




El jolgorio de los peces | Óleo en lienzo 100 x 110 cm. | Armando Reyes



EFFECTO PROBIÓTICO IN VITRO DE *ACTOBACILLUS CASEI* EN LA DISMINUCIÓN DE LA RESISTENCIA A CIPROFLOXACINO, IMIPENEM Y VANCOMICINA SOBRE *ESCHERICHIA COLI*, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

IN VITRO PROBIOTIC EFFECT OF *Actobacillus casei* ON THE DECREASE OF RESISTENCE OF CIPROFLOXACINE, IMIPENEM, AND VANCOMICINE OVER *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, AND *Staphylococcus aureus*

AUTOR

Mónica Tatiana Justiniano Mejía¹

Elva Mejía Delgado²

RESUMEN

Se determinó el efecto probiótico de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a ciprofloxacino, imipenem y vancomicina sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Se utilizaron lactobacillus al 50%, 75% y 100%. El efecto probiótico se procesó mediante la técnica de Kirby Bauer y la concentración inhibitoria mínima mediante la determinación de las unidades formadoras de colonias. Se determinó que el *Lactobacillus casei*, asociado a ciprofloxacino disminuye la resistencia de *Escherichia coli*; asociado a imipenem, disminuye la resistencia de *Pseudomona aeruginosa*; y asociado a vancomicina, disminuye la resistencia de *Staphylococcus aureus*. La sensibilidad de las bacterias es mayor cuando los antibióticos se asociaron con el *Lactobacillus* con una diferencia altamente significativa al efecto del antibiótico solo. La concentración inhibitoria mínima fue 50%. Todas las concentraciones asociadas a cada antibiótico produjeron inhibición total de las bacterias con una diferencia altamente significativa con su control ($p < 0.001$). *Lactobacillus casei* asociado a ciprofloxacino, imipenem y vancomicina disminuye la resistencia in vitro de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, respectivamente.

Palabras clave: Efecto probiótico asociado, *Lactobacillus casei*, ciprofloxacino, imipenem, vancomicina.

1. Médico-cirujano de la Universidad Privada Antenor Orrego.

2. Dra. en Ciencias Biomédicas, Docente de la Facultad de Medicina de la UPAO.



ABSTRACT

The probiotic effect of *Lactobacillus casei* in the decreased resistance to ciprofloxacin, imipenem and vancomycin on *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* was studied. *Lactobacillus* 50%, 75% and 100% was used. The probiotic effect was processed through the Kirby Bauer technique and the minimal inhibitory concentration by determining colony forming units.

It was established that the *Lactobacillus casei* linked to ciprofloxacin reduces the resistance of *Escherichia coli*; linked to imipenem, it reduces the resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, and linked to vancomycin it reduces the resistance of *Staphylococcus aureus*. The bacterium sensitivity is greater when the antibiotics were linked to *Lactobacillus* with a highly significant difference to the effect on antibiotics alone. The minimum inhibitory concentration was 50%, all concentrations linked to each antibiotic produced total inhibition of bacteria with a highly significant difference with control ($p < 0.001$). *Lactobacillus casei* linked to ciprofloxacin, imipenem and vancomycin reduces the resistance in vitro of *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* respectively.

Keywords: Linked probiotic effect, *Lactobacillus casei*, ciprofloxacin, imipenem, vancomycin.

I. INTRODUCCIÓN

Se ha observado un creciente interés, tanto por parte de la comunidad científica como de la población en general, hacia el papel que los probióticos pueden desempeñar en el mantenimiento de la salud y en la prevención y tratamiento de enfermedades (1). El concepto de probiótico data desde hace más de 100 años. En 1907, el Premio Nobel Elie Metchnikoff destacó la relación entre el consumo de yogurt rico en *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* con la longevidad en grupos étnicos de Europa oriental. Esta relación se sustenta en la teoría de la bacterioterapia para promover la salud intestinal al alterar la colonización por patógenos. Fue entonces que nació el concepto probiótico y se abrió un nuevo campo en la Microbiología (2,3).

Debido a las características previamente señaladas, es necesario destacar las posibilidades terapéuticas de las bacterias acidolácticas que pueden ser útiles en el tratamiento de patologías infecciosas (5), como en la prevención de infecciones urinarias (6,7), el tratamiento de diarreas infantiles o del viajero (8), así como la antibioticoterapia prolongada, en el tratamiento del estreñimiento (9,10), y en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, dada su capacidad de modular la flora intestinal (4,5,6).

El efecto del tratamiento con probióticos ha sido estudiado extensamente, por ejemplo, en desórdenes gastrointestinales, ginecológicos y eczema atópico (7,8,9). Las bacterias probióticas pueden incrementar la resistencia del huésped contra los patógenos intestinales mediante mecanismos antimicrobianos. Estos incluyen la colonización competitiva y la producción de ácidos orgánicos, como los ácidos láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios, como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono. La producción de ácidos orgánicos disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. El peróxido de hidrógeno producido puede funcionar a través del sistema lactoperoxidasa-tiocianato, en el cual el peróxido de hidrógeno oxida el tiocianato para convertirlo en ácido hidrocianico que es perjudicial para los patógenos. El dióxido de carbono y el diacetil sintetizado por las bacterias ácido lácticas (BAL) inhiben el crecimiento de patógenos. Muchas bacteriocinas, como acidofilina, lactobacilina, acidolina, lactocidina y lactolina muestran acción antagonista contra los patógenos (8,9).

Las bacteriocinas son derivados del metabolismo, principalmente, de algunas con función antimicrobiana, de naturaleza peptídica, sintetizadas ribosomalmente y que afectan a bacterias relacionadas con las que las producen. Se ha comprobado que pueden actuar en bacterias patógenas, especialmente sobre Gram positivas y en algunas Gram negativas. Las bacteriocinas han sido encontradas en casi todas las especies bacterianas ácido lácticas examinadas hasta la fecha (10).

El *Lactobacillus casei*, aislado por científicos del Centro de Referencia para *Lactobacillus* de Tucumán, Argentina (6), es una bacteria productora de ácido láctico, Gram positiva, anaerobia facultativa; se encuentra en el intestino y en la boca. La producción de bacteriocinas por *L. casei* inhibe el crecimiento de cepas bacterianas estrechamente relacionadas. *Lactobacillus casei* cepa Shirota es capaz de competir directamente con los agentes patógenos que se encuentran en el tracto gastrointestinal por los sitios de adhesión, reduciendo las bacterias patógenas que se adhieren a la pared intestinal. Metchnikoff sugirió que algunos de los síntomas del metabolismo gastrointestinal enfermo podrían neutralizarse a través de *L. casei* Shirota utilizando como medio el yogurt (11,12).

