

Sección: Artículo de investigación

Evaluación de la Sinergia de la Actividad Antimicrobiana de Cepas de Bacterias Lácticas Contra Patógeno

Artículo de Pino AI, Albarracín L, Parra N, Toledo JR, Villena J, Quilodrán-Vega S

CIENCIA VETERINARIA, Vol. 25, N° 1 (2023) ISSN 1515-1883 (impreso) E-ISSN 1853-8495 (en línea)

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet202325101>

Evaluación de la Sinergia de la Actividad Antimicrobiana de Cepas de Bacterias Lácticas Contra Patógenos

Antimicrobial Synergy Evaluation of Lactic Bacteria Strains Against Pathogens

Avaliação da Sinergia da Atividade Antimicrobiana de Cepas de Bactérias Lácticas Contra Patógenos

Pino AI¹, Albarracín L.², Parra N³, Toledo JR³, Villena J², Quilodrán-Vega S¹

- 1 Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
- 2 Laboratorio de Inmunobiotecnología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET), Tucumán, Argentina.
- 3 Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

Correo electrónico: squilodran@udec.cl

DOI: <http://dx.doi.org/10.19137/cienvet202325101>

Fecha de recibido: 06/09/2022

Fecha de aceptado para su publicación: 31/10/2022

RESUMEN

Una de las propiedades biológicas más notables atribuidas a los probióticos es su actividad antimicrobiana. La investigación sobre probióticos se ha centrado tradicionalmente en cepas individuales,



Esta obra se publica bajo licencia Creative Commons 4.0 Internacional. (Atribución-No Comercial-Compartir Igual) a menos que se indique lo contrario, <http://www.creativecommons.org.ar/licencias.html>

sin embargo, las combinaciones de cepas probióticas pueden tener un espectro de acción más amplio o efectos sinérgicos, potenciando su acción protectora. El objetivo de esta investigación fue evaluar efecto sinérgico de cepas de bacterias lácticas aisladas de leche materna de diferentes orígenes sobre la inhibición de patógenos bacterianos de importancia en medicina humana y animal. Se emplearon combinaciones de siete cepas de bacterias lácticas juntadas en pares y se estudió su efecto inhibitorio sobre los patógenos bacterianos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, y *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 y una cepa de *E. coli* enterohemorrágica. La combinación de las cepas TUCO-5E + TUCO-L2 fue la más efectiva en la inhibición del desarrollo de todos los patógenos evaluados, destacando su efecto sobre *K. pneumoniae* y *A. baumannii*. Cinco de las combinaciones evaluadas mostraron efectos sinérgicos en la inhibición de patógenos extraintestinales: a) se observó efecto sinérgico entre las cepas TUCO-5E + TUCO-L2 para la inhibición de *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, b) efecto sinérgico para TUCO-5E + TUCO-2, TUCO-5 + TUCO-2, y TUCO-3 + TUCO-17 sobre *K. pneumoniae* y, c) efecto sinérgico para TUCO-16 + TUCO-17 sobre *A. baumannii*. Las combinaciones que mostraron sinergia en el efecto antimicrobiano son buenas candidatas para el desarrollo de probióticos multicepa para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas específicas.

Palabras clave: Probióticos, Sinergia, *Lactobacillus*, Actividad Antimicrobiana.

ABSTRACT

One of the most notable biological properties attributed to probiotics is their antimicrobial activity. Probiotics research has traditionally been focused on single strains, however, probiotic strains combinations can have a broader spectrum of action or synergistic effects, enhancing their protective action. The objective of this research was to evaluate the synergistic effect of lactic acid bacteria isolated from breast milk of different origins on the inhibition of bacterial pathogens of importance in human and animal medicine. Combinations of seven strains of lactic acid bacteria paired together were used and their inhibitory effect on bacterial pathogens *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella*

enterica ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and an enterohemorrhagic *E. coli* strain was investigated. The combination TUCO-5E + TUCO-L2 was the most effective in inhibiting the growth of all pathogens evaluated, highlighting its effect on *K. pneumoniae* y *A. baumannii*. Five of the evaluated combinations showed synergistic effects in the inhibition of extraintestinal pathogens: a) a synergistic effect was observed between strains TUCO-5E + TUCO-L2 for the inhibition of *K. pneumoniae* and *A. baumannii*, b) synergistic effect for TUCO-5E + TUCO-2, TUCO-5 + TUCO-2, and TUCO-3 + TUCO-17 on *K. pneumoniae* and, c) synergistic effect for TUCO-16 + TUCO-17 on *A. baumannii*. The combinations that showed synergy in the antimicrobial effect are good candidates for the development of multistrain probiotics for the prevention and treatment of specific bacterial infections.

Keywords: Probiotics, Synergy, *Lactobacillus*, Antimicrobial Activity

RESUMO

Uma das propriedades biológicas mais notáveis atribuídas aos probióticos é a sua atividade antimicrobiana. A investigação sobre probióticos está focado tradicionalmente em cepas individuais, porém, as *combinações de cepas probióticas podem ter um espectro de ação mais amplo, ou efeitos de sinergia que potenciam sua ação de proteção*. O objetivo desta investigação foi avaliar o efeito de sinergia de cepas de bactérias lácticas, isoladas do leite materno de diferentes origens, na inibição de patógenos bacterianos importantes na medicina humana e animal. Sete combinações de cepas de pares de bactérias lácticas foram usadas e o efeito de inibição contra patógenos bacterianos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, e *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 e uma cepa de *E. coli* enterohemorrágica. A combinação das cepas TUCO-5E + TUCO-L2 foi a mais efetiva na inibição do crescimento de todos os patógenos avaliados, destacando o efeito contra *K. pneumoniae* e *A. baumannii*. Cinco combinações apresentaram efeito de sinergia na inibição de patógenos extraintestinais: a) efeito de sinergia das cepas TUCO-5E + TUCO-L2 na inibição de *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, b) efeito de sinergia das cepas TUCO-5E + TUCO-2,

TUCO-5 + TUCO-2, e TUCO-3 + TUCO-17 contra *K. pneumoniae* e c) efeito de sinergia das cepas TUCO-16 + TUCO-17 contra *A. baumannii*. As combinações das cepas que apresentaram sinergia na inibição contra as cepas patógenas são boas candidatas para a elaboração de productos probióticos multicepa para prevenir e tratar infecções bacterianas específicas.

