

Evaluación del efecto antimicrobiano de cultivos de *Lactobacillus spp* con y sin inulina contra *Helicobacter pylori* y *Campylobacter jejuni*

¹Jiménez Villeda B., ²Falfán Cortés N., ³Cariño Cortés R., ¹Santos López E., ¹Rangel Vargas E., ¹Castro Rosas J.

¹ Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Ciudad del Conocimiento, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH), Carretera Pachuca-Tulancingo Km 4.5, Mineral de la Reforma, C.P. 42184, Hidalgo, México.

² Catedrática CONACYT CONACYT-UAEH, Mineral de la Reforma, C.P. 42184, Hidalgo, México

³ Instituto de Ciencias de la Salud, UAEH, Carretera Actopan-Tilcuautla, Ex-Hacienda la Concepción s/n. San Agustín Tlaxiaca, C.P. 42086, Hidalgo, México.

Correo: ji196877@uaeh.edu.mx

Palabras clave: Probióticos, prebiótico, inhibición, inulina

Introducción:

En la actualidad *Helicobacter pylori* es responsable de hasta el 70% de las infecciones intestinales a nivel mundial además ha sido clasificado, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como carcinógeno clase I. La preocupación creciente por erradicar este microorganismo patógeno es prevalente ya que puede colonizar hasta del 90% en la población adulta. Existen diferentes terapias para el tratamiento de *H. pylori* entre las que destacan la terapia triple estándar, en la que se utiliza un inhibidor de la bomba de protones junto a 2 antibióticos [1]. Sin embargo, derivado del uso constante de antibióticos en la terapia contra *H. pylori*, este microorganismo ha comenzado a desarrollar resistencia a diferentes antibióticos. Recientemente, se ha propuesto el uso de probióticos para prevenir y tratar diversas afecciones gastrointestinales causadas por *H. pylori*, incluidos los efectos secundarios inducidos por antibióticos. Además de que los probióticos podrían actuar como coadyuvantes en los tratamientos terapéuticos, podrían contribuir a la disminución de los efectos de los medicamentos en los pacientes. Gong et al. [2], encontraron una probabilidad más baja de erradicación de *H. pylori* solo con la terapia triple, en comparación con la terapia triple con suplementos de probióticos; además, observaron una reducción significativa en los efectos secundarios, como náuseas, vómitos, distensión abdominal, dolor epigástrico, diarrea, estreñimiento, distorsión del gusto y erupción cutánea. Hong et al. [3], evidenciaron que *Lactobacillus paracasei* HP7, tenía efectos inhibidores contra *H. pylori* tanto en ensayos *in vitro* como en ensayos *in vivo*.

Campylobacter jejuni es otro de los patógenos transmitido por los alimentos que está considerada dentro de las cuatro principales causas a nivel mundial de gastroenteritis, además de tener una tasa de mortalidad elevada en niños, personas de la tercera edad e inmunodeprimidos [4]. Tradicionalmente, los casos graves o prolongados de campilobacteriosis se han tratado con antibióticos, sin embargo, el uso excesivo de antibióticos ha provocado la aparición de cepas resistentes a los antibióticos. *C. jejuni* puede adquirir resistencia a los antibióticos por mutaciones espontáneas y transferencia horizontal de genes a través de la transformación, transducción y conjugación naturales [4]. Bratz et al. [5], demostraron que múltiples cepas de *Lactobacillus* inhibieron el crecimiento de *C. jejuni in vitro* debido a la producción de ácido orgánico. Es importante señalar que se ha reportado que mediante el uso de prebióticos (como la inulina) se puede incrementar el efecto antimicrobiano o benéfico de los probióticos.

Recientemente, en nuestro laboratorio se aislaron 3 cepas de *Lactobacillus sp* las que se denominaron como UAEH17, UAEH19 y UAEH25 y que mostraron efecto antimicrobiano contra *Salmonella* Typhimurium y *Escherichia coli* productora de toxina Shiga tanto en medio de cultivo como en ratones CD-1 [6]. Es importante señalar que, de acuerdo con los criterios internacionales, estas 3 cepas de *Lactobacillus* son consideradas como bacterias probióticas.