La capacidad de las BAL para inhibir el crecimiento de otros organismos en cultivos mixtos ha sido observada durante más de 70 años, lo que comúnmente se ha llamado antagonismo láctico. La reducción del pH y la utilización de los carbohidratos disponibles parecen constituir el principal mecanismo de antagonismo microbiano. No obstante, también se conoce que las BAL producen, además de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, radicales libres, diacetil, acetaldehído, isómeros D de los aminoácidos, antibióticos y bacteriocinas (13, 14).

Tradicionalmente, los probióticos han sido usados para tratar enfermedades relacionadas con el tracto gastrointestinal. Sin embargo, cualquier parte del cuerpo que albergue microflora normal puede ser un blanco potencial para probióticos específicos. Es por ello que entre las nuevas estrategias para el biocontrol de las infecciones se están considerando a los probióticos que, como ya se ha mencionado, son complementos microbianos vivos o componentes de estos con acción benéfica en el ser humano (15, 16, 17, 18).

La investigación sobre los probióticos se ha vuelto importante, ya que han comenzado a ser prescritos por los médicos como una alternativa

para algunas infecciones intestinales, sobre todo, cuando los antibióticos están contraindicados o cuando las bacterias patógenas han adquirido resistencia a múltiples antibióticos (19). Uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial es la resistencia bacteriana, pues está asociada a un incremento de la morbilidad, mortalidad y los costos hospitalarios para los pacientes, sus familias y la sociedad. En los últimos años, la elección de un tratamiento antibiótico empírico se ha complicado como consecuencia del aumento de la resistencia de los principales patógenos generado por los cambios y adaptaciones microbianas. Las cepas patógenas resistentes han surgido a consecuencia de varios factores: el amplio uso de antibióticos, las dosis utilizadas, el tiempo de tratamiento, y la eliminación de la mitad de la droga que no se alcanza a metabolizar en su totalidad, adaptación bacteriana a diferentes ambientes, las altas posibilidades de transmisión o contagio y el estado inmunocomprometido de los pacientes que los hacen susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas (20, 21).

En investigaciones actuales, se ha demostrado el efecto benéfico que poseen varias especies de probióticos potenciando un antibiótico sobre diferentes microorganismos (22, 23, 24).

Los centros hospitalarios del Perú atienden, diariamente, un gran número de pacientes, con diferentes problemas de salud, entre los cuales, la resistencia de bacterias patógenas a diferentes antibióticos representan un alto porcentaje. Por estas consideraciones y reconociendo los estudios preliminares de la acción antibacteriana de los probióticos, se realizó el presente estudio cuyo objetivo principal fue determinar si las bacterias probióticas *Lactobacillus casei*, in vitro, poseen efecto potenciador sobre la acción antibacteriana de la ciprofloxacino, vancomicina e imipenem en cultivos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, lo que podría dar una alternativa en el tratamiento de las infecciones producidas por estos microorganismos.

II. DISEÑO METODOLÓGICO

Se utilizaron cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Productos probióticos: El *Lactobacillus casei* se obtuvo a partir de los productos Bacilor®, fueron procesados en el Laboratorio de Investigación de

la Universidad Privada Antenor Orrego, con la finalidad de trabajar con las bacterias probióticas que se encontraban en ellos.

Muestra. Se obtuvo una muestra de 13 repeticiones según la fórmula N para proporciones. Es decir se contó con una muestra de 13 halos de inhibición y 13 resultados de UFC para cada antibiótico y porcentajes de producto probiótico utilizado (100%, 75% y 50%).

El *Lactobacillus casei* liofilizado fue diluido con suero de leche, el cual fue obtenido utilizando leche Ultra High Temperatura (UHT) marca Gloria, 2 g/L, luego fue incubado en microanaerobiosis a 37 °C por cuatro horas, tiempo en el cual se reproduce el *Lactobacillus casei*. (Figura 1).

Las diluciones del producto probiótico se realizó con tioglicolato adecuado para bacterias anaerobias o facultativas hasta concentraciones de 100%, 75%, 50%;. Los antibióticos se emplearon en una sola concentración.

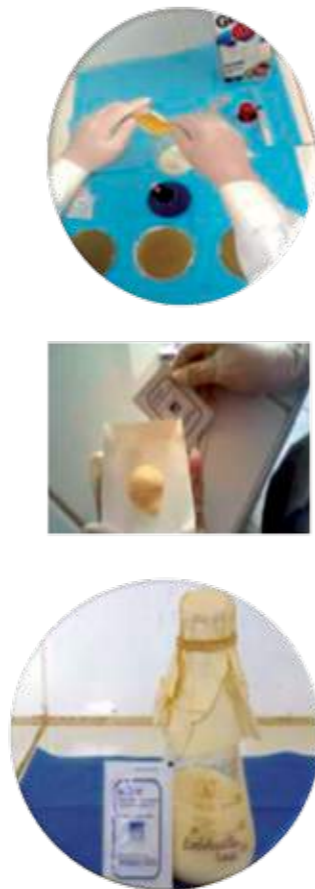


Figura 1: Cultivo de *Lactobacillus casei*

2.1. Preparación de las cepas:

Las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, fueron cultivadas en tubos de ensayo con agar Soya tripticasa, incubándose a 37 °C para obtener colonias jóvenes. Luego de 24 horas de cultivadas, se les agregó solución salina estéril, hasta obtener una turbidez semejante al tubo número 0,5 de la escala de Mac Farland que corresponde a 10⁸ bacterias/mL. Los tubos que contienen la bacteria estudiada fueron girados entre las manos durante 30 segundos, antes del sembrado, para la adecuada distribución de los microorganismos.

Sembrado:

Con un hisopo estéril, embebido con cada bacteria a una distancia de 10 cm de la llama del mechero, se hizo el sembrado en placas Petri conteniendo Agar Mueller Hinton, hisopando uniformemente sobre toda la superficie del agar y girando 10 veces cada placa 30 grados.

Determinación del efecto probiótico:

Se utilizaron las concentraciones de 100%, 75% y 50% de *Lactobacillus casei*, para cada uno de los antibióticos, según la bacteria.

