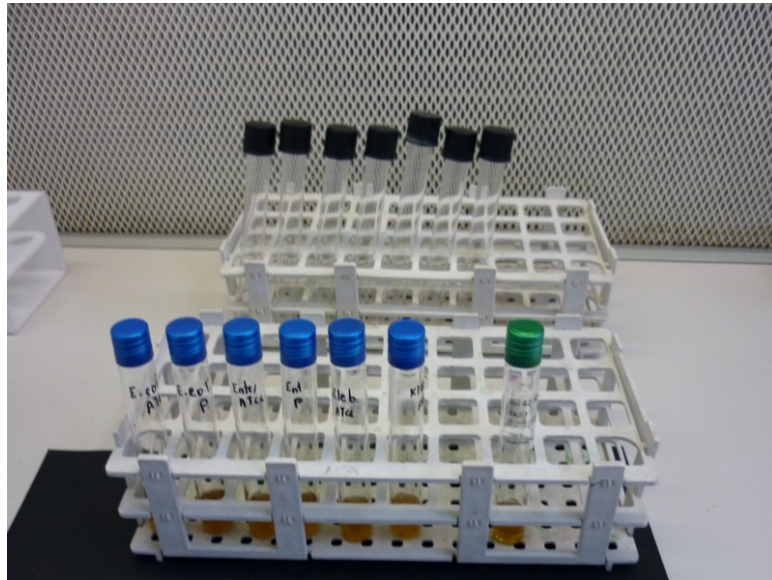
Fuente: la autora

#### 5.1.1 Activación de cepas.

El *Bifidobacterium bifidus* se activó en 100ml de leche descremada al 12%, se realizaron diluciones en base 10, usando agua peptonada 0.1% para realizar recuento en caja por profundidad en medio De Man Rogosa Sharpe (MRS), de la casa Oxoid®, reconstituido de acuerdo a las instrucciones del fabricante, incubando a 37°C ( $\pm$  2°C) en anaerobiosis por 72 horas, para realizar el recuento inicial de  $10^0$ , estableciéndose que la concentración inicial del microorganismo es de  $34 \times 10^8$  ufc/ml. (prueba cualitativa)

Las cepas de enterobacterias se activaron colocando de 3 a 5 colonias en 3 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI), con incubación a 37°C (± 2°C) por 24 horas, obteniéndose turbidez correspondiente al tubo No.5, como se observa en la figura 5, en la escala de Mc Farland, técnica estandarizada y recomendada por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), consiguiendo una concentración promedio del patógeno de  $1.5 \times 10^9$  ufc/ml; con la misma técnica se activaron las cepas control: *E.coli* ATCC 29522, *K. pneumoniae* ATCC 700603 suministradas por el laboratorio de microbiología del Hospital el Tunal.

**Figura 5.** Activación del Patógeno

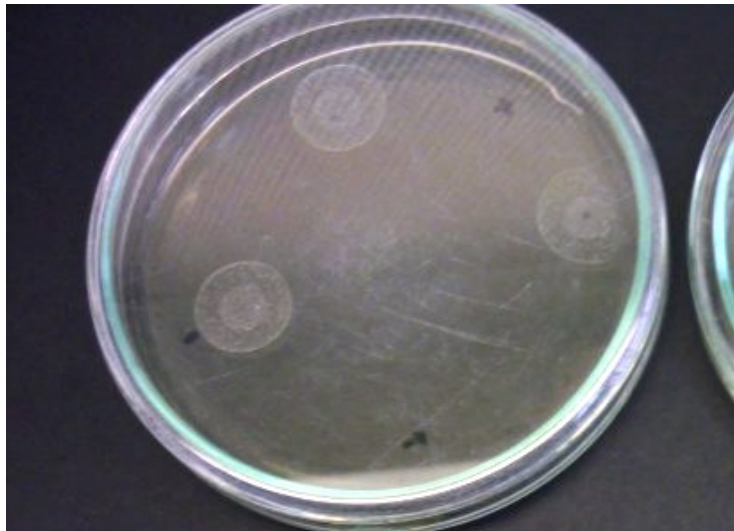


Fuente: la autora

## 5.2 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO DE ENTEROBACTERIAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE *Bifidobacterium bifidus*

