

## Artículo original

# Formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae* aislada en heces de pacientes con Trastorno del Espectro Autista

Xiomara Moreno Calderón<sup>a,\*</sup>, Andrea Armas<sup>b</sup>, María Mercedes Panizo<sup>c</sup>, María Fátima Garcés<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología, Instituto Médico La Floresta. <sup>b</sup>Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. <sup>c</sup>Sociedad Venezolana de Microbiología. <sup>d</sup>Laboratorio de Investigaciones Básicas y Aplicadas. Facultad de Medicina. Escuela de Bioanálisis. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Recibido 15 de junio de 2020; aceptado 22 de julio de 2020

**Resumen:** Este estudio se enfocó en determinar la capacidad de formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae* aislada en heces de pacientes con Trastorno del Espectro Autista (TEA). Se evaluaron 38 pacientes entre 1-18 años de edad. Se recolectaron datos epidemiológicos, disbiosis previa e inicial y tratamiento (antimicrobianos, probióticos y dieta). El estudio de disbiosis se realizó mediante cultivo. Para evaluar la formación de biopelículas se utilizó el método cuantitativo en microplaca de poliestireno con tinción de cristal violeta y cualitativo en agar infusión cerebro-corazón más rojo Congo. Las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos se realizaron por Kirby-Baier utilizando aztreonam, cefepime, ceftazidime, cefuroxime, trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina/ácido clavulánico y ciprofloxacina. No hubo relación entre disbiosis y formación de biopelículas. El método cuantitativo detectó 25 (66%) cepas formadoras de biopelículas y el método cualitativo detectó 17 (45%) cepas con presencia de exopolisacáridos. No hubo concordancia entre los dos métodos utilizados para evaluar las biopelículas. El tratamiento no tuvo efecto contra las biopelículas asociadas a disbiosis y la formación de biopelículas fue independiente de la susceptibilidad a los antimicrobianos. Para tratar de establecer la posible relación entre la formación de biopelículas y el tratamiento se recomienda continuar este estudio aumentando el número de pacientes con disbiosis persistente por *K. pneumoniae*.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*; disbiosis; biopelículas; trastorno del espectro autista.

## Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from stools of patients with the Autism Spectrum Disorder

**Abstract:** The study was focused on determining the biofilm formation capacity of *Klebsiella pneumoniae* isolated from stools from patients with the Autism Spectrum Disorder (ASD). Thirty-eight patients between 1 to 18 years of age were included. Epidemiological data, previous and initial dysbiosis and treatment (antimicrobials, probiotics and diet) were registered. The dysbiosis study was carried out by fecal culture. To evaluate biofilm formation, the quantitative method was used in a polystyrene microplate with crystal violet staining and a qualitative method in brain-heart infusion agar plus Congo red. Antimicrobial susceptibility testing was performed by Kirby-Bauer method including aztreonam, cefepime, ceftazidime, cefuroxime, trimethoprim/sulfamethoxazole, amoxicillin/clavulanic acid, and ciprofloxacin. There was no relationship between dysbiosis and biofilm formation. The quantitative method detected 25 (66%) biofilm-forming strains and the qualitative method detected 17 (45%) strains with the presence of exopolysaccharides. There was no concordance between the two methods used to assess biofilm formation. Treatment had no effect against biofilms associated with dysbiosis, and biofilm formation was independent of antimicrobial susceptibility. To establish the possible relationship between biofilm formation and treatment, it is recommended to follow the study including a larger number of patients with persistent *K. pneumoniae* dysbiosis.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*; dysbiosis; biofilms; autism spectrum disorder.

\* Correspondencia:  
E-mail: x.morenoc@hotmail.com

### Introducción

Recientes evidencias reconocen que la composición de la microbiota intestinal (MI) es capaz de influir en la fisiología

normal del ser humano. Estudios describen como la MI se relaciona con el sistema nervioso central, por lo que influye en la función cerebral cambiando los comportamientos. Entre las funciones importantes de la MI se conoce que

controla y regula los trastornos relacionados con el estrés, trastornos mentales, depresión, ansiedad, estado de ánimo, cognición y trastornos del desarrollo neurológico, como el autismo y el dolor [1].