Se realizó el antibiograma mediante la técnica de Kirby Bawer o difusión en discos, para lo cual se prepararon discos de papel de filtro estériles, los cuales fueron sumergidos por media hora dentro de cada combinación del probiótico. 5 µL y 5 µL del antibiótico respectivo, por cada una de las bacterias. Luego, con una aguja estéril, fueron colocados sobre los cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, en placas Petri, previamente, preparados con agar Mueller Hinton. Se realizaron 13 repeticiones por cada concentración. Paralelamente se realizó la determinación de la susceptibilidad de los controles, constituidos por los antibióticos de elección para cada una de las bacterias y el probiótico sólo para cada especie bacteriana. Los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 horas, en microanaerobiosis, utilizando jarra Gaspak. La lectura se llevó a cabo a las 24 horas. Se midieron los halos de inhibición de cada una de las concentraciones, incluyendo el área del disco de papel de filtro, con un calibrador Vernier (escala de Duraffourd).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI): Se realizó por el método de diluciones en tubos, utilizando las tres concentraciones del probiótico. En el tubo 1 se colocó la bacteria probiótica al 100%; en el 2, al 75%; en el 3, al

50%; y el 4 (control), solo el antibiótico. En los tubos 1, 2 y 3 se colocaron el probiótico y el antibiótico respectivo en volúmenes iguales (0,4 y 0,4 µL); luego, 0,2 ml. de la dilución de la cepa (semejante a tubo 0,5 de la escala de Mac Farland), agitándolos para uniformizar. Los tubos fueron colocados en la estufa a 37 °C por 24 horas, en microanaerobiosis. Para determinar las UFC (cuentas viables), se sembró 0.1 mL de las soluciones de cada uno de los tubos procesados, en el paso anterior, en placas Petri con medio Mueller Hinton; luego, con el asa de Driglasky se dispersó cada muestra en toda la placa. Todas las placas fueron colocadas en la estufa, por 24 horas, a 37 °C, en microanaerobiosis; después de lo cual se procedió a la observación del crecimiento bacteriano, mediante el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC), considerándose como la CMI a la menor concentración, a la cual no se observaron UFC. Este procedimiento se realizó con cada una de las bacterias y con cada uno de los antibióticos, respectivamente.

Procesamiento y análisis de la información

Para analizar la información, se construyeron tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y desviación estándar.

Estadística analítica

Para determinar el efecto de las bacterias probióticas al 100%, 75% y 50%, a vancomicina sobre *S. aureus*, al ciprofloxacino sobre *E. coli*, y al imipenem sobre *P. aeruginosa*, se realizó el análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado para el efecto bactericida, analizado por el halo de inhibición y por la concentración inhibitoria mínima. Luego se hizo la Prueba Duncan, para las comparaciones múltiples. Ambas con un nivel de significancia del 5%. Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del paquete estadístico SPSS- 15.0. (29).

III. RESULTADOS

Con la prueba de susceptibilidad y la medición de los halos de inhibición, se clasificó los diámetros de acuerdo a la escala de Durafford:

- Las 13 repeticiones al 50% de *Lactobacillus casei* unido a los antibióticos: ciprofloxacino, imipenem y vancomicina, presentaron eficacia en la disminución de la resistencia frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Las 13

repeticiones al 75% y 100% de *L. casei* con cada uno de los antibióticos mencionados, presentaron eficacia en la disminución de la resistencia de dichas bacterias. (Tabla 1,3 y 5).

Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus*, fue mayor de 20 mm en las tres concentraciones de *L. casei* y con cada uno de los antibióticos. (Tablas 2,4 y 6).

- Los promedios de los diámetros de halo de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli*,
- La CMI fue la asociación de cada antibiótico con el 50% de *Lactobacillus casei*.

Tabla 1: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a ciprofloxacino sobre *Escherichia coli*, según diámetro de halo de inhibición y mediante el análisis de varianza.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GI	Cuadrados Medios	F	P
Tratamientos	5111.85	4	1277.96	361.163	0.000
Error	212.31	60	3.54		
Total	5324.15	64			

El análisis de varianza muestra una diferencia altamente significativa del diámetro del halo de inhibición de los tratamientos asociados del *Lactobacillus casei* con ciprofloxacino en relación al antibiótico solo, en la disminución de la resistencia de *Escherichia coli*.

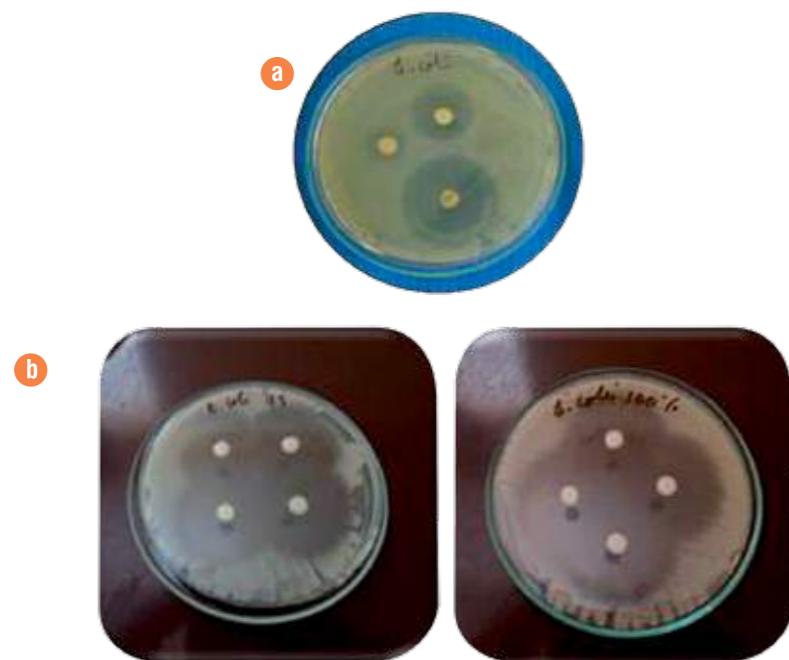


Foto 3: a. Discos de probiótico y discos de ciprofloxacino sobre *E. coli*;
b. Tratamiento asociado de *L. casei* y ciprofloxacino sobre *E. coli*.

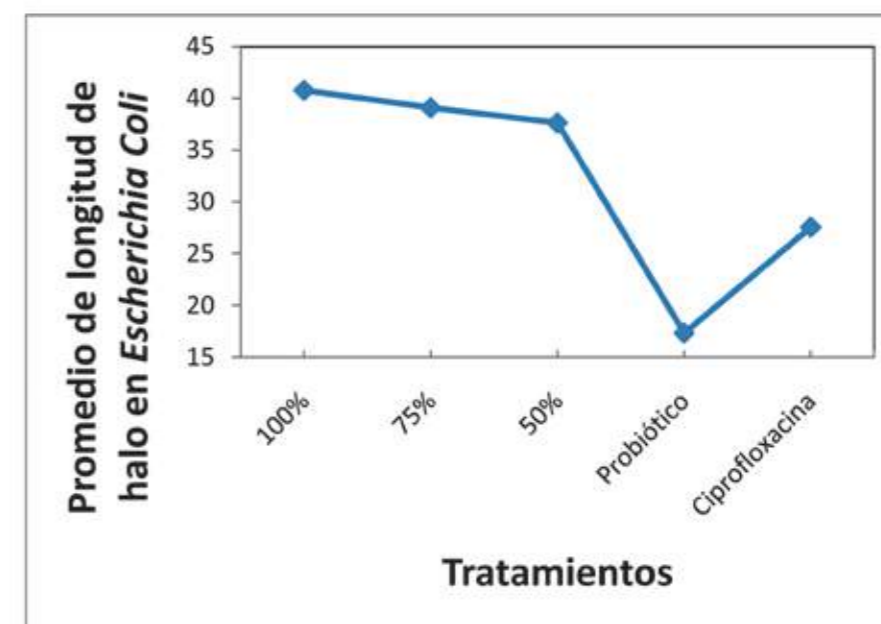
Tabla 2: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a ciprofloxacino sobre *Escherichia coli*, según diámetro de halo de inhibición y mediante la prueba de Duncan.