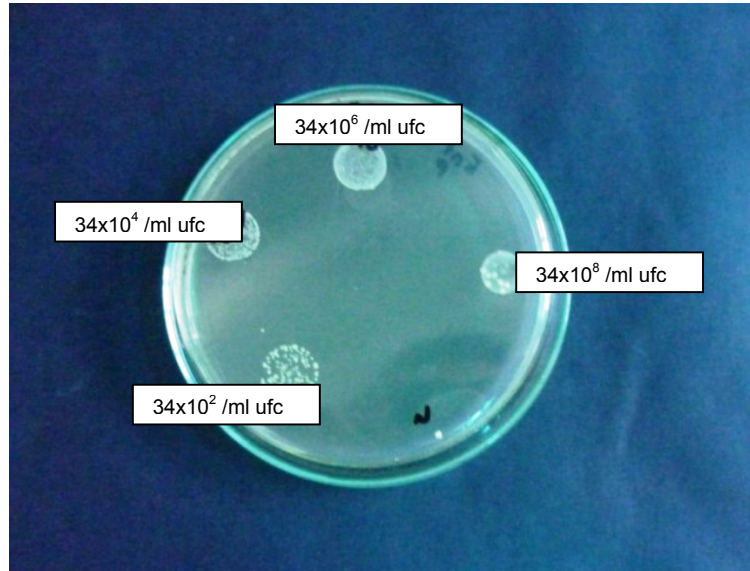
Para la prueba de actividad bactericida o de inhibición se realizaron modificaciones a la técnica de Botina<sup>4</sup> (2008) de gota en doble capa con agar MRS. Se dispensaron 10 ml de medio MRS en las cajas de petri y una vez sólificado se sembraron por goteo sobre la superficie 10  $\mu$ l del *Bifidobacterium* con recuento de  $34 \times 10^8$  ufc/ml (para la prueba cualitativa), realizando 5 inóculos por caja, 3 de *Bifidobacterium bifidus* y 2 de caldo BHI sin inocular; estos dos últimos para usarlos como controles negativos, como se observa en la figura 6. Y En la figura 7 se observan las pruebas cuantitativas, en las cuales se realizó el mismo procedimiento usando diferentes concentraciones ( $34 \times 10^2$ ,  $34 \times 10^4$ ,  $34 \times 10^6$  de *Bifidobacterium bifidus* realizadas a partir de la concentración inicial). Se dejaron secar las gotas por 3 horas en ambiente estéril y se incubaron en anaerobiosis a  $35^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ) por 24 horas. Se preparó una caja por cepa de microorganismo a analizar y una caja sin inóculo como blanco para la prueba. Las pruebas se realizaron por triplicado.

**Figura 6.** *Bifidobacterium bifidus*. Concentración  $34 \times 10^8$  ufc/ml en medio MRS antes de ser inoculado con patógeno.



Fuente: la autora

**Figura 7.** *Bifidobacterium bifidus* en medio MRS a diferentes concentraciones antes de ser inoculado con patógeno.



Fuente: la autora

Después de 24 horas de incubación, se adicionó una doble capa, sobre el medio MRS, de 9 ml de agar nutritivo y 1 ml de la suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^9$  ufc/ml) con cada uno de los patógenos, mezclando con vortex por 30 seg ( $\pm 5$  seg), y se llevó a incubación por 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ).

La lectura se realizó informando presencia o ausencia de halo de inhibición, reportando el tamaño de este en milímetros (mm). Los halos se midieron con un calibrador (Mitutoyo®)

### 5.3 ANALISIS DE LOS DATOS

Se realizaron en total 24 análisis, en los cuales se valoró el poder inhibitorio del *Bifidobacterium* a las concentraciones  $34 \times 10^2$ ,  $34 \times 10^4$ ,  $34 \times 10^6$  y  $34 \times 10^8$  ufc/ml frente a las 6 cepas de enterobacterias, a estos resultados se les calculó el promedio y la desviación estándar para determinar la variación del comportamiento de los microorganismos en los ensayos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en la tabla 3, las seis cepas de enterobacterias analizadas presentaron halos de inhibición frente a la cepa de *Bifidobacterium bifidus* a una concentración de  $34 \times 10^8$  ufc/ml concentración inicial utilizada como prueba cualitativa en el ensayo.