La alteración de la MI podría influir en los síntomas, el desarrollo y las comorbilidades de los pacientes con Trastornos del Espectro Autista (TEA) teniendo como punto de partida el intestino y actuando sobre el eje cerebral [2]. Los síntomas gastrointestinales y la barrera intestinal alterada son más comunes en personas autistas, encontrándose mayor prevalencia en niños con TEA en comparación con grupos de niños controles [3], con una fuerte correlación positiva entre los problemas intestinales y la gravedad del TEA [4]. Opciones de tratamiento con antibióticos (rifaximina, vancomicina, metronidazol, entre otros), dietas elementales, fármacos procinéticos que potencian la motilidad y contractilidad del tracto gastrointestinal, antagonistas de serotonina, inhibidores de la acetilcolinesterasa, inhibidores de fosfodiesterasa y antagonistas de la dopamina han sido probados de manera efectiva y segura en el tratamiento de la disbiosis en niños con TEA, pero todavía se necesitan estudios más contundentes con un número mayor de individuos [1].

La alteración de la MI es denominada disbiosis, y su persistencia ha sido asociada con la formación de biopelículas. Las biopelículas son una comunidad de microorganismos con propiedades adherentes encerrados en una matriz de sustancia polimérica extracelular, separada por una red de canales de aguas abiertas. Su arquitectura es un entorno óptimo para las interacciones intermicroorganismos, que permite la difusión de nutrientes necesarios para el mantenimiento de las mismas. La matriz en la que están incrustados los microorganismos protege a las biopelículas de la exposición a los rayos ultravioleta, toxicidad por metales, exposición a ácidos, salinidad por deshidratación, fagocitosis y la acción de los antimicrobianos, ya que los microorganismos muestran una gran resistencia a los fármacos quimioterapéuticos y sobre todo a los antimicrobianos. Por lo antes mencionado la presencia de biopelículas es difícil de diagnosticar y tratar con fármacos convencionales [1].

Entre las estrategias para el control de biopelículas que se están investigando se encuentran el uso de probióticos, prebióticos, complejos con cationes en la matriz extracelular, combinados con antibióticos, compuestos quelantes de hierro (lactoferrina y sal sódica del ácido etilendiaminotetracético) y enzimas que degradan la fibrina, entre otros [5].

La restauración de la simbiosis en la MI podría ofrecer mejoras para los síntomas gastrointestinales que se observan en el TEA [1], por lo que este trabajo de investigación, con base en lo planteado anteriormente, buscó evaluar la capacidad de formación de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* aislada en heces de pacientes con TEA y su relación con la susceptibilidad a los antimicrobianos, probióticos y dietas más comúnmente utilizados para su tratamiento.

## Materiales y métodos

El presente estudio fue de tipo descriptivo, de corte transversal y prospectivo con un muestreo de tipo intencional y no probabilístico. Se evaluaron 38 pacientes con TEA, a los cuales se les solicitó una muestra de heces a cada uno y la siguiente información, que fue recopilada mediante un cuestionario: edad, género, condición neurológica, tratamiento con antibióticos, probióticos y antifúngicos, si el paciente estuvo haciendo dieta especial, y si se le realizaron estudios previos de disbiosis. Las muestras fueron recibidas y procesadas durante el período de tiempo comprendido entre el 01 de junio hasta el 30 de noviembre del 2019 en el laboratorio de Microbiología del Instituto Médico La Floresta, Caracas, Venezuela, aislándose *Klebsiella pneumoniae* como agente causal de disbiosis en todas ellas.

Tanto la información solicitada en el cuestionario como las muestras de heces se obtuvieron mediante el consentimiento de los padres de los pacientes, previa información suministrada sobre las características de la investigación. El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Maternidad Concepción Palacios.