Palavras-chave: Probióticos, Sinergia, *Lactobacillus*, Atividade Antimicrobiana

Introducción

Los antibióticos están entre los más destacados avances en medicina y han traído grandes beneficios al tratamiento y control de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la habilidad de los microorganismos de evolucionar rápidamente junto al uso excesivo e inapropiado de los antibióticos han conducido a la expansión de la resistencia antimicrobiana en las bacterias patógenas^(1,2). La resistencia a los antimicrobianos es una amenaza a la salud humana y animal, con grandes pérdidas económicas, fallas en los tratamientos y aumento en la morbilidad y mortalidad. Esto hace indispensable la reducción del uso de antimicrobianos y la búsqueda de nuevas opciones preventivas y terapéuticas para el control de las infecciones⁽²⁾.

Una de las alternativas al uso de antibióticos son los probióticos⁽²⁾, los cuales se definen como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas brindan un beneficio a la salud del hospedador^(3,4). Un microorganismo probiótico debe estar identificado a nivel de cepa, estar suficientemente caracterizado en términos de su inocuidad y estabilidad genética, y poseer un beneficio para la salud respaldado por estudios clínicos en el huésped en que se pretende usar^(5,6,7). Además, los microorganismos probióticos deben permanecer viables en el producto en el que se incorporan y mantener una dosis eficaz durante toda la vida útil del producto⁽⁶⁾.

Los probióticos pueden tener diversos efectos beneficiosos para la salud, por ejemplo, a nivel digestivo, inmunológico, cardiovascular y neurológico^(1,4). El consenso general es que los beneficios para la

salud inducidos por los probióticos son cepa específicos y no se pueden extrapolar a otras cepas, ni siquiera de la misma especie, sin estudios que lo respalden^(1,3). El efecto más reconocido de los probióticos y su principal aplicación, tanto en las personas como en los animales, es la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales y diarrea^(3,8,9). En medicina humana y veterinaria se ha documentado que el consumo de probióticos disminuye el riesgo de enfermedades infecciosas, y también reduce la duración media de los síntomas en cuadros agudos comunes, reduciendo de este modo la necesidad de usar antibióticos^(1,10).

Los mecanismos a través de los cuales los probióticos pueden mejorar la resistencia a infecciones son variados e incluyen la regulación de la microbiota intestinal, la inhibición de microorganismos patógenos, y la modulación de la respuesta inmune^(1,4,11). Los probióticos pueden contribuir en la eliminación de microorganismos patógenos mediante la mejora de la barrera mucosa, al estimular la producción de mucus, defensinas, IgA y reforzar uniones intercelulares. También pueden ejercer la exclusión competitiva de patógenos al utilizar los sitios de unión y los nutrientes disponibles, o a través de la producción de sustancias con efecto antimicrobiano como ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, óxido nítrico y bacteriocinas^(1,4,12). Se ha demostrado la efectividad de algunas cepas probióticas en la inhibición de bacterias patógenas gastrointestinales como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*⁽¹¹⁻¹³⁾.

Los principales orígenes de aislamiento de los microorganismos probióticos son el tracto digestivo humano o animal, alimentos de origen animal o vegetal, fermentados o no fermentados, y leche materna humana o animal^(14,15,16). Diversas cepas aisladas desde leche animal han mostrado características probióticas prometedoras, como la capacidad de sobrevivir al tránsito gastrointestinal, la adherencia a la mucosa intestinal, inmunomodulación y actividad inhibitoria de patógenos. Se han evaluado cepas de leche de cabra^(17,18), leche de cerda^(19,20), leche de perra^(21,22), leche de vaca⁽¹⁸⁾ y leche de llama⁽²³⁾, entre otras.

Frecuentemente los probióticos se estudian como cepas individuales y luego se formulan comercialmente como productos multicepa⁽²⁴⁾, para lograr efectos aditivos o sinérgicos⁽²⁵⁾. Algunos

efectos sinérgicos propuestos son el aumento en la adherencia al mucus intestinal y el incremento de la actividad antimicrobiana, aunque también se han registrado efectos negativos como el antagonismo entre las cepas combinadas^(25,26). Existe evidencia de la efectividad de los probióticos multicepa y multiespecie, tanto en animales como humanos, por ejemplo, en problemas digestivos, infecciones respiratorias, e inmunomodulación^(13,26,27-29). Sin embargo, pocos estudios comparan probióticos multicepa y multiespecie con cepas individuales para evaluar si hay diferencia en su efecto. Se ha reportado que algunas combinaciones probióticas tienen mejor adherencia al mucus intestinal que cada cepa individualmente⁽³⁰⁾, o mayor inhibición de la adherencia de patógenos a la mucosa^(31,32). En otros estudios hay resultados variables, donde solo algunas de las combinaciones probióticas muestran mayor efectividad que las cepas individuales, y en algunos casos las dosis utilizadas no son equivalentes para la combinación y la cepa individual, por lo que no se puede concluir que el efecto sea debido a la sinergia de las cepas y no a una mayor concentración total de las bacterias probióticas^(25,27).