El objetivo fue evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano de cultivos de las cepas probióticas de *Lactobacillus sp* UAEH17 (L17), *Lactobacillus sp* UAEH19 (L19) y *Lactobacillus sp* UAEH25 (L25) con y sin inulina, contra *H. pylori* y *C. jejuni*.

Metodología:

Materiales biológicos y reactivos: Se utilizaron las cepas probióticas L17, L19 y L25 resistentes a rifampicina que fueron proporcionadas por el laboratorio de Microbiológica de Alimentos del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Las cepas de *H. pylori* (ATCC 43504) y *C. jejuni* (ATCC 33560) fueron adquiridas en ATCC Product Sheet. La inulina se obtuvo de Sigma Aldrich.

Suplementación de medio de cultivo con inulina: Se utilizó caldo Man-Rogosa-Sharp (MRS) como medio de cultivo que se utilizó con y sin inulina en una concentración de 0.6, 0.8, 1.0 y 1.2% (p / v).

Inoculación: Tubo de caldo MRS (10 mL) con y sin inulina, fueron inoculados con 1×10^6 UFC/mL de probióticos (L17, L19 y L25), e incubados a 37 °C durante 48 h en condiciones anaeróbicas utilizando el sistema GasPak (Mitsubishi Gas Chemical Company Inc., Australia) y sobres generadores de gas GasPak EZ Campy.

Efecto inhibitorio de las cepas probióticas de *Lactobacillus* spp. contra *H. pylori* y *C. jejuni*: Se realizó de empleando las técnicas de difusión en pozo y la técnica de “Técnica del botón: spot on the lawn” descritas por Sgouras et al. [7] y Sierra et al. [8], respectivamente. Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos se calcularon con un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey utilizando el software Statgraphics Centurion XVI StatPoint Technologies USA, 2009 (StatPoint Technologies, Inc. EUA, 2009).

Resultados y discusión:

Las tres bacterias probióticas L17, L19 y L25 presentaron efecto inhibitorio contra *H. pylori* y *C. jejuni* en medio de cultivo con ambas técnicas de estudios tal y como se aprecia en las Figuras 1 y 2.



Figura 1. Prueba de efecto inhibitorio de L17 frente a *H. pylori* (Técnica del botón: spot on the lawn)

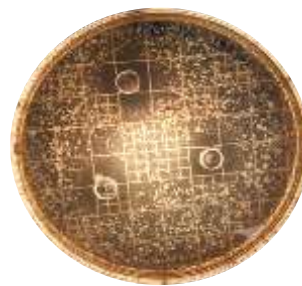


Figura 2. Prueba de efecto inhibitorio de L17 con 0.6% de inulina frente a *H. pylori* (Difusión en pozo)

Además, cuando se incorporó inulina al caldo MRS en el que se crecieron los 3 probióticos, en general, se observó un incremento ($p < 0.05$) en el efecto inhibitorio en el medio de cultivos de los tres probióticos sobre *H. pylori* (Figuras 3).