*Preparación y viabilidad de los aislamientos:* Las 38 cepas de *K. pneumoniae* en estudio estuvieron preservadas en agar BHI (Infusión cerebro-corazón, Oxoid®, USA) con glicerol al 10% a temperatura ambiente, hasta el momento de la investigación. Iniciado el estudio se cultivaron en caldo BHI y se incubaron a 35 °C por 24 h. Posteriormente cada aislamiento se subcultivó en agar MacConkey (Oxoid®) incubándose a 35 °C de 24-48 horas para verificar su pureza y viabilidad.

*Determinación de la capacidad de formación de biopelículas en placa de microtitulación de poliestireno mediante tinción con cristal violeta (CV):*

- *Preparación del inóculo para el análisis de biopelículas:* De los aislados obtenidos, previa verificación de viabilidad y pureza en agar MacConkey, se preparó una suspensión en solución salina estéril (SSE) al 0,85% a una concentración de 0,5 McFarland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL). De dicha suspensión se tomaron 200 µL y se añadieron 19,8 mL de caldo BHI, obteniéndose una dilución 1:100.

- *Método cuantitativo en microplacas de poliestireno:* Se siguió el protocolo descrito en un trabajo previo realizado por Moreno *et al.* [6] con modificaciones, para ensayar bacilos gramnegativos y con lectura de la Densidad Óptica (DO) a 575 nm en un lector de ELISA (iMark™ Microplate Reader). Para la interpretación de los resultados, se utilizó la clasificación establecida por Stepanovic *et al.* [7], adaptándola a microorganismos gramnegativos para la formación de biopelículas en comparación con la DO del control (DOc): no formadoras ( $DO \leq DOc$ ), poco formadoras ( $DOc < DO < 2DOc$ ), moderadamente formadoras ( $2DOc < DO < 4DOc$ ) y fuertemente formadoras ( $4DOc < DO$ ). El DOc se define como el promedio de diez valores del control negativo (como control negativo se utilizó caldo BHI).

-Evaluación de los cambios de la pared celular implicados en la formación de la matriz de exopolisacáridos frente al compuesto químico rojo Congo (Método cualitativo): Se preparó una suspensión de cada cepa proveniente de 24 h de incubación en agar MacConkey en SSE al 0,85%, ajustada a un patrón de turbidez de 0,5 McFarland. De esta suspensión se tomaron 100  $\mu$ L y se inocularon en placas de agar BHI más indicador rojo Congo al 3%. Este inóculo se estirió por agotamiento para cada cepa y se incubó a 35 °C por 24-48 h. La interpretación de la prueba se basó en el análisis visual del color negro brillante de las colonias que crecen en el agar, debido a que los exopolisacáridos se combinan específicamente con el colorante rojo según los criterios establecidos por Kaiser *et al.* [8].

*Estudio de la susceptibilidad a los antimicrobianos:* Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron mediante el método de Kirby-Baüer siguiendo la metodología establecida por el documento M100Ed30E del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI por sus siglas en inglés) [9]. Se tomó una colonia de cada cepa con un hisopo de algodón y se preparó una suspensión en SSE al 0,85% ajustándola al patrón 0,5 McFarland, correspondiente a  $1-5 \times 10^6$  UFC/mL. Una vez preparada la suspensión bacteriana, se inoculó en tres direcciones sobre placas de agar Müller-Hinton, dejándolas reposar por 15 min. Posteriormente, se colocaron los discos de los antimicrobianos a ensayar (aztreonam (30  $\mu$ g), cefotaxime (30  $\mu$ g), ceftazidime (30  $\mu$ g), cefuroxime (30  $\mu$ g), amoxicilina/ácido clavulánico (30  $\mu$ g), trimetoprim/sulfametoxazol (25  $\mu$ g) y ciprofloxacina (25  $\mu$ g) a razón de cinco discos por placa, incluyendo la prueba de detección fenotípica de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Las placas se dejaron reposar a temperatura ambiente por 15 min y posteriormente se incubaron a 35 °C por 24 h, para su posterior lectura e interpretación.