Este trabajo se enfocó en la búsqueda de nuevas combinaciones de cepas de lactobacilos potencialmente probióticos que sean capaces de inhibir patógenos bacterianos de importancia en medicina humana y animal, para su potencial uso en la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas. Para ello, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de las cepas de lactobacilos en diferentes combinaciones, con el objetivo de encontrar aquellas que fueran sinérgicas en la inhibición de patógenos, y que tengan mayor probabilidad de ser efectivas clínicamente.

Materiales y método

MICROORGANISMOS

Las cepas de bacterias lácticas utilizadas pertenecen a la colección de cultivos del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción (Chillán, Chile). Las cepas fueron previamente aisladas desde leche materna de diferentes animales y caracterizadas para su resistencia a pH 3, y a diferentes concentraciones de Ovgall y NaCl. *Levilactobacillus brevis* TUCO-5E⁽²⁰⁾ (leche de cerda), *Ligilactobacillus salivarius* TUCO-L2⁽²³⁾ (leche de llama),

Lactiplantibacillus plantarum TUCO-2 (leche de cabra), *Pediococcus pentosaceus* TUCO-3 (leche de gata), *Lactiplantibacillus plantarum* TUCO-5 (leche de cerda), *Lactobacillus* sp. TUCO-16 (calostro de perra), y TUCO-17 (leche de perra). Se empleó además la cepa *Lacticaseibacillus casei* Shirota como control.

Para los experimentos se emplearon además las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, aislado de patotipo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, y *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606.

Se evaluaron seis combinaciones de bacterias lácticas, cada una compuesta por dos cepas potencialmente probióticas: TUCO-5E + TUCO-L2, TUCO-5E + TUCO-2, TUCO-5 + TUCO-2, TUCO-3 + TUCO-16, TUCO-3 + TUCO-17, y TUCO-16 + TUCO-17.

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS INDIVIDUALES

El efecto inhibitorio fue evaluado mediante la técnica spot soft agar^(33,34), también llamada spot on lawn^(35,36), adaptada con algunas modificaciones. Las cepas de bacterias lácticas fueron sembradas en agar MRS (DE MAN, ROGOSA y SHARPE, Oxoid) y fueron incubadas a 37°C, en microaerofilia, durante 48 h. Fueron traspasadas a caldo MRS e incubadas en las mismas condiciones. Un mililitro de cada cultivo se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos para recolectar el pellet, se hicieron dos lavados con buffer y se resuspendió en buffer ajustando a la concentración equivalente de 0,5 McFarland usando un dispositivo DensiCHECK Plus. Dos microlitros de la concentración recién preparada fueron depositados como gota en la superficie del agar MRS. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos para que se absorbieran las gotas y se incubaron en microaerofilia, a 37°C, por 24 h para el desarrollo de las bacterias lácticas.

En paralelo, las cepas patógenas fueron sembradas en agar nutritivo e incubadas en aerobiosis, a 37°C, durante 24 h. Se traspasaron a caldo BHI (Oxoid) y se incubaron en aerobiosis, a 37°C, por 24 h. Se centrifugaron y el pellet fue resuspendido en buffer y ajustado a una concentración equivalente de 0.5 McFarland. Se tomó 1 ml de esta suspensión y se mezcló con 9 ml de agar BHI semisólido fundido. La mezcla se vertió sobre cada

placa de agar MRS con las cepas de bacterias lácticas desarrolladas. Las placas se incubaron en aerobiosis, a 37°C, durante 24 h. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición producidos alrededor del desarrollo de las bacterias lácticas (originado desde la gota absorbida).

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS COMBINADAS

Cada cepa de bacterias lácticas de la combinación se ajustó por separado a una concentración de 0,5 McFarland como se describió anteriormente, y se mezclaron en volúmenes iguales. Se tomaron inóculos de 2 µl de esta mezcla y se sembraron sobre agar MRS. Las placas fueron incubadas a 37°C, en microaerofilia, durante 24 h. Las cepas patógenas fueron ajustadas a una concentración de 0,5 McFarland, de donde se tomó un volumen de 1 ml y se agregó a un tubo con 9 ml de agar BHI semisólido fundido, se vertió sobre el cultivo de cepas de bacterias lácticas ya desarrolladas y se incubó en aerobiosis a 37°C, durante 24 h. Se midió el diámetro de los halos de inhibición producidos.

EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO ENTRE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

Cada cepa de bacteria láctica se ajustó a una concentración de 0,5 McFarland, una cepa fue sembrada sobre agar MRS y se incubó en microaerofilia, a 37°C, durante 24 h. Se tomó 1 ml de la otra cepa y se mezcló con 9 ml de agar MRS semisólido fundido, luego se vertió esta mezcla sobre las placas de agar MRS con la primera cepa ya desarrollada y se incubó en microaerofilia, a 37°C, durante 24 h. El mismo procedimiento se repitió con las dos cepas en roles invertidos. Se midió el diámetro de los halos de inhibición producidos.

Los halos de inhibición producidos fueron clasificados en 4 categorías: sin inhibición, halos de diámetro menor a 0,7 cm; inhibición leve para diámetros de inhibición entre 0,7 y 1,5 cm; inhibición moderada para diámetros de inhibición entre 1,6 y 2,5 cm; inhibición fuerte para diámetros de inhibición mayores a 2,5 cm.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los experimentos de inhibición de patógenos se realizaron en triplicado y los resultados se expresan como el valor de la media \pm la desviación estándar (DE)^(37,38). Se realizó una Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar diferencia entre medias de los grupos⁽³⁹⁾. Valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos⁽⁴⁰⁾. El análisis estadístico fue realizado con el programa estadístico InfoStat.

Resultados

EFFECTO INHIBITORIO DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE CEPAS PATÓGENAS

Al evaluar la actividad antimicrobiana de las 7 cepas de bacterias lácticas individuales, se observó que todas presentaron actividad inhibitoria sobre las cepas patógenas evaluadas. La formación de halos de inhibición alrededor de las colonias de bacterias lácticas en forma de gota se puede observar en la Figura 1.