Tratamientos	Ni	Grupos para Alfa 0.05			
		G1	G2	G3	G4
Probiótico	13	17.31			
Ciprofloxacino	13		27.54		
50%	13			37.62	
75%	13			39.08	
100%	13				40.77

En la tabla N° 2, se muestran los promedios del diámetro de halo de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, después de aplicar la técnica de Kirby y Bauer. Se realizó la prueba de Duncan, para comparar cada uno de los promedios de los halos, encontrándose que existe diferencia alta-

mente significativa entre los tratamientos de la asociación del probiótico al 100% con ciprofloxacino con respecto al antibiótico (G2) y probiótico solo (G1). Hay semejanza entre los tratamientos de la asociación del probiótico al 50% y 75%.

Gráfico 1: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* a diferentes concentraciones en la disminución de la resistencia a ciprofloxacino sobre *Escherichia coli*.



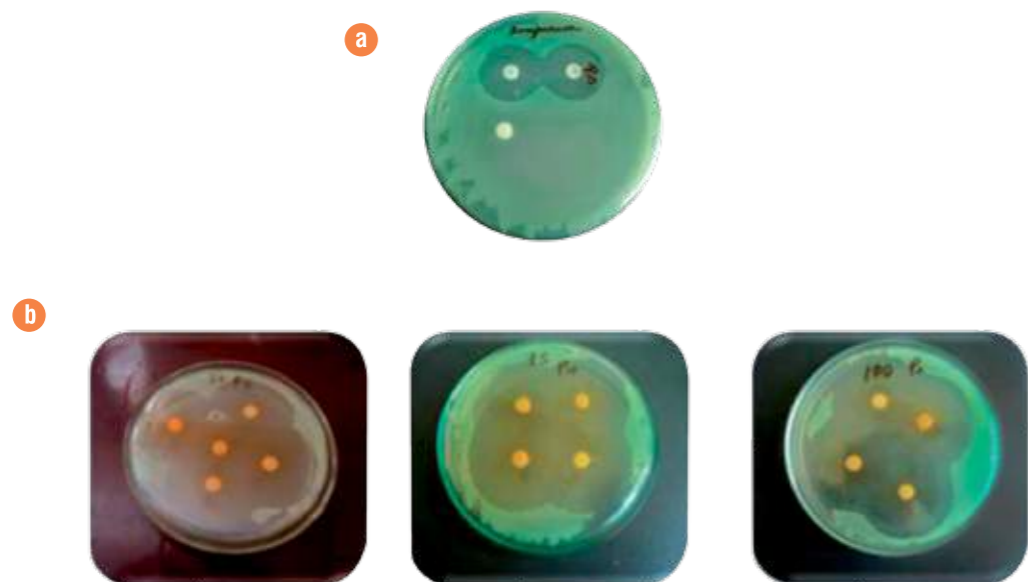
Se muestra el efecto de la asociación del probiótico a las concentraciones del 100%, 75% y 50% con ciprofloxacino, en la disminución de la resistencia de *Escherichia coli*, apreciándose que, conforme aumenta la concentración, la resistencia de la

bacteria disminuye, ya que el diámetro del halo de inhibición aumenta y se diferencian estas asociaciones a la inhibición producida por el probiótico sólo y el ciprofloxacino solo.

Tabla 3: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a imipenem sobre *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de halo de inhibición y mediante el análisis de varianza

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrados Medios	F	P
Tratamientos	8238.37	4	2059.59	847.301	0.000
Error	145.85	60	2.43		
Total	8384.22	64			

El análisis de varianza muestra que existe una diferencia altamente significativa del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* del probiótico asociado a imipenem en relación a los resultados del antibiótico y probióticos solos.



Fotos 3: a. Discos de probiótico y discos de imipenem sobre *Paeruginosa*;
b. Tratamiento asociado de *L. casei* y imipenem sobre *Paeruginosa*.

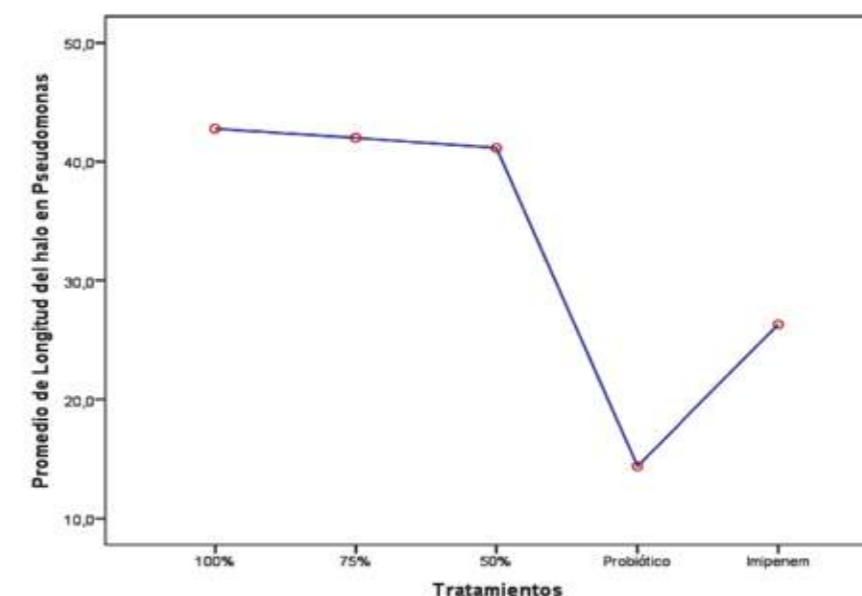
Tabla 4: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a imipenem sobre *Pseudomonas aeruginosa*, según diámetro de halo de inhibición y mediante la prueba de Duncan.