**Tabla 3.** Resultados de prueba de inhibición enterobacterias vs *Bifidobacterium bifidus* a una concentración de  $34 \times 10^8$  ufc/ml

Microorganismo	Presencia de Halo	
	SI	NO
<i>E.coli</i> ATCC 25922	X	
<i>E.coli</i> BLEA	X	
<i>K.pneumoniae</i> BLEA		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 BLEA	X	
<i>Enterobacter</i> spp BLEA	X	
<i>Enterobacter</i> spp SIN RESISTENCIA	X	

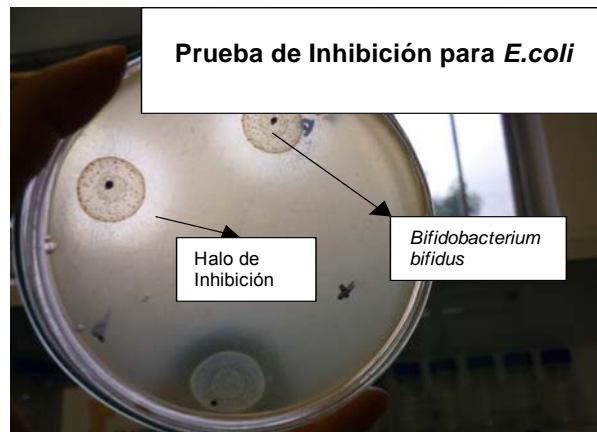
Fuente: la autora

Las cepas ATCC usadas como control negativo (*E.coli* ATCC 25922) y positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700603) en la presencia de BLEA también fueron inhibidas. Como se observa en la figura 8; Se consideraron el 100% de las pruebas como positivas según metodología usada como referencia<sup>2,7</sup>, en la cual a partir de 1mm se establece como positiva la prueba de inhibición.



En la prueba cualitativa con la concentración de  $34 \times 10^8$  las dos cepas de *E.coli* mostraron el mismo comportamiento ambas fueron inhibidas y el promedio de los halos obtenidos fue de 10 mm sin variación estándar, como se documenta en la tabla 4.

**Figura 8.**Prueba de inhibición para *E.coli* ATCC 25922



Fuente: la autora

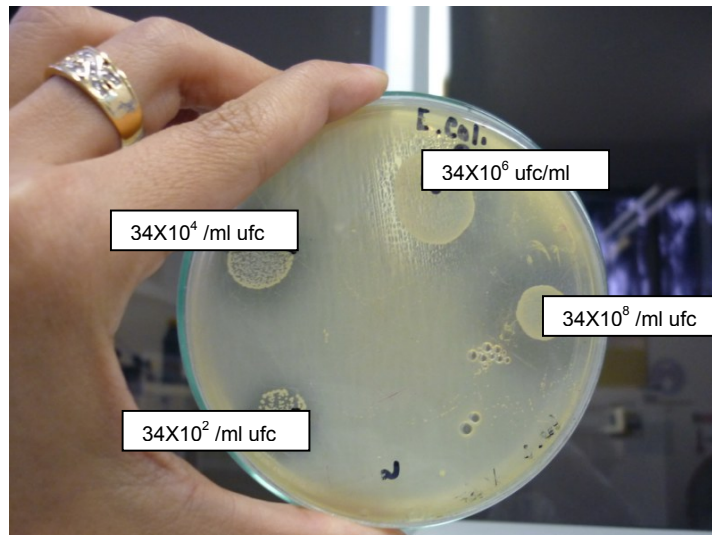
Al modificar las concentraciones de *Bifidobacterium bifidus* como se muestra en la Tabla 4, la *E.coli* ATCC 25922 (figura 9) mostró promedios de inhibición entre los 5 mm y 3 mm, con valores de desviación estándar de cero (0). Mientras que la cepa *E.coli* BLEA presentó promedio de halos de inhibición entre 8 mm y 5 mm con desviaciones estándar entre 1.732 y cero (0) aunque la variación fue mayor, este resultado puede indicar que la presencia de BLEA no es un impedimento para la inhibición por parte del probiótico.