Los criterios de interpretación de las pruebas de susceptibilidad estuvieron regidos por los puntos de corte clínicos en milímetros establecidos por el documento M100Ed30E de acuerdo a las siguientes categorías: susceptible (S), intermedio (I) y resistente (R) [9].

Para el control de calidad de los medios de cultivo, la identificación y las pruebas de susceptibilidad se utilizaron las cepas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC®): *Escherichia coli* (ATCC 25992 b-lactamasa negativa), *Escherichia coli* (ATCC 35218 TEM1), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 70060 con mecanismos de resistencia más formación de biopelícula) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 control del agar Müller-Hinton).

*Análisis estadístico:* Los datos obtenidos fueron descritos en valores absolutos y porcentajes. Para evaluar la concordancia del método cualitativo con rojo Congo respecto al método cuantitativo en microplaca con tinción de CV (considerada la prueba de referencia) [10], se utilizaron

tablas de contingencia de 2 x 2. Para determinar la relación entre la capacidad de formación de biopelículas, perfil de susceptibilidad y el tratamiento se utilizó la prueba de Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) con corrección de Yates (de ser necesaria), con un nivel de significancia de 95% y un valor de  $p \leq 0,05$ . Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico Statgraphics Centurion XVII.

## Resultados

Los datos demográficos de los 38 pacientes fueron los siguientes: 12 (32%) del género femenino, con edades comprendidas entre 1 y 13 años (Media: 7 años) y 26 (68%) del género masculino, con edades comprendidas entre los 1 y 18 años (Media: 12 años).

La capacidad de formación de biopelículas por el método cuantitativo de microtitulación en placa con tinción de CV, de los 38 aislados de *K. pneumoniae* en heces, de acuerdo a su clasificación en formadores o no de biopelículas, se presenta en la figura 1, donde 25 (66%) cepas formaron biopelículas y 13 (34%) no formaron biopelículas.

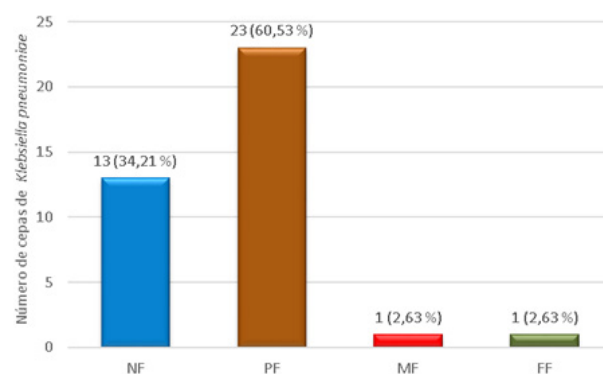


Figura 1. Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas por *Klebsiella pneumoniae* mediante el método cuantitativo de microtitulación en placa con tinción de cristal violeta (n=38). NF: no formadora; PF: poco formadora; MF: moderadamente formadora; FF: fuertemente formadora.

En cuanto a la evaluación de los cambios de la pared celular implicados en la formación de la matriz de exopolisacáridos mediante el método cualitativo de agar BHI más rojo Congo, se evidenció que 17 de 38 (45%) cepas fueron positivas, al observarse un precipitado continuo de color negro en el crecimiento de la misma. Las 21 (55%) cepas restantes fueron negativas para la prueba (Figura 2).