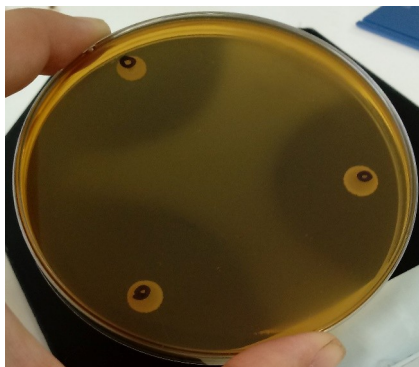


Figura 1: Ejemplo del efecto inhibitorio de la cepa TUCO-L2 sobre la cepa patógena de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) mediante técnica spot soft agar.

Los diámetros de los halos de inhibición producidos por las cepas de bacterias lácticas se muestran en la Tabla 1. Las cepas de bacterias lácticas con mayores halos de inhibición sobre *E. coli* ATCC 25922 fueron TUCO-L2, TUCO-3 y TUCO-5, con un efecto inhibitorio similar al de la cepa probiótica de referencia *L. casei* Shirota. Las cepas TUCO-L2, TUCO-16, TUCO-3 y *L. casei* Shirota

mostraron el mayor efecto inhibitorio sobre EHEC mientras que las bacterias lácticas con mayores halos de inhibición sobre *S. enterica* ATCC 13076 fueron TUCO-L2, TUCO-5E, TUCO-5, TUCO-3 y *L. casei* Shirota (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto inhibitorio de cepas de bacterias lácticas sobre cepas patógenas.

Cepas	Diámetro del halo de inhibición (cm)				
	<i>E. coli</i>	EHEC	<i>S. enterica</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>
Shirota	3,27 ± 0,33 c	3,40 ± 0,40 BCD	3,40 ± 0,22 CD	2,90 ± 0,35 BC	3,43 ± 0,15 DE
TUCO-5E	2,50 ± 0,33 AB	3,10 ± 0,28 BC	3,47 ± 0,37 CD	2,80 ± 0,18 ABC	2,87 ± 0,16 ABC
TUCO-L2	3,43 ± 0,23 c	4,00 ± 0,36 D	3,87 ± 0,16 D	3,53 ± 0,10 D	3,10 ± 0,21 BCD
TUCO-2	3,07 ± 0,27 BC	2,97 ± 0,39 AB	3,03 ± 0,15 BC	2,63 ± 0,23 AB	3,30 ± 0,17 CDE
TUCO-3	3,33 ± 0,33 c	3,43 ± 0,23 BCD	3,40 ± 0,36 CD	2,77 ± 0,27 ABC	3,60 ± 0,18 E
TUCO-5	3,33 ± 0,24 c	3,00 ± 0,13 AB	3,50 ± 0,17 CD	2,93 ± 0,21 BC	3,73 ± 0,24 E
TUCO-16	2,43 ± 0,14 AB	3,60 ± 0,52 CD	2,78 ± 0,24 AB	3,13 ± 0,21 CD	2,77 ± 0,15 AB
TUCO-17	2,28 ± 0,20 A	3,20 ± 0,40 BC	2,77 ± 0,23 AB	3,00 ± 0,18 BC	2,65 ± 0,28 AB

Shirota: probiótico de referencia *Lacticaseibacillus casei* Shirota. EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en las columnas.

Las cepas TUCO-L2 y TUCO-16 presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883. La cepa TUCO-L2 presentó halos de inhibición significativamente mayores ($p < 0,05$) que los observados para *L. casei* Shirota (Tabla 1). Por otro lado, el mayor efecto inhibitorio sobre *A. baumannii* ATCC 19606 fue producido por las cepas TUCO-5, TUCO-3, TUCO-2 y *L. casei* Shirota (Tabla 1).

EFFECTO INHIBITORIO DE COMBINACIONES DE BACTERIAS LÁCTICAS SOBRE CEPAS PATÓGENAS

Los resultados del efecto inhibitorio de las combinaciones de las cepas de bacterias lácticas sobre las cepas patógenas se muestran en la Tabla 2. El mayor efecto inhibitorio sobre *E. coli* ATCC 25922 y sobre EHEC fue producido por la combinación de las cepas TUCO-5E + TUCO-L2 (Tabla 2). El mayor efecto inhibitorio sobre *S. enterica* ATCC 13076 se observó con las combinaciones de cepas TUCO-5E + TUCO-L2 y TUCO-3 + TUCO-16 (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto inhibitorio de las combinaciones de cepas de bacterias lácticas sobre las cepas patógenas.

Combinaciones de cepas	Diámetro del halo de inhibición (cm)				
	<i>E. coli</i>	EHEC	<i>S. enterica</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>
TUCO-5E + TUCO-L2	3,85 ± 0,22 ^C	3,55 ± 0,39 ^B	3,67 ± 0,53 ^C	4,37 ± 0,25 ^B	3,95 ± 0,29 ^C
TUCO-5E + TUCO-2	3,13 ± 0,35 ^{AB}	2,83 ± 0,20 ^A	3,10 ± 0,35 ^{AB}	3,87 ± 0,35 ^A	3,23 ± 0,08 ^{AB}
TUCO-5 + TUCO-2	3,13 ± 0,47 ^{AB}	2,90 ± 0,28 ^A	2,57 ± 0,23 ^A	3,67 ± 0,27 ^A	3,40 ± 0,18 ^{BC}
TUCO-3 + TUCO-16	2,77 ± 0,23 ^A	3,13 ± 0,50 ^A	3,33 ± 0,37 ^{BC}	3,40 ± 0,54 ^A	3,03 ± 0,15 ^A
TUCO-3 + TUCO-17	3,50 ± 0,45 ^B	3,00 ± 0,38 ^A	2,93 ± 0,45 ^{AB}	3,64 ± 0,39 ^A	3,60 ± 0,25 ^C
TUCO-16 + TUCO-17	2,60 ± 0,18 ^A	2,83 ± 0,29 ^A	3,03 ± 0,50 ^{AB}	3,40 ± 0,42 ^A	3,50 ± 0,28 ^{BC}

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) en las columnas.