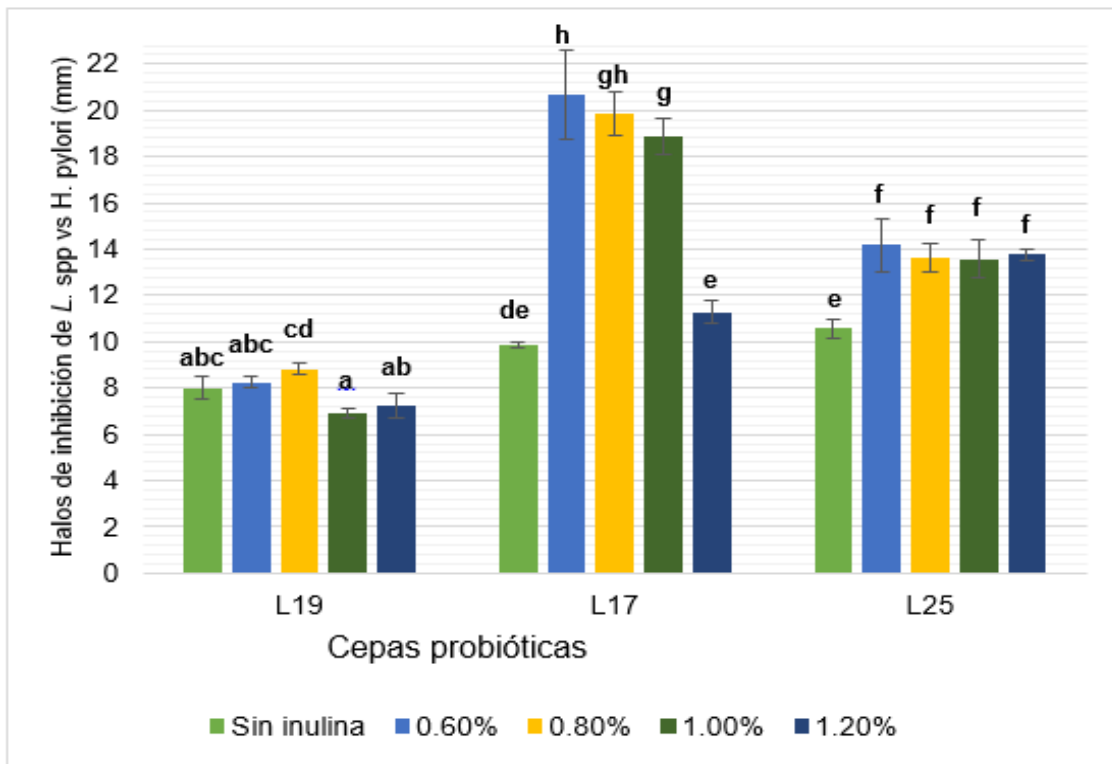


Figura 3. Efecto inhibitorio (mm) de cultivos de las 3 cepas probióticas desarrolladas en caldo MRS sin y con inulina sobre *H. pylori* mediante la técnica de pozos.

Hong et al. [3] hallaron que *Lactobacillus paracasei* HP7 era capaz de inhibir a *H. pylori* obteniendo halos de 12.7 a 15.7 mm, sin embargo, dichos autores no emplearon algún prebiótico, por lo que se podría decir que la presencia de inulina potencializa el efecto inhibitorio contra *H. pylori*

Sin embargo, para el caso de *C. jejuni*, la adición de inulina al medio MRS en donde crecieron los probióticos previo a los estudios de inhibición por la técnica de pozos, en la mayoría de los casos, no provocó incrementos estadísticamente significativos en el efecto antibacteriano ($p < 0.05$) (Figura 4). Más específicamente, el mejor efecto inhibitorio de los 3 probióticos contra *C. jejuni* lo presentó la cepa L19 con una zona de inhibición de 13.0 mm y que creció en MRS sin inulina. Para el caso del probióticos L25, éste también incremento significativamente su efecto antibacteriano contra *C. jejuni* en presencia de inulina