Según la información obtenida del cuestionario aplicado en este estudio, 29% (11 de 38) de los pacientes presentaron disbiosis por *K. pneumoniae* en estudios previos y en 9 de estos 11 la disbiosis por este microorganismo fue persistente. Los estudios previos también mostraron que en 6 de los 9 aislados de los pacientes con disbiosis por *K. pneumoniae* persistente se observó formación de biopelículas por el método cuantitativo, mientras que las 3 cepas restantes solo se observó formación de exopolisacáridos. En las dos muestras restantes de los 11 pacientes, los estudios previos mostraron que la disbiosis fue producida por el complejo *Enterobacter cloacae*, los cuales formaron biopelículas

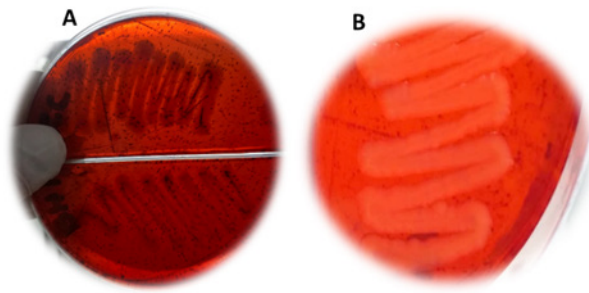


Figura 2. A. Presencia de exopolisacáridos mediante la prueba cualitativa de agar BHI más rojo Congo, donde se observa un precipitado negro continuo a través de todo el crecimiento bacteriano. B. Ausencia de exopolisacáridos mediante la prueba cualitativa de agar BHI más rojo Congo sin precipitado negro en el área de crecimiento bacteriano.

en la clasificación poco formadora, sin formación de exopolisacáridos por el método cualitativo.

Al relacionar los cambios en la pared celular implicados en la producción de la matriz de exopolisacáridos mediante el método cualitativo, versus la capacidad de la formación de biopelículas por el método cuantitativo, 16 cepas fueron no concordantes por ambos métodos, 13 cepas fueron concordantes positivas entre los dos métodos, independientemente de la clasificación obtenida por el método cuantitativo, y 9 cepas fueron negativas por ambos métodos.

El método cualitativo no discrimina adecuadamente entre las diferentes capacidades de formación de biopelículas como lo hace el método cuantitativo. Por lo tanto, los resultados obtenidos por cada método no son comparables entre sí, con un 95% de confianza, ya que no existe entre ellos asociación estadísticamente significativa ( $p=0,1798$ ).

En cuanto a la interpretación de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, los resultados se muestran en la tabla 1. A las 38 cepas de *K. pneumoniae* analizadas se les probó ampicilina (10  $\mu\text{g}$ ) como antibiótico con resistencia intrínseca en apoyo a la identificación de la especie. Cuatro (11%) cepas fueron productoras de

Tabla 1. Susceptibilidad a los antimicrobianos de las 38 cepas de *K. pneumoniae* determinada por el método de Kirby-Bauer.

Antibióticos	Sensible		Intermedio		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Aztreonam (30 $\mu\text{g}$ )	34	89	-	-	4	11
Cefuroxime (30 $\mu\text{g}$ )	34	89	-	-	4	11
Cefotaxime (30 $\mu\text{g}$ )	34	89	-	-	4	11
Ceftazidime (30 $\mu\text{g}$ )	34	89	-	-	4	11
Trimetoprim/ Sulfametoxazol (25 $\mu\text{g}$ )	35	92	-	-	3	8
Amoxicilina/Ácido Clavulánico (30 $\mu\text{g}$ )	31	82	4	10	3	8
Ciprofloxacina (5 $\mu\text{g}$ )	27	71	8	21	3	8

BLEE. No se encontró significancia estadística ( $p=0,2701$ ) al asociar los resultados de susceptibilidad y resistencia observados, para los diferentes antimicrobianos evaluados, respecto a la formación o no de biopelículas.

De los 38 pacientes evaluados, 24 cumplieron los diferentes tratamientos prescritos (dieta, probióticos y antibióticos), mientras que a 14 pacientes no les fue indicado tratamiento, ya que el estudio de disbiosis fue solicitado por primera vez (Figura 3). Al evaluar la relación entre el tratamiento para la disbiosis con respecto a la formación o no de biopelículas por parte de *K. pneumoniae* no se encontraron diferencias significativas ( $p=0,1107$ ).