El mayor efecto inhibitorio sobre *K. pneumoniae* ATCC 13883 fue producido por la combinación TUCO-5E + TUCO-L2, la cual presentó un efecto sinérgico en la inhibición de esta cepa patógena, con halos de inhibición significativamente más grandes que los producidos por cada cepa de forma individual ($p < 0,05$). Las combinaciones TUCO-5E + TUCO-2, TUCO-5 + TUCO-2, y TUCO-3 + TUCO-17 también tuvieron efectos sinérgicos en la inhibición de *K. pneumoniae*, aunque no son tan eficaces como la combinación TUCO-5E + TUCO-L2 (tabla 2). El mayor efecto inhibitorio sobre la cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 se observó con las combinaciones de cepas TUCO-5E + TUCO-L2, TUCO-3 + TUCO-17, y TUCO-16 + TUCO-17 (Tabla 2). De estas combinaciones, TUCO-5E + TUCO-L2 y TUCO-16 + TUCO-17 presentaron efectos sinérgicos en la inhibición *A. baumannii*.

Cabe destacar que la combinación TUCO-5E + TUCO-L2 fue la más efectiva para inhibir el desarrollo de todos los patógenos evaluados, observándose este efecto en forma más contundente para *K. pneumoniae* y *A. baumannii*.

EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO ENTRE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS

No se observó efecto inhibitorio (halo de inhibición menor a 0,7 cm de diámetro) entre las cepas TUCO-5E y TUCO-2, ni entre las cepas TUCO-5E y TUCO-L2 (datos no mostrados). Se encontró inhibición leve (halos de inhibición entre 0,7 y 1,5 cm de diámetro) entre las cepas TUCO-2 y TUCO-5, entre las cepas TUCO-3 y TUCO-

16, y entre las cepas TUCO-3 y TUCO-17. Hubo inhibición moderada entre las cepas TUCO-16 y TUCO-17 (halos de inhibición entre 1,6 y 2,5 cm de diámetro). No se encontró inhibición fuerte (halos mayores a 2,5 cm de diámetro) entre las cepas evaluadas.

Discusión

Los beneficios para la salud proporcionados por los probióticos son diversos e incluyen su capacidad para incrementar la resistencia a patógenos⁽³⁴⁾. En este estudio, se utilizaron cepas de bacterias lácticas previamente aisladas de la leche de diferentes animales para evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de las cepas individuales, así como de combinaciones contra patógenos importantes en medicina humana y veterinaria. Se evaluó el efecto antimicrobiano de las cepas de bacterias lácticas sobre patógenos gastrointestinales y extraintestinales incluidos en la lista de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de bacterias prioritarias por su alta resistencia a los antibióticos. Dicha lista incluye patógenos prioritarios en los que se recomienda centrar la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas antimicrobianas⁽⁴¹⁾.

Las cepas de bacterias lácticas analizadas tuvieron distintos grados de inhibición frente a los patógenos evaluados: EHEC, *S. enterica*, *K. pneumoniae*, y *A. baumannii*. La inhibición del desarrollo de los patógenos en la prueba *spot soft agar* indica que las cepas de bacterias lácticas evaluadas producen compuestos activos que difunden al medio de cultivo y tienen actividad antimicrobiana⁽⁴²⁾. Se ha descrito que entre los compuestos con actividad antimicrobiana producidos por las bacterias lácticas se encuentran los ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, óxido nítrico y bacteriocinas^(1,4,12). La naturaleza de los antimicrobianos producidos por las bacterias de esta investigación todavía no ha sido dilucidada. Además, fue posible encontrar combinaciones de cepas de bacterias lácticas con efecto sinérgico para la inhibición *in vitro* de diferentes cepas patógenas. Dado que existen pocos estudios publicados que comparan los efectos de las combinaciones de cepas de bacterias lácticas potencialmente probióticas con los efectos de las mismas cepas individualmente, nuestro trabajo hace un aporte original en este sentido. Se ha reportado que algunas combinaciones de probióticos tienen mejor adherencia a la mucosa intestinal que sus cepas

individualmente⁽³⁰⁾, o mayor inhibición de la adherencia de patógenos a mucosa intestinal humana⁽³¹⁾ o porcina⁽³²⁾. Los resultados presentados acá demuestran además, que combinaciones apropiadas de cepas de bacterias lácticas pueden también potenciar el efecto inhibitorio contra patógenos.

Todas las combinaciones de bacterias lácticas tuvieron una interacción aditiva entre sus cepas constituyentes con respecto a la inhibición de patógenos entéricos. Notablemente, se observó que cinco de las combinaciones evaluadas tuvieron efectos sinérgicos en la inhibición de patógenos extraintestinales: a) se observó efecto sinérgico entre las cepas TUCO-5E + TUCO-L2 para la inhibición de *K. pneumoniae* y *A. baumannii*, b) efecto sinérgico para TUCO-5E + TUCO-2, TUCO-5 + TUCO-2, y TUCO-3 + TUCO-17 sobre *K. pneumoniae* y, c) efecto sinérgico para TUCO-16 + TUCO-17 sobre *A. baumannii*. Los resultados muestran que la potenciación del efecto inhibitorio entre cepas combinadas varía según el patógeno contrastado y, por lo tanto, los productos probióticos deben diseñarse considerando cada patógeno en particular. Nuestros resultados están en línea con trabajos previos. Chapman *et al.*⁽³⁷⁾ evaluaron el efecto inhibitorio sobre patógenos bacterianos de combinaciones de 4 a 15 cepas de bacterias lácticas empleando el método *spot soft agar*. Sus resultados mostraron que solo algunas combinaciones de bacterias lácticas tuvieron mejores resultados que las cepas individuales, y el efecto inhibitorio fue específico para cada patógeno. En otro estudio, no se encontraron diferencias significativas entre las combinaciones y las cepas individuales para la inhibición de patógenos⁽⁴³⁾.