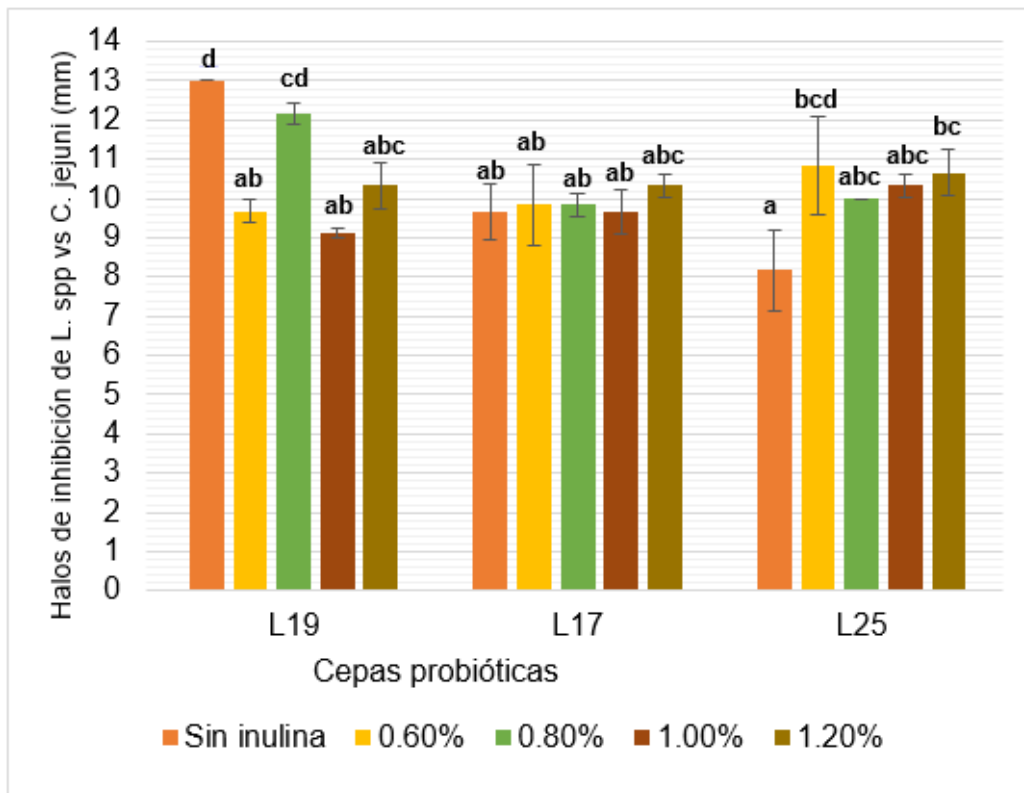


Figura 4. Efecto inhibitorio (mm) de cultivos de las 3 cepas probióticas desarrollados caldo MRS sin y con inulina sobre *C. jejuni* mediante la técnica de pozos

En este estudio, se observó un efecto antibacteriano diferente de las 3 bacterias probióticas contra *H. pylori* y *C. jejuni*. Se observó mayor efecto inhibitorio contra *H. pylori* que contra *C. jejuni*. También, en general, la inulina incrementó el efecto de los 3 probióticos sobre *H. pylori* que contra *C. jejuni*. A pesar de esto, los resultados sugieren que el potencial de las 3 cepas probióticas analizadas (L17, L19 y L25) en mezcla con la inulina como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades provocadas por *H. pylori* y *C. jejuni*. No obstante, es necesario realizar estudios al menos en modelos animales para tener mayor conocimiento del potencial real de estas cepas probióticas en la prevención y control de *H. pylori* y *C. jejuni*.

Finalmente, se determinó el efecto de la inulina en la concentración (UFC/mL) de las 3 cepas probióticas en caldo MRS sin y con inulina (Figura 5). Como se observa, la inulina no provoca un incremento significativo ($p < 0.05$) en la concentración de los 3 probióticos en caldo MRS. No obstante, como se mencionó arriba, es recomendable el uso de inulina como prebiótico ya que, aunque ésta no estimuló el crecimiento de *H. pylori* y *C. jejuni*, si provocó un incremento en el efecto antimicrobiano contra *H. pylori* y en algunos casos contra *C. jejuni*. No obstante, es necesario realizar estudios al menos en modelos animales para conocer el efecto probiótico de las 3 cepas analizadas contra *H. pylori* y *C. jejuni*.