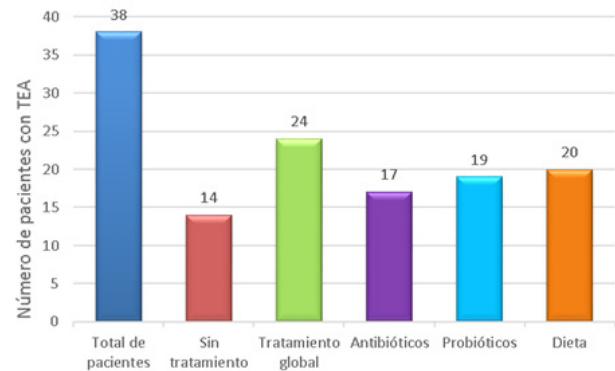


Figura 3. Número de pacientes con TEA involucrados en el tratamiento administrado para normalizar la disbiosis causada por *K. pneumoniae*.

## Discusión

De acuerdo a los criterios de la Asociación Americana de Psiquiatría, los TEA se caracterizan principalmente por déficit en la comunicación social y patrones restringidos y repetitivos en el comportamiento; sin embargo, estas conductas difieren notablemente en cada individuo con situaciones más complejas. En estas últimas décadas se ha desviado el enfoque genético del TEA direccionándose al área sistémica, asociado a una desregulación extensa que implica el sistema gastrointestinal, vías de inmuno-inflamación y sistema nervioso. Anormalidades gastrointestinales se han asociado con el autismo, involucrando alteraciones en la composición del microbioma y aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal, favoreciendo la hipótesis de que la disbiosis influye en la comunicación microbiota-intestino-cerebro [11].

Los estudios en modelos animales han sugerido que la composición de la MI modula la integridad tanto de la barrera intestinal como de la barrera hematoencefálica, demostrando que las toxinas que pasan a través de la barrera intestinal pueden inducir la producción de anticuerpos exacerbando la inflamación crónica, mientras los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), estimulan a nivel intestinal las células hepáticas para secretar el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), que modula la permeabilidad de la barrera hematoencefálica [11].

Los microorganismos que componen la MI pueden formar biopelículas, contribuyendo a la propagación de

genes de resistencia a los antibióticos. Las biopelículas se han asociado más comúnmente con enfermedades en la placa dental, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y otras enfermedades infecciosas extraintestinales [12]. En el presente estudio esta asociación no fue significativa ( $p=0,8801$ ), situación que pudiera deberse al escaso número de pacientes investigados, específicamente aquellos con disbiosis persistente. Estudios han demostrado que una microbiota inexistente adquirida lentamente proporciona condiciones óptimas para que *K. pneumoniae* desencadene inflamación intestinal y por consiguiente colitis severa [13], liberando metabolitos tales como: ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) que pueden afectar el metabolismo mitocondrial y la dinámica energética. La aparición de biopelículas es una señal de alerta temprana de la transición crítica hacia un intestino alterado, comprometido y enfermo [14].

En este estudio la formación de biopelículas por *K. pneumoniae* fue detectada en un 66% por el método cuantitativo y en un 45% por el método cualitativo. A pesar de que no hubo concordancia ( $p=0,179$ ) entre los dos métodos, tomando el método cuantitativo como método de referencia, estudios han demostrado que el método cuantitativo en microplaca con CV es la prueba más apropiada y confiable para determinar la formación de las mismas [15] con respecto al método cualitativo en agar BHI más rojo Congo. Cabe destacar que el método cualitativo puede usarse siempre y cuando se corroboren los falsos negativos por el método cuantitativo. En este caso, el método cualitativo serviría de prueba pantalla inicial para determinar la formación de biopelículas y de esta manera puede orientar el diagnóstico sobre la formación de biopelículas a nivel del lumen intestinal donde la microbiota fecal difiere de la microbiota de la mucosa intestinal [16].