Tratamientos	Ni	Grupos para Alfa 0.05			
		G1	G2	G3	G4
Probiótico	13	14.4			
Imipenem	13		26.3		
50%	13			41.2	
75%	13			42.0	42.0
100%	13				42.8

Se muestran los promedios del diámetro de inhibición de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* después de aplicar la técnica de Kirby y Bauer o de difusión en discos. Se realizó la prueba de Duncan, que comparó cada uno de los promedios de los halos de inhibición, demostrando que no existe

diferencia significativa entre los diámetros promedios de los halos inhibitorios de los tratamientos del probiótico asociado a imipenem al 50%, 75% y 100%, pero sí existe diferencia significativa con el probiótico sólo (G1) y con el antibiótico sólo (G2).

Gráfico N° 2: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* a diferentes concentraciones en la disminución de la resistencia a imipenem sobre *Pseudomonas aeruginosa*.



En el gráfico 2, se aprecia que los tratamientos asociados a imipenem del 100%, 75% y 50% dan resultados semejantes diferenciándose de los resultados con el probiótico solo y con el imipenem solo frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabla 5: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*, según diámetro de halo de inhibición y mediante el análisis de varianza.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrados medios	F	P
Tratamientos	4312.22	4	1078.05	433.444	0.000
Error	149.23	60	2.49		
Total	4461.45	64			

En la tabla N°5, se muestra el análisis de varianza que muestra una diferencia altamente significativa del diámetro del halo de inhibición de los tratamientos asociados del *Lactobacillus casei* con vancomicina, en relación a la vancomicina sola frente a *Staphylococcus aureus*.

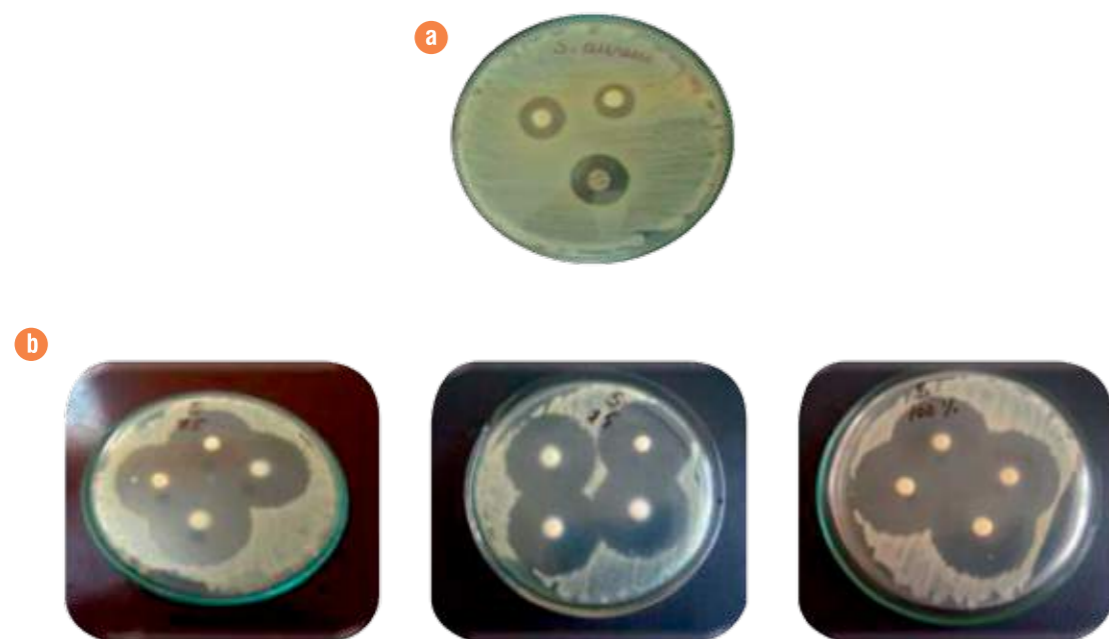


Foto 3: a. Discos de probiótico y discos de vancomicina sobre *S. aureus*;
b. Tratamiento asociado de *L. casei* y Vancomicina sobre *S. aureus*.

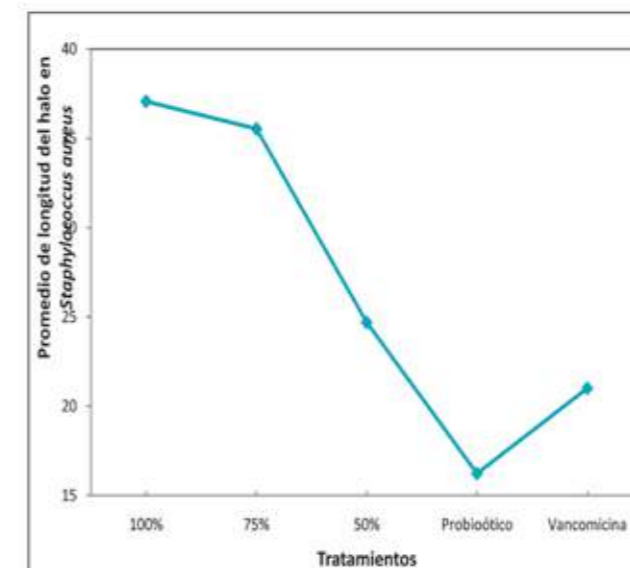
Tabla 6: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*, según diámetro de halo de inhibición y mediante la prueba de Duncan.

Tratamientos	Ni	Grupos para Alfa 0.05				
		G1	G2	G3	G4	G5
Probiótico	13	16.23				
Vancomicina	13		21.00			
50%	13			24.69		
75%	13				35.54	
100%	13					37.08

En la tabla 6, se muestran los promedios del diámetro de halo de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* después de aplicar la técnica de Kirby y Bauer. Se realizó la prueba de Duncan, que comparó cada uno de los promedios de los halos, encontrándose que existe diferencia signi-

ficativa entre los tratamientos de la asociación del probiótico al 100% y 75% con Vancomicina y el uso de Vancomicina sola (G2) y con el probiótico solo (G1). No hay diferencia significativa entre la concentración del 50% asociada a vancomicina (G3) con la vancomicina sola (G2).

Gráfico 3: Efecto probiótico in vitro cuantitativo de *Lactobacillus casei* a diferentes concentraciones en la disminución de la resistencia a vancomicina sobre *Staphylococcus aureus*.



En el gráfico se muestra el efecto de la asociación del probiótico a las concentraciones del 100%, 75% y 50% con vancomicina, en la disminución de la resistencia del *Staphylococcus aureus*, aprecián-

dose que, conforme aumenta la concentración, el diámetro del halo de inhibición aumenta y se diferencian estas asociaciones a la inhibición producida por el probiótico sólo y la vancomicina sola.