**Tabla 4.** Resultados de prueba de inhibición para *E.coli* ATCC y *E.coli* BLEA a diferentes concentraciones del probiótico

	Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^8$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^6$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^4$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^2$ ufc/ml	
<i>E.coli</i> ATCC 25922 sin resistencia	P	DV	P	DV	P	DV	P	DV
	10mm	0	5mm	0	4mm	0	3mm	0
<i>E.coli</i> BLEA	10mm	0	8mm	1,732	6mm	0	5mm	0

Fuente: la autora

**Figura 9.** Prueba de inhibición para *E.coli* ATCC 25922 a diferentes concentraciones



Fuente: la autora

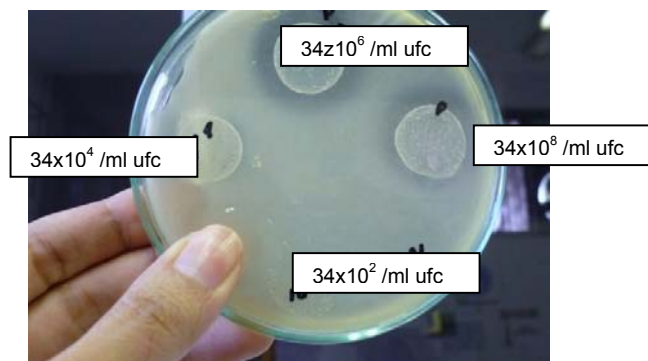
**Tabla 5.** Resultados de prueba de inhibición para *K. pneumoniae* ATCC y *K. pneumoniae* BLEA a diferentes concentraciones del probiótico

	Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^8$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^6$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^4$ ufc/ml*		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^2$ ufc/ml	
	P	DV	P	DV	P	DV	P	DV
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 700603	5mm	0	5mm	0	3mm	0	2mm	0
<i>K. pneumoniae</i> BLEA	7mm	1,528	5mm	2	3mm	0	0mm	0

Fuente: la autora

En el caso de la *Klebsiella* ATCC y BLEA , los promedios de los halos de inhibición en la prueba cualitativa están entre 7 mm y 5 mm, mientras en las otras concentraciones (figura 10) se obtuvieron promedios entre los 5 mm y 0 mm como se ve en la tabla 5, aunque ambas cepas son BLEA, la BLEA no ATCC presentó mayor sensibilidad a la concentración inicial de  $34 \times 10^8$  pero al llegar a la concentración  $34 \times 10^2$  no logro ser inhibida, posiblemente la CMI para este caso este entre la concentraciones  $34 \times 10^4$  y  $34 \times 10^2$ .

Figura 10. Prueba de inhibición para *K.pneumoniae* BLEA a diferentes concentraciones