E. coli enterohemorrágica (EHEC) es un patógeno de transmisión alimentaria que puede causar diarrea severa en el hospedador y complicaciones extraintestinales potencialmente letales, como falla renal aguda y anormalidades en el sistema nervioso central^(44,45). Es una infección zoonótica, cuyo principal reservorio son los animales rumiantes, los que suelen ser portadores asintomáticos⁽⁴⁵⁾. En el tratamiento, generalmente se evita el uso de antibióticos, ya que puede inducir la liberación de toxinas por el patógeno, en este caso, los probióticos representan una potencial opción terapéutica, aunque se requieren estudios adicionales⁽⁴⁴⁾.

S. enterica no tifoidea es una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo⁽⁴⁶⁾.

Distintos serotipos pueden causar infección en el ser humano, entre ellos, *S. enterica* serovar Enteritidis tiene la mayor incidencia y puede infectar tanto a personas como a animales⁽⁴⁷⁾. Su principal fuente de transmisión son las aves y el consumo de sus productos mal cocinados, la enfermedad en el ser humano se manifiesta generalmente como una gastroenteritis autolimitante^(46,47). Aunque no es común, se han encontrado cepas de *S. enterica* con resistencia a distintos antimicrobianos^(46,47).

Entre las cepas de bacterias ácido lácticas utilizadas en este estudio, las cepas *L. brevis* TUCO-5E⁽²⁰⁾ y *L. salivarius* TUCO-L2⁽²³⁾ han demostrado proteger contra la infección de *S. enterica* Typhimurium en un modelo murino, además, ensayos *in vitro* muestran que TUCO-5E tiene la capacidad de excluir y desplazar patógenos como *E. coli* y *Salmonella* del epitelio intestinal⁽²⁰⁾, y TUCO-L2 tiene actividad inmunomoduladora⁽²³⁾. La combinación TUCO-5E + TUCO-L2 fue la más efectiva para inhibir el desarrollo de todos los patógenos evaluados, además, presentó sinergia en la inhibición de *K. pneumoniae* ATCC 13883, y *A. baumannii* ATCC 19606. Por otro lado, las cepas TUCO-5E y TUCO-L2 no presentaron inhibición entre ellas. Esto hace que la combinación TUCO-5E + TUCO-L2 sea un excelente candidato probiótico multicepa para ser evaluado *in vivo* en la protección contra la infección de los distintos patógenos evaluados en este estudio.

K. pneumoniae y *A. baumannii* son importantes patógenos nosocomiales que pueden causar diversas infecciones oportunistas, tanto en humanos como en animales, por ejemplo, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, infecciones de tejidos blandos, septicemia y meningitis⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾. Ambas especies han desarrollado cepas multirresistentes a los antibióticos que se propagan rápidamente, esto sumado a su capacidad de formar biopelículas, hace que sean patógenos difíciles de controlar y que representen una seria amenaza para la salud pública⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾. Por esto, la OMS los clasifica entre las especies bacterianas patógenas con mayor prioridad en la resistencia a los antibióticos⁽⁴¹⁾. Las combinaciones TUCO-5E + TUCO-2, TUCO-5 + TUCO-2, y TUCO-3 + TUCO-17, presentaron un efecto sinérgico en la inhibición de *K. pneumoniae* ATCC 13883; mientras que la combinación TUCO-16 + TUCO-17 presentó un efecto sinérgico en la inhibición de *A. baumannii* ATCC 19606. Esto hace que las cuatro combinaciones sean interesantes candidatos probióticos multicepa

para ser evaluado *in vivo* en la protección contra infecciones respiratorias y urinarias causadas por patógenos multirresistentes.

Existen varios métodos *in vitro* para evaluar el efecto inhibitorio sobre patógenos de las cepas probióticas⁽⁵²⁾. Cada técnica puede dar resultados diferentes, por ejemplo, la cepa con mayor eficacia inhibitoria puede variar según el método utilizado^(34,53). Se ha descrito, además, diferencias en la misma técnica, por ejemplo, con la prueba spot soft agar, diferentes investigadores utilizan distintos medios de cultivo, volúmenes, concentraciones de células probióticas y patógenas, e incluso distinto modo de medir la zona de inhibición (diámetro, radio o zona de inhibición de la cepa probiótica). Por ello, sería de gran importancia confirmar el efecto sinérgico de las combinaciones, realizando variaciones en concentraciones de células, medios de cultivos, así como mediante el empleo de otras técnicas. Por otro lado, es necesario considerar que las evaluaciones *in vitro* no repliquen por completo las condiciones reales *in situ* de las superficies mucosas como las del tracto intestinal o respiratorio. Sin embargo, estas técnicas son herramientas útiles para la selección rápida de cepas con potencial probiótico, ya que permiten una enorme simplificación del sistema en estudio ayudando a evaluar un gran número de cepas en busca de una propiedad probiótica específica. Esto permite seleccionar las cepas o combinaciones más efectivas para continuar las investigaciones *in vivo*, que consumen más tiempo y recursos económicos⁽³⁸⁾.