Tabla 7: Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Lactobacillus casei* en la asociación con imipenem, ciprofloxacino y vancomicina frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Tratamientos	UFC		
	50%	75%	100%
Asociación de <i>L. casei</i> + Imipenem	0	0	0
Asociación de <i>L. casei</i> + Vancomicina	0	0	0
Asociación de <i>L. casei</i> + Ciprofloxacino	0	0	0

Controles	UFC	Desviación estándar
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> sin Tratamiento	5,85 x 10 ⁸ bact/mL	4,67 x 10 ⁸
<i>Escherichia coli</i> sin tratamiento	1,69 x 10 ⁸ bact/mL	2,50 x 10 ⁸
<i>Staphylococcus aureus</i> sin tratamiento	3,08 x 10 ⁸ bact/mL	3,95 x 10 ⁸

La CMI en todos los tratamientos fue la asociación de cada antibiótico con el 50% de *Lactobacillus casei*, con cero unidades formadoras de colonias (UFC). En las asociaciones de 75% y 100%, tampoco se encontraron UFC, a diferencia de los controles (bacterias sin tratamiento) en los que hubo un crecimiento elevado de bacterias. Así, en el control para *Pseudomonas aeruginosa*, se encontró un promedio de UFC de 5.85 X 10⁸ bact/mL con una desviación estándar de 4.67 X 10⁸ bact/mL. En el control de *Staphylococcus aureus* hubo un promedio de 3.08 X 10⁸ bact/mL, con una desviación estándar de 3.95 X 10⁸. En el caso de *Escherichia coli*, el promedio de UFC de su control fue 1.69 X 10⁸ bact/mL y la desviación estándar al 2.50 X 10⁸.

IV. DISCUSIÓN

Este estudio experimental in vitro demostró la disminución de la resistencia a ciprofloxacino, imipenem y vancomicina sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, al utilizar el probiótico *Lactobacillus casei* a las concentraciones de 50%, 75% y 100%, asociadas a cada uno de los antibióticos frente a las bacterias mencionadas. Los probióticos son microorganismos vivos con gran capacidad antagónica contra otros microorganismos. Es por ello que, al comparar con el efecto del antibiótico solo o del probiótico solo, se encontró que asociado es más efectivo (tablas 1 al 5). Con respecto a *E. coli*, según la escala de Durafford, la asociación del probiótico y ciprofloxa-

cino, en las tres concentraciones utilizadas, dieron resultados sumamente sensibles (gráfico 1)

El análisis de varianza indica que hay diferencia significativa entre los tratamientos. Por la prueba Duncan, se observa que el probiótico solo y el antibiótico solo se diferencian de los tratamientos asociados. En la asociación de 50% y 75% no hay diferencia. Pero hay diferencia significativa con la asociación del probiótico al 100%. Frente al antibiótico solo, la resistencia fue mayor que cuando se evaluó la asociación del antibiótico con el probiótico en sus diferentes concentraciones; en todos los casos, la resistencia disminuyó notablemente (tabla 2, foto 3)

Con respecto a la asociación de imipenem con el probiótico *P. aeruginosa*, según la prueba Duncan, los tratamientos con 50 y 75% son semejantes. Los tratamientos de 75 y 100%, también son semejantes, pero sí hay diferencia significativa entre los tratamientos en que se asoció antibiótico y probiótico, que cuando se usó solo el antibiótico. (tabla 3 y 4, gráfico 2).

Los resultados para *S. aureus* demuestran que la asociación del probiótico al 50, 75 y 100% con vancomicina son más efectivos que los resultados con el antibiótico y el probiótico solos; y los resultados, según el análisis de varianza, son significativos; la prueba Duncan muestra que los cinco tratamientos son estadísticamente diferentes entre sí (tabla 5, gráfico 3).

Las bacterias probióticas pueden producir inhibición del crecimiento bacteriano (FAO) (31), lo que fue comprobado en el presente estudio con la determinación de la CIM. La CIM fue de 50% del probiótico asociado a cada antibiótico, ya que el número de UFC fue de 0, en las concentraciones de 75% y 100%. También se inhibió totalmente el crecimiento de las bacterias, comparado con el control en el que se observa un alto número de UFC, para *E. coli*; las UFC tuvieron un promedio de 1,69 X 10⁸ bact/mL, con una desviación estándar de 2,5 X 10⁸. Muestran los resultados efectos significativos P< 0.001.

Para *P. aeruginosa*, el promedio de UFC en el tratamiento sin antibiótico ni probiótico, fue de 5,85 X 10⁸ bact/mL y la desviación estándar fue 4,67 X 10⁸.

S. aureus fue también altamente sensible a todas las asociaciones de probiótico y vancomicina, ya que no se formaron UFC en estos tratamientos. En cambio el control, es decir, la bacteria sin tratamiento, dio como resultado promedio: 3,08 X 10⁸ bact/mL, con una desviación estándar de 3,95 X 10⁸. Resultados que concuerdan con los hallazgos de Gutiérrez quien encontró que el extracto de *L. casei* presenta una buena actividad antagónica al compararse con su control, y su actividad es mejor cuando utilizó al *lactobacillus* sin diluir, más que cuando lo utilizó diluido hasta 10E-3 (32).

En cuanto a las concentraciones utilizadas en la presente investigación, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos. Las tres concentraciones utilizadas tuvieron similar efecto bactericida, tanto en la determinación de las unidades formadoras de colonias como en la determinación de la susceptibilidad, según la escala de Durafford en la que todas los tratamientos de 50%, 75% y 100%, asociadas a los antibióticos imipenem, vancomicina y ciprofloxacino frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*, dieron resultados sumamente sensibles con halos superiores a 20 mm (fotos 3, 4 y 5), con un promedio de 42 mm para los tratamientos de *P. aeruginosa*. En las asociaciones de *L. casei* con vancomicina, se obtuvo un promedio de 32.44; y para *S. aureus*, un promedio de 39.15 en la asociación de las concentraciones de *L. casei* con ciprofloxacino. Al comparar el efecto inhibitorio de las tres concentraciones de *L. casei*, asociadas a los antibióticos respectivos a través de la prueba de Duncan, se determinó que no existe diferencia significativa en el efecto de las tres concentraciones.

Los promedios de diámetros de susceptibili-

dad, obtenidos después de aplicada la prueba de difusión en discos con relación a los tratamientos con los antibióticos solos, demostró que existe diferencia altamente significativa del efecto en la resistencia con respecto al efecto que tuvieron en las asociaciones *L. casei* con los antibióticos respectivos. El promedio de sensibilidad de los antibióticos solos, para ciprofloxacino, fue de 27.54 mm frente a *E. coli*. 26.3 mm para imipenem frente a *P. aeruginosa*; para vancomicina de 21 mm frente a *S. aureus* (Tablas 2, 4, 6). Según Gutiérrez L., al evaluar el efecto bactericida de *L. casei* frente a *E. coli* mediante las Unidades de Actividad, encontraron que el extracto de *L. casei* es activo aun en diluciones altas, lo cual significa que el extracto tiene actividad en muy pequeñas concentraciones (32 Gutiérrez). El efecto bactericida también fue comprobado por Roldán et al, quienes, al enfrentar a *L. casei* sobre *E. coli* O157: H7, no encontraron bacterias viables de *E. coli* luego de 24 horas de incubación (33). En el presente estudio la CIM fue la menor concentración utilizada; es decir, *L. casei* al 50% asociado a cada antibiótico; probablemente, concentraciones menores también sean efectivas.