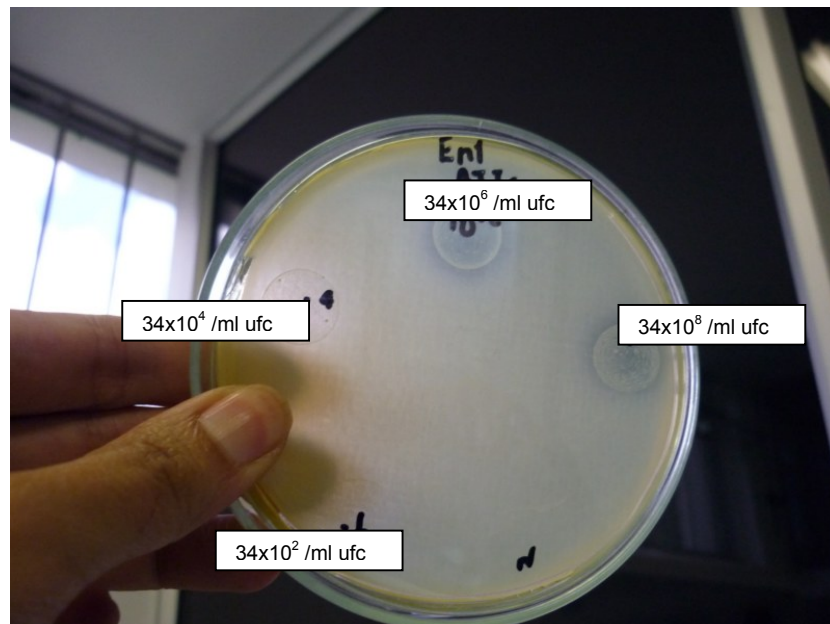
Fuente: la autora

**Tabla 6.** Resultados de prueba de inhibición para *Enterobacter* spp BLEA y *Enterobacter* spp sin BLEA a diferentes concentraciones del probiótico

	Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^8$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^6$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^4$ ufc/ml		Concentración Bifidobacteria $34 \times 10^2$ ufc/ml	
	P	DV	P	DV	P	DV	P	DV
<i>Enterobacter</i> spp BLEA	5mm	1	5mm	2	4mm	0	3mm	0
<i>Enterobacter</i> spp sin BLEA	6mm	1	6mm	0	2mm	0	0mm	0

Fuente: la autora

**Figura 11.** Prueba de inhibición para *Enterobacter* spp a diferentes concentraciones

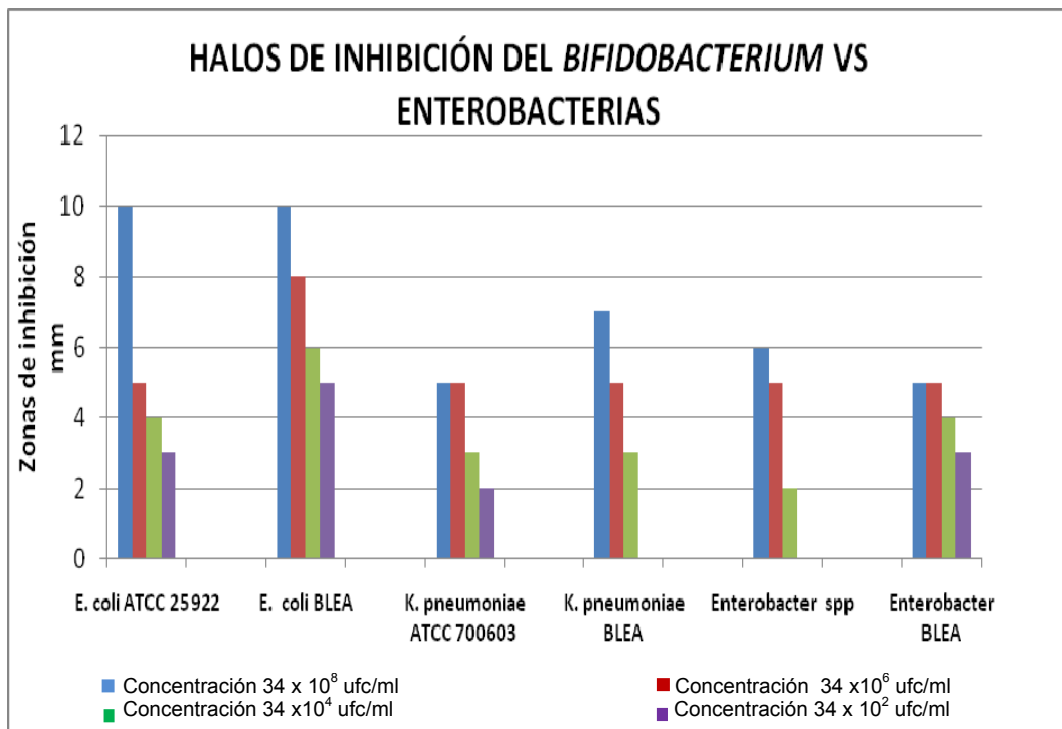


Fuente: la autora

En el caso del *Enterobacter*, últimas bacterias analizadas, los promedios de los halos de inhibición en la prueba cualitativa están entre 6mm y 5mm siendo los de más pequeño diámetro reportados en el ensayo como se observa en la figura 11 y tabla N 6. Además el *Enterobacter* spp sin BLEA a la concentración de  $34 \times 10^2$  no logró ser inhibido por el probiótico.