Conclusión

Se encontraron cinco combinaciones con un efecto sinérgico para la inhibición del desarrollo de las cepas patógenas. El efecto sinérgico fue específico para la cepa patógena y se presentó principalmente sobre patógenos del tracto respiratorio y urinario. Las combinaciones que mostraron sinergia son buenas candidatas para el desarrollo de productos probióticos multicepa para la prevención y el tratamiento de infecciones bacterianas específicas. Sin embargo, se necesitan más estudios en aspectos tecnológicos y de formulación y estudios *in vivo* para demostrar su eficacia y seguridad en los hospedadores en los que se pretenda su uso.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por el proyecto FONDEF ID20I10114.

Bibliografía

1. Ouwehand AC, Forssten S, Hibberd AA, Lyra A, Stahl B. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. *Annals of Medicine*. 2016; 48(4):246–255. Doi:10.3109/07853890.2016.1161232
2. Ghosh C, Sarkar P, Issa R, Haldar J. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends Microbiol*. 2019; 27(4):323 – 327. Doi:10.1016/j.tim.2018.12.010
3. Food and Agriculture Organization & World Health Organization (FAO / WHO). Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutritional Paper 85 [Internet] 2006 [Consultado 15 Ago 2022] Disponible en: <http://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11:506-514. Doi:10.1038/nrgastro.2014.66
5. Reid G, Gadir AA, Dhir R. Probiotics: reiterating what they are and what they are not. *Front Microbiol*. 2019; 10:424. Doi:10.3389/fmicb.2019.00424
6. Binda S, Hill C, Johansen E, Obis D, Pot B, Sanders ME, et al. Criteria to qualify microorganisms as “Probiotic” in foods and dietary supplements. *Front Microbiol*. 2020; 11. Doi:10.3389/fmicb.2020.01662
7. Forssten SD, Laitila A, Maukonen J, Ouwehand AC. Probiotic triangle of success; strain production, clinical studies and product development. *FEMS Microbiol Lett*. 2020; 367(19). Doi:10.1093/femsle/fnaa167
8. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *B J Nutr*. 2013; 109(S2): S35–S50. Doi:10.1017/S0007114512004011
9. Jagan MC, Rudinsky AJ, Parker VJ, Gilor C. Use of probiotics in small animal veterinary medicine. *J Am Vet Med*. 2017; 250(5): 519–528. Doi:10.2460/javma.250.5.519
10. King S, Tancredi D, Lenoir-Wijnkoop I, Gould K, Vann H, Connors G, et al. Does probiotic consumption reduce antibiotic utilization for common acute infections? A systematic review and meta-analysis. *Eur J Public Health*. 2019; 29(3): 494-499. Doi:10.1093/eurpub/cky185

11. Markowiak P, Slizewska K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*. 2017; 9(9). Doi:10.3390/nu9091021
12. Mathipa MG, Thantsha MS. Probiotic engineering: towards development of robust probiotic strains with enhanced functional properties and for targeted control of enteric pathogens. *Gut pathog*. 2017; 9: 28. Doi:10.1186/s13099-017-0178-9
13. McFarland LV, Huang Y, Wang L, Malfertheiner P. Systematic review and meta-analysis: multi-strain probiotics as adjunct therapy for *Helicobacter pylori* eradication and prevention of adverse events. *United Eur Gastroenterol J*. 2016; 4(4): 546–561. Doi:10.1177/2050640615617358
14. Sornplang P, Piyadeatsoontorn S. Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *J Anim Sci Technol*. 2016; 58(1). Doi:10.1186/s40781-016-0108-2
15. Zielińska D, Kolożyn-Krajewska D. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties: review. *BioMed Res Int*. 2018. Doi:10.1155/2018/5063185
16. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, et al. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*. 2013; 69(1): 1–10. Doi:10.1016/j.phrs.2012.09.001
17. Makete G, Aiyegoro OA, Thantsha MS. Isolation, identification and screening of potential probiotic bacteria in milk from South African Saanen goats. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2016; 9(3): 246–254. Doi:10.1007/s12602-016-9247-5
18. Reuben RC, Roy PC, Sarkar SL, Rubayet Ul Alam A, Jahid IK. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J dairy sci*. 2020; 103(2): 1223–1237. Doi: 10.3168/jds.2019-17092
19. Martín R, Delgado S, Maldonado A, Jiménez E, Olivares M, Fernández L, et al. Isolation of lactobacilli from sow milk and evaluation of their probiotic potential. *J Dairy Res*. 2009; 76: 418–425. Doi:10.1017/S0022029909990124
20. Quilodrán-Vega SR, Villena J, Valdebenito J, Salas MJ, Parra C, Ruiz A, et al. Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Can J Microbiol*. 2016; 62(6): 514–524. Doi:10.1139/cjm-2015-0811

21. Martín R, Olivares M, Pérez M, Xaus J, Torre C, Fernández L, et al. Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk. *Vet J.* 2010; 185(2): 193–198. Doi:10.1016/j.tvjl.2009.04.014
22. Fernandez L, Martínez R, Cruz M, Arroyo R, Rodríguez JM. Characterization of *Lactobacillus rhamnosus* MP01 and *Lactobacillus plantarum* MP02 and assessment of their potential for the prevention of gastrointestinal infections in an experimental canine model. *Front Microbiol.* 2019; 10. Doi:10.3389/fmicb.2019.01117
23. Quilodrán-Vega S, Albarracín L, Mansilla M, Arce L, Zhou B, Islam MA, et al. Functional and genomic characterization of *Ligilactobacillus salivarius* TUCO-L2 isolated from *Lama glama* milk: a promising immunobiotic strain to combat infections. *Front Microbiol.* 2020; 11: 608752. Doi:10.3389/fmicb.2020.608752
24. Forssten SD, Ouwehand AC. Simulating colonic survival of probiotics in single-strain products compared to multi-strain products. *Microb Ecol Health Dis.* 2017; 28(1). Doi:10.1080/16512235.2017.1378061
25. Ouwehand AC, Invernici MM, Furlaneto FA, Messori MR. Effectiveness of multi-strain versus single-strain probiotics: current status and recommendations for the future. *J Clin Gastroenterol.* 2018; 52(S1): S35 – S40. doi:10.1097/mcg.0000000000001052
26. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96(3): 219 - 233. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.012
27. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. Health benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains? *Eur J Nutr.* 2011; 50(1): 1–17. Doi:10.1007/s00394-010-0166-z
28. Gómez-Gallego C, Junnila J, Männikkö S, Hämeenoja P, Valtonen E, Salminen S, et al. A canine-specific probiotic product in treating acute or intermittent diarrhea in dogs: a double-blind placebo-controlled efficacy study. *Vet Microbiol.* 2016; 197: 122–128. Doi:10.1016/j.vetmic.2016.11.015
29. McFarland LV, Ship N, Auclair J, Millette M. Primary prevention of *Clostridium difficile* infections with a specific probiotic combining *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, and *L. rhamnosus* strains: assessing the evidence. *J Hosp Infect.* 2018; 99(4): 443 – 452. Doi:10.1016/j.jhin.2018.04.017

30. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus?, *J Dairy Sci.* 2007; 90(6): 2710–2716. Doi:10.3168/jds.2006-456
31. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res Int.* 2007; 40(5): 629 – 636. Doi:10.1016/j.foodres.2006.11.007
32. Collado MC, Grześkowiak Ł, Salminen S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol.* 2007; 55(3): 260 – 265. Doi:10.1007/s00284-007-0144-8
33. Scalfaro C, Iacobino A, Nardis C, Franciosa G. *Galleria mellonella* as an in vivo model for assessing the protective activity of probiotics against gastrointestinal bacterial pathogens. *FEMS Microbiol Lett.* 2017; 364(7): 1 – 6. Doi:10.1093/femsle/fnx064, 46 - 42
34. Fijan S, Šulc D, Steyer A. Study of the in vitro antagonistic activity of various single-strain and multi-strain probiotics against *Escherichia coli*. *Int J Environ Res Public Health.* 2018; 15(7). doi:10.3390/ijerph15071539
35. Altarugio R, Vellano IH, Moraes AC, Milbradt EL, Andreatti-Filho RL, Guimarães-Okamoto PT, et al. In vitro probiotic selection and characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from healthy domesticated Turkeys. *J Appl Poult Res.* 2017; 27(1): 81–91. doi:10.3382/japr/pfx045
36. Jimenez-Trigos E, Toquet M, Barba M, Gómez-Martín Á, Quereda JJ, Bataller E. Search of antimicrobial lactic acid bacteria from *Salmonella*-negative dogs. *BMC Vet Res.* 2022;18(1): 1 – 12. doi:10.1186/s12917-021-03070-x
37. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe.* 2012; 18(4): 405 – 413. Doi:10.1016/j.anaerobe.2012.05.004
38. Shokryazdan P, Sieo CC, Kalavathy R, Liang JB, Alitheen NB, Faseleh Jahromi M, et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Res Int.* 2014; 927268. doi: 10.1155/2014/927268
39. Armstrong RA, Hilton AC. *Statistical analysis in microbiology: Statnotes.* USA: Wiley-Blackwell; 2011.

40. Lorowitz W, Saxton E, Sondossi M, Nakaoka K. Integrating statistics with a microbiology laboratory activity. *Microbiology education*. 2005; 6: 14–19.
41. World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva, Switzerland [Internet] 2017 [Consultado 20 Mar 2020] Disponible en: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
42. Tejero-Sariñena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 2012; 18(5): 530-538. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.08.004
43. Chapman CM, Gibson GR, Todd S, Rowland I. Comparative in vitro inhibition of urinary tract pathogens by single- and multi-strain probiotics. *Eur J Nutr*. 2013; 52(6): 1669–1677. Doi:10.1007/s00394-013-0501-2
44. Hwang SB, Chelliah R, Kang JE, Rubab M, Banan-MwineDaliri E, Elahi F, Oh DH. Role of recent therapeutic applications and the infection strategies of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 614963. Doi:10.3389/fcimb.2021.614963
45. Kim J-S, Lee M-S, Kim JH. Recent Updates on outbreaks of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and its potential reservoirs. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10:273. doi: 10.3389/fcimb.2020.00273, 56
46. Fernández J, Guerra B, Rodicio MR. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. *Vet Sci*. 2018; 5(2): 40. doi:10.3390/vetsci5020040
47. Retamal P, Fresno M, Dougnac C, Gutierrez S, Gornall V, Vidal R, et al. Genetic and phenotypic evidence of the *Salmonella enterica* serotype Enteritidis human-animal interface in Chile. *Front Microbiol*. 2015; 6:464. doi: 10.3389/fmicb.2015.00464
48. Yang F, Deng B, Liao W, Wang P, Chen P, Wei J. High rate of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from human and animal origin. *Infect Drug Resist*. 2019; 12:2729-2737. doi: 10.2147/IDR.S219155.
49. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(17):6278. doi:10.3390/ijerph17176278

50. Asif M, Alvi IA, Rehman SU. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infect Drug Resist.* 2018; 11: 1249–1260. Doi: 10.2147/IDR.S166750
51. Van der Kolk JH, Endimiani A, Graubner C, Gerber V, Perreten V. *Acinetobacter* in Veterinary Medicine with emphasis on *A. baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;16: 59 – 71.
52. Fijan S. Antimicrobial effect of probiotics against common pathogens. En: Rao V, Rao LG, editors. *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health.* IntechOpen. 2016. p.191-211. Doi:10.5772/63141
53. Halder D, Mandal M, Chatterjee SS, Pal, NK, Mandal S. Indigenous probiotic *Lactobacillus* isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. *Biomedicines.* 2017; 5(2). doi: 10.3390/biomedicines5020031