El efecto bactericida de *Lactobacillus casei* ha sido determinado por varios investigadores, así Gutiérrez y Acosta, al evaluar las unidades formadoras de colonias de *L. casei* vs. *E. coli* y compararlos con los de la cepa comercial, observaron que el extracto del aislado nativo presenta actividad bactericida frente a este patógeno en todas las diluciones y en los diferentes tiempos de evaluación. Para ambos extractos, la mayor actividad se presenta en los primeros días del ensayo y va disminuyendo a medida que se aumenta el tiempo de los análisis; *L. plantarum* obtuvo los niveles más altos de actividad bactericida con respecto a la cepa nativa (32). Este efecto bactericida podría deberse principalmente a la producción de bacteriocinas, ya que los *Lactobacillus*, tal como *L. casei*, son grandes productoras de estas proteínas, las cuales tienen propiedades bactericidas contra varias especies bacterianas, al permeabilizar su membrana celular (34), formación de poros, que lleva a la dispersión de membrana y el flujo del contenido citoplasmático hacia el espacio extra celular, así como la inhibición de enzimas para su crecimiento (35, 36).

En el presente estudio se ha encontrado resultados de suma importancia. En primer lugar, la asociación del antibiótico y el probiótico disminuyen la resistencia de los microorganismos, eliminando así a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Esta combinación parece

tener todas las características para proveer nuevos y eficaces agentes antibacterianos; ofreciendo una potencial solución a la creciente problemática que representa la aparición de resistencia a antibióticos que se genera debido al uso indebido de estos. Es así que el presente estudio abre nuevas posibilidades en el campo de la investigación clínica como farmacológica.

Finalmente, se acepta la hipótesis de que existe efecto probiótico de *Lactobacillus casei* en la disminución de la resistencia a ciprofloxacino, imipenem y vancomicina sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

V. CONCLUSIONES

- El *Lactobacillus casei* asociado a antibióticos tiene efecto probiótico in vitro en la disminución de la resistencia de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- El *Lactobacillus casei* asociado a ciprofloxacino tuvo efecto en la disminución de la resistencia de *Escherichia coli*.
- El *Lactobacillus casei* asociado a imipenem tuvo efecto en la disminución de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa*.
- El *Lactobacillus casei* asociado a vancomicina tuvo efecto en la disminución de la resistencia de *Staphylococcus aureus*.
- La concentración mínima inhibitoria en todos los casos fue 50% de *Lactobacillus casei* con ciprofloxacino, imipenem y vancomicina para *Escherichia coli*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar la asociación de *Lactobacillus casei* con otros antibióticos frente a bacterias patógenas.
- Evaluar la asociación de *Lactobacillus casei* con antifúngicos para determinar el efecto frente a hongos.
- Realizar pruebas in vivo utilizando la asociación de *Lactobacillus casei* con antibióticos frente a infecciones causadas por *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALVAREZ-OLMO M.; OBERHELMAN R. "Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy", *Clinical Infectious Diseases* 2001. 32:1567-76.
- PÉREZ A. *Probióticos: ¿una nueva alternativa en la prevención de la caries dental?* Revista Estomatológica Herediana. [Internet]. 20 de Marzo del 2008 [Citado el 14 de Abril del 2011];18(1):65-8. Disponible en: <http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/reh/v18n1/a10v18n1.pdf>.
- MUÑOZ K, ALARCÓN M. *Efecto de los probióticos en las condiciones periodontales*. *Rev. Clin. de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación oral*. [Internet]. 30 de Noviembre del 2010. [Citado el 12 de Abril del 2011];3(3):136-39. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0719-01072010000100007&script=sci_arttext.
- BEZKOROVAINY A. 2001. *Probiotics: determinants of survival and growth in the gut*. *Am J Clin Nutr* 73: 399- 405.
- DUNNE C, SHANAHAN F. 2002. *Role of probiotics in the treatment of intestinal infections and inflammation*. *Current Opinion in Gastroenterology* 18: 40-45.
- FEDORAK R, MADSEN K. 2004. *Probiotics and the management of inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis* 10: 286-299.
- DUQUE DE ESTRADA J, HIDALGO I, DÍAZ Y. *Microorganismos probióticos en la prevención de caries dentales*. *MediSur*. [Internet]. 28 de Octubre del 2010. [Citado el 14 de Abril del 2011];8(5): alrededor de 10 pantallas. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1727-897X2010000500012&script=sci_arttext.
- FAO, WHO EXPERTS. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. [Internet]. Octubre 2001 :5-20. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf
- FIGUEROA I, GÓMEZ L, GARCÍA M, CRUZ A. *El beneficio de los probióticos*. *Tecnología*. [Internet]. Agosto del 2006. [Citado el 12 de Abril del 2011]; 22-5. Disponible en: <http://www.alfa-editores.com/alimentaria/Julio-Agosto06/Beneficio.pdf>
- JARAMILLO D, MELÉNDEZ A, SÁNCHEZ MEDINA O. *Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de lactobacilos y bifidobacterias*. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología*. 2010; 1 (2): 193-209.
- NAVA J. *Evaluación de las bacterias ácido lácticas comercializadas como probióticas*. Tesis. Universidad de los Andes. Mérida 2008. Disponible en: http://tesis.ula.ve/pregrado/tde_busca/archivo.php?codArquivo=1249
- 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.
- DOLZ M. *Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE*. *Nutrición clínica y dietética hospitalaria*. [Internet]. 2008. [Citado el 16 de Abril del 2011];28(3): 20-7. Disponible en: http://www.nutricion.org/publicaciones/revistas/NUTRICION-28_3_20_37.pdf
- SCHEZENMEIR J, DE VRESE M. *Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition*. *Am J Clin Nutr* 2001;73(Suppl.):361S-364S.
- BEZKOROVAINY A. 2001. *Probiotics: determinants of survival and growth in the gut*. *Am J Clin Nutr* 73: 399- 405.
- DUNNE C, SHANAHAN F. 2002. *Role of probiotics in the treatment of intestinal infections and inflammation*. *Current Opinion in Gastroenterology* 18: 40-45.
- DE ROSS N, KATAN M. 2000. *Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998*. *Am J Clin Nutr* 71: 405-411.
- SALMINEN S, ARVILOMMI H. 2001. "Probiotics demonstrating efficacy in clinical settings" *Clinical Infectious Diseases* 32:1577-8.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO. *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*. Geneva, Switz. Expert Consultation Report 2001 at: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>
- LÁZARO, E.; OTEO, J.: *Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España*. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud*, 30: 10, 2006.
- OTEO J, CUEVAS O, NAVARRO C, ARACIL B, CAMPOS J. 2007. *Resistencia a múltiples antibióticos en Escherichia coli*. Disponible en: www.posteressiononline.com/312191188_es/.../poster_19210.pdf
- CALDERÓN C, PADILLA C, CHAVES C, VILLALOBOS L Y ARIAS M. *Evaluación del efecto del cultivo probiótico Lactobacillus rhamnosus adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de Staphylococcus aureus, Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes y Salmonella enteritidis*. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 2007; 57, 1.
- ESTRADA A, GUTIÉRREZ L, MONTOYA O. *Evaluación in vitro del efecto bactericida de cepas nativas de Lactobacillus sp. contra Salmonella sp. y Escherichia coli*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 2005. 58 (1): 2601-2609.
- LOPEZ M, DOMINGO D. *Antibioticoterapia con probióticos*. *Revisión Española de Quimioterapia*. Junio 2007: 20 (2): 170-181.
- SALVATIERRA Y. *Efecto antibacteriano in vitro de bacterias probióticas de los productos Bacilor®, Lactibiane®, Lactocereal®, Yogurt Yoleit Probiótico® sobre Streptococcus mutans*. Tesis de Bachiller en Estomatología. Universidad Nacional de Trujillo. Perú 2011.
- BACILOR. ROCHE ECUADOR, SA. ECUADOR. CITADO EL 22 DE ABRIL DEL 2011. Disponible en: <http://www.pimfarmacias.com/ecuador/DEF/PLM/productos/39534-htm>.
- SACAQUISPE RE, VELÁSQUEZ J. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana*. Lima: Instituto Nacional de Salud. Serie de Normas Técnicas N° 30; 2002.
- DURAFFOURD C, LAPRAZ J. *Cuaderno de fitoterapia clínica*. Editorial Masson; Francia 1983.
- STEEL R, TORRIE J. 1986. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. Mc Graw-Hill, Bogotá.
- WILLIAMS JR. *The declaration of Helsinki and public health*. *Bulletin of the World Health Organization* 2008; 86: 650-651
- FAO, WHO EXPERTS. *Health and Nutritional properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria*. Octubre 2001: 5-20. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