Como resumen de estas tablas se presenta la figura 12, donde es más fácil comparar el resultado de todas las pruebas realizadas y donde se evidencia el comportamiento analizado para cada enterobacteria

**Figura 12.** Halos de inhibición del *Bifidobacterium* a diferente concentración vs enterobacterias



Fuente: la autora

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el *Bifidobacterium bifidus* tiene poder inhibitorio *in vitro* frente al desarrollo de patógenos; en este caso de enterobacterias de origen hospitalario como *E.coli*, *k. pneumoniae* y *enterobacter* spp que además son BLEA positivas. Por lo tanto el consumo de alimentos con probióticos podría ser una excelente alternativa para frenar el uso indiscriminado de ciertos antibióticos mejorando no solo el estado nutricional de los pacientes, sino abriéndose la posibilidad de seguir explorando estrategias para el uso de estos como complemento de terapias antimicrobianas.

## 5. CONCLUSIONES

Las seis cepas de Enterobacterias evaluadas fueron inhibidas por el *Bifidobacterium bifidus* a una concentración de  $34 \times 10^8$  ufc/ml.

La *E.coli* BLEA y la ATCC fueron las enterobacterias que presentaron la mayor inhibición frente a la acción del agente probiótico en todas las concentraciones evaluadas.

La producción de betalactamasas de espectro extendido o ampliado por las cepas evaluadas, no impidieron la acción inhibitoria del microorganismo probiótico, reportándose el efecto obtenido como halo de inhibición, donde se midió el diámetro en milímetros.

## 6. RECOMENDACIONES

Se sugiere realizar la CMI para cada una de las enterobacterias empleadas para así poder disponer de datos más exactos de su poder inhibitorio.

Se recomienda evaluar mezclas de probióticos ya que la forma como se encuentran en el mercado en los alimentos es por lo general en combinaciones, si presenta gran poder inhibitorio el *Bifidobacterium bifidus* solo, posiblemente al ser combinado con otro probiótico su poder inhibitorio se potencialice.



## BIBLIOGRAFÍA

1. VANEGAS María Consuelo, GONZÁLEZ Lina M., VIVES Maria Carolina laboratorio de Ecología Microbiana de Alimentos (LEMA), Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Los Andes, , Colombia Capacidad bactericida de *Bifidobacterium spp* aisladas de neonatos y leche materna frente a los principales causantes de ETAS.
2. BOTINA AZAIN Blanca Lucía, Bacterias ácido lácticas con potencial bioprotector: aislamiento de cepas nativas y preliminar de los metabolitos con capacidad antilisterial, Tesis de Magister en Microbiología, Universidad de Los Andes, Bogotá, Colombia, 2008.
3. CHARTERIS, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and COLLINS, J.K. (1998) Development and application of an 'in vitro' methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84, 759–68.
4. BEAUSOLEIL M, FORTIER N, GUÉNETTE S, ET AL. Effect of a fermented milk combining *Lactobacillus acidophilus* CI1285 and *Lactobacillus casei* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Gastroenterol* 2007; 21:732–6.
5. DESHPANDE G, RAO S, PATOLE S. Probiotics for prevention of necrotising enterocolitis in preterm neonates with very low birthweight: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet* 2007;369:1614–20.

6. DESPONDED G, RAO S, PATOLE S. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm neonates with very low birth weight: systematic review of randomized controlled trials. *Lancet* 2007;369:1614.
7. FERNÁNDEZ M.F., BORIS S. y BARBÉS C., Probiotic Properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract, *Journal of Applied Microbiology* (2003), 94,449 – 445.
8. GUTIÉRREZ RAMÍREZ, Luz Adriana ACOSTA OTÁLVARO, Elly Vanesa Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus casei* frente *E. coli* *Revista Lasallista de Investigación*, Vol. 5, Núm. 2, julio-diciembre, 2008, pp. 68-73 Corporación Universitaria Lasallista.
9. JACOBY GA, HAN P. Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:908-11.
10. SATOVSVCHI R. Infecciones hospitalarias, patógenos resistentes y estrategias de control. Reunión de consenso La aparición de microorganismos productores de ESBL en América Latina: Recomendaciones para su control y tratamiento (San Pablo, Brasil). *Infect Dis Clin Pract* 2001; (Suppl):17-23.
11. BOLETIN EPIDEMIOLOGICO HOSPITAL EL TUNAL 2008-2010
12. WORLD HEALTH ORGANIZATION'S strategy to contain resistance to antimicrobial drugs. *Rev Panam Salud Publica* 2001; 10(4):284-94
13. KRUIS W, FRIC P, POKROTNIEKS J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53:1617–23.