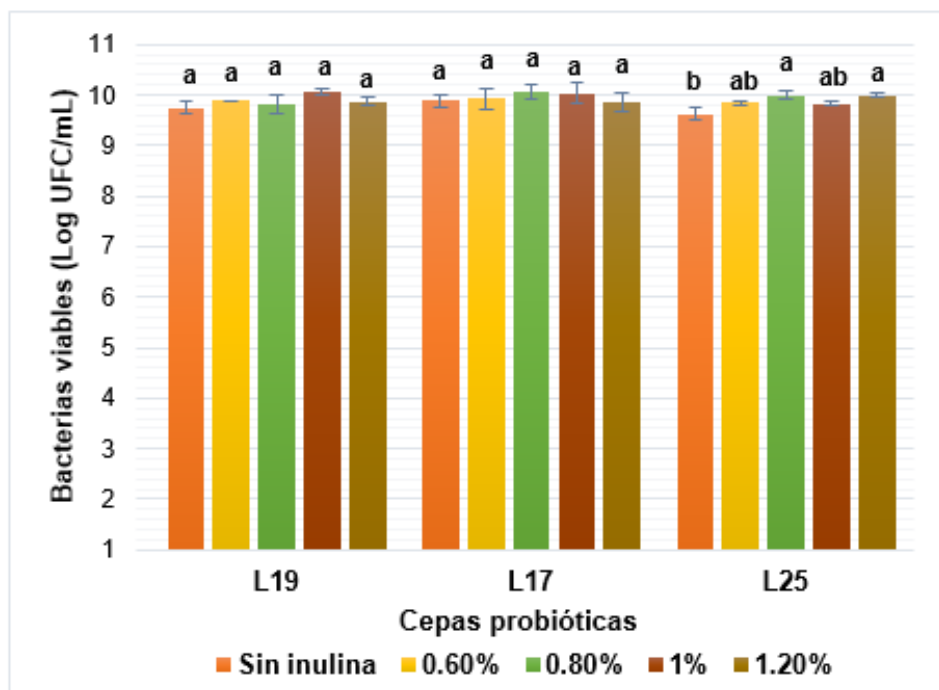


Figura 5. Concentración (UFC/mL) de las 3 cepas de *Lactobacillus* sp en caldo MRS sin inulina y con las distintas concentraciones de inulina

Conclusiones

Las tres cepas probióticas (L19, L17 y L25) presentaron efecto inhibitorio contra *H. pylori* y *C. jejuni*. En general, la inulina incremento el efecto antibacteriano *in vitro* de las 3 cepas de estudio. Las 3 cepas probiótica de *Lactobacillus* sp UAEH17, *Lactobacillus* sp UAEH19 y *Lactobacillus* sp UAEH25 tiene potencial uso como coadyuvantes en el tratamiento de enfermedades causadas por *H. pylori* y *C. jejuni*. No obstante, es necesario realizar estudios al menos en modelos animales para conocer el efecto probiótico de las 3 cepas analizadas contra *H. pylori* y *C. jejuni*.

Referencias

- [1] Kutluk, G., Tutar, E., Bayrak, A., Volkan, B., Akyon, Y., Celikel, C., & Ertem, D. (2014). Sequential therapy versus standard triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication in children: Any advantage in clarithromycin-resistant strains? *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **26**(11), 1202–1208. <https://doi.org/10.1097/MEG.000000000000190>
- [2] Gong, Y., Li, Y., & Sun, Q. (2015). Probiotics improve efficacy and tolerability of triple therapy to eradicate *helicobacter pylori*: A meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**(4), 6530–6543.
- [3] Hong, S.-S., Lee, H.-A., Kim, J. Y., Jeong, J.-W., Shim, J.-J., Lee, J. L., Sim, J.-H., Chung, Y., & Kim, O. (2018). *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus paracasei* HP7. *Laboratory Animal Research*, **34**(4), 216. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.216>
- [4] Kumar, A., Drozd, M., Pina-Mimbela, R., Xu, X., Helmy, Y. A., Antwi, J., Fuchs, J. R., Nislow, C., Templeton, J., Blackall, P. J., & Rajashekara, G. (2016). Novel anti-campylobacter compounds identified using high throughput screening of a pre-selected enriched small molecules library. *Frontiers in Microbiology*, **7**(APR), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00405>

- [5] Bratz, K., Gözl, G., Janczyk, P., Nöckler, K., & Alter, T. (2015). Analysis of *in vitro* and *in vivo* effects of probiotics against *Campylobacter* spp. *Berliner Und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **128**(3–4), 155–162. <https://doi.org/10.2376/0005-9366-128-155>
- [6] Jiménez Villeda B.E. Tesis de Maestría. 2016. Evaluación del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas en medios de cultivo y en ratones CD-1. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- [7] Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, B., Eriotou, E., Michopoulos, S., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., & Mentis, A. (2004). *In Vitro* and *In Vivo* Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1), 518–526. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.518-526.2004>
- [8] Sierra, F., Forero, J. D., & Rey, M. (2014). Tratamiento ideal de *Helicobacter pylori*: una revisión sistemática. *Revista de Gastroenterología de México*, **79**(1), 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2013.03.003>