GUTIÉRREZ L, ACOSTA E. *Determinación del potencial bactericida in vitro de un aislado nativo de Lactobacillus casei frente E. coli.* Revista Lasallista de Investigación. 2008 - vol. 5 no. 2: 68-73.

ROLDÁN M, OTERO J, VILLAREAL F, BARONI M, CARRASCO M, ALVAREZ C, WHITE K ET AL. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2011; 31:37-41

CASAUS P, NES F, HERNANDEZ E, IZARRA M, HERRANZ C. *Bacteriocins of lactic acid bacteria. Food science and technology international.* 2001.[Citado el 12 de Abril del 2011]; 7(

4), 281-98. Disponible en: <http://fst.sagepub.com/content/4/281.abstract>.

PRADO M, S-LAYER DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS. *Caracterización y análisis funcional.* 2010. Disponible en digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tsis_4606_Prado_Acosta.pdf.

ROLDÁN L, OTERO JL, CARRASCO M, BARONI MR, ÁLVAREZ C, RUSSELL WHITE K Y COL. *Utilización de bacterias ácido lácticas para el control de Escherichia coli 0157:H7 en productos cárnicos.* Rev Argent Microbiol. 2007; 39:125.

USO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS: UN PARADIGMA EN PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS Y NO QUIRÚRGICOS DE LA REGIÓN MAXILOFACIAL.

USE OF PLATELET RICH PLASMA: A PARADIGM IN SURGICAL AND NON-SURGICAL PROCEDURES OF THE MAXILLOFACIAL AREA.

AUTORES

Einer Villarreal Becerra¹

Abel Ronquillo Roncagliolo²

RESUMEN

El plasma rico en plaquetas, representa un coágulo sanguíneo autólogo que contiene un número concentrado de plaquetas. En vista de su naturaleza autóloga, está libre de enfermedades transmisibles y exenta de reacciones de hipersensibilidad. En el conteo plaquetario, el mínimo número de trombocitos que requiere el coágulo para calificar como plasma rico en plaquetas es discutido; pero, una concentración de aproximadamente 1 millón plaquetas/ μL , o valores de cuatro a siete veces superiores al valor normal de plaquetas, ha demostrado proveer beneficios clínicos.

Inicialmente se tuvo la concepción de que las plaquetas actuaban exclusivamente en el proceso de hemostasia. No obstante, actualmente hemos aprendido que poseen además la capacidad de liberación de sustancias proteicas bioactivas, denominadas factores de crecimiento; responsables de la atracción de macrófagos, células mesenquimales pluripotenciales y osteoblastos; los cuales no sólo promueven la remoción de tejido necrótico; si no también, son capaces de mejorar la cicatrización y optimizar la regeneración tisular.

El plasma rico en plaquetas es usado extensamente en diversos campos médicos para promover la regeneración de tejidos duros y blandos. Dentro de estos tenemos; cirugía maxilofacial, cirugía plástica, oftalmología, neurocirugía, cirugía ortopédica y traumatológica, otorrino, cirugía cardiovascular, reumatología, dermatología estética, entre otras.

El objetivo del presente estudio fue confirmar clínicamente el valor terapéutico del plasma rico en plaquetas en aplicaciones emergentes, quirúrgicas y no quirúrgicas de la región maxilofacial, como; la bioactivación de la superficie de los implantes dentales, su uso en regeneración ósea maxilar y como biomaterial en los procedimientos de rejuvenecimiento facial; tal como ha sido reportado en la literatura.

Palabras clave: Plasma rico en plaquetas, factores de crecimiento, regeneración tisular, rejuvenecimiento facial, implantes dentales, regeneración ósea.

1. Doctor en Técnicas Clínicas en Odontología, Universidad de Barcelona- España.
Diplomado Europeo en Estudios Avanzados.
Especialista en Periodoncia.
Profesor y Coordinador Académico en la Escuela de Estomatología, Universidad Privada Antenor Orrego.

2. Candidato a Maestro.
Especialista en rehabilitación oral.
Administrador Clínica Estomatológica, Universidad Privada Antenor Orrego.

Correspondencia: evillarreal@upao.edu.pe