14. MARTEAU, Philippe R. et al. Protection from gastrointestinal diseases with the uses of probiotics. In: American Society for Clinical Nutrition. Vol. 73, No. 2 (feb. 2001); p. 430-436.
15. PLUMMER S, WEAVER MA, HARRIS JC, et al. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *Clostridium difficile* diarrhoea. *Int Microbiol* 2004;7:59–62.
16. ROLFE RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. EN: *J Nutr* 2000; 130: 396-402.
17. SALMINEN MK, TYNKKYNNEN S, RAUTELIN H, SAXELIN M, VAARA M, P, et al. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1155-1160.
18. SÝKORA J, VALECKOVÁ K, AMLEROVÁ J, et al. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39:692–8.
19. KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria FEMS. In: *Microbiological Reviews* vol. 12 (1993); p. 39-86.
20. ALLEN SJ, OKOKO B, MARTINEZ E, GREGORIO G, DANS LF. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004 ;(2):CD003048.
21. FEDORAK RN, MADSEN KL. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. EN: *Curr Opin Gastroenterology* 2004; 20:146–55.

22. GAWRONSKA A, DZIECHCIARZ P, HORVATH A, SZAJEWSKA H. A randomized double-blind placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG for abdominal pain disorders in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 177–84.
23. HICKSON M, D'SOUZA AL, MUTHU N, et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007; 335(7610):80.
24. O'MAHONY L, MCCARTHY J, KELLY P, et al. *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005; 128:541–51.
25. JOHNSTON BC, SUPINE AL, OSPINA M, VOHRA S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 ;( 2):CD00 4827.
26. SOLAURI E, SÜTAS Y, KANKAANPÄÄ P, ARVILOMMI H, SALMINEN S. PROBIOTICS: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 200; 73 (Suppl):444-450.
27. OSBORN DA, SINN JK. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity.
28. REID G, JASS J, SEBULSKY MT, MC CORMICK JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658- 672.

29. TONG JL, RAN ZH, SHEN J, ZHANG CX, XIAO SD. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25:155–68.
30. SZAJEWSKA H, RUSZCZYŃSKI M, RADZIKOWSKI A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006; 149:367–72
31. GARNER JS, JARVIS WR, EMORI TG, HORAU TC, HUGHES JM. CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988; 16: 128-40.
32. IYOBE S. Appearance of extended spectrum beta Lactamases. *J Nipón Riwsho* 1997;55(5):1219-24.
33. JANE J. BURNS. M D Mecanismos de Resistencia Bacteriana, Clínicas Pediátricas de Norteamérica, Volumen 3/1995 Pág. 463-470
34. WORLD HEALTH ORGANIZATION. CONTAINING ANTIMICROBIAL RESISTANT. Review of Literature and Report of Workshop on the development of a Global Strategy for The Containment of antimicrobial Resistant. WHO/CDS/CRS/DRS/99.2 Genova; 1999.
35. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 6th ed. Approved standard M7-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, 2003
36. LEE MC, LIN LH, HUNG KL, WU HY. Oral bacterial therapy promotes recovery from acute diarrhea in children. *Acta Paediatr Taiwan* 2001;42: 301–5.

37. KIM HJ, VAZQUEZ ROQUE MI, CAMILLERI M, et al. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL# 3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17:687–96.
38. HOYOS A. Reduced incidence of necrotizing enterocolitis associated with enteral administration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* to neonates in an intensive care unit. *Int J Infect Dis* 1999; 3: 197-202.