Uno de los indicadores estresantes de las biopelículas son los antibióticos. Estos inhiben su formación de 10 a 1000 veces en su estado sésil en contraparte de su estado planctónico [13]. En el presente estudio la susceptibilidad de las cepas de *K. pneumoniae* fue evaluada en su estado planctónico, y las cepas presentaron resistencia de 8% al trimetoprin/sulfametoxazol, 11% a las cefalosporinas, 18% a la amoxicilina/ácido clavulánico y 29% a la ciprofloxacina.

Las cefalosporinas y fluoroquinolonas pueden atacar células en fase estacionaria, pero son más efectivas contra células en división [17]. Por otra parte, la presencia de mecanismos de resistencia como betalactamasas de espectro extendido que se identificó en 3 cepas de este estudio, le confiere mayor protección a la biopelícula como un componente defensivo. Con estas particularidades descritas se pudiera inferir que, aunque la presencia de biopelículas fue tratada con antibióticos orales, la penetración y/o absorción de los mismos fue limitada, debido a la intransigencia de la matriz de polisacáridos que envuelve la biopelícula dándole protección a la misma, por lo que la disbiosis persiste.

En el grupo de pacientes estudiados, 11 (29%) presentaron disbiosis persistente, lo que sugiere que la terapia con antibióticos, probióticos, y dieta no fueron lo

suficientemente efectivas contra las biopelículas formadas a nivel de la mucosa intestinal por *K. pneumoniae*. Estudios han demostrado secreción de metabolitos como poliaminas en concentraciones 62 veces mayores en biopelículas que en la microbiota de tejidos sanos o sin biopelículas. Además, *K. pneumoniae* posee, como las otras bacterias que conforman la MI, genes que codifican para pili tipo IV, motilidad, flagelos, tráfico intracelular, adhesinas, proteínas asociadas a biopelículas por la presencia del gen *pks* (el cual es citotóxico *in vitro*), hidrólisis de urea y la presencia de LPS que integran la membrana externa, induciendo la síntesis de citoquinas proinflamatorias que generan inflamación local y sistémica, otorgándole mayor agresividad y capacidad para formar biopelículas e impedir el efecto del tratamiento [13,18].

La formación de biopelículas por *K. pneumoniae* o cualquier otro patobionte (microorganismo comensal del ser humano que bajo la influencia de un entorno adecuado puede producir enfermedad), puede servir como señal de alerta temprana de aparición de enfermedades asociadas, tales como alergias e intolerancia alimentaria y enfermedad inflamatoria intestinal entre otras, en niños con TEA [19,20], concordando con la hipótesis postulada por Tytgat *et al.*, que establece que las biopelículas que contienen patógenos o patobiontes claves son puntos de inflexión entre dos estados estables alternativos de la MI: sana y enferma [14]. En el presente estudio, tanto en los pacientes con disbiosis persistente como a los que se les evaluó por primera vez la presencia de disbiosis, no se obtuvo una relación entre la presencia de disbiosis y el tratamiento con antibióticos, probióticos y dieta ( $p=0,1107$ ) para normalizar el desequilibrio de la MI, sobre todo en aquellos que estuvieron asociados a biopelículas.

Los antibióticos para las infecciones pediátricas de rutina pueden dañar el intestino y el transporte renal de carnitina, posiblemente empeorando la disfunción mitocondrial y el sistema gastrointestinal y, por consiguiente, incrementando la disbiosis [21]. Estudios manifiestan una recuperación efectiva pero temporal en niños con TEA al administrar vancomicina y rifaximina disminuyéndoles la irritabilidad, pero estos antibióticos no fueron utilizados ni probados en esta investigación; además, la vancomicina solo tiene efecto contra bacterias grampositivas, y *K. pneumoniae* es una bacteria gramnegativa. Por otra parte, no es conveniente indicar vancomicina regularmente, ya que puede seleccionar resistencia a especies de *Enterococcus*, acarreamo un problema de salud pública [21-23]. El inconveniente con el uso de estos y otros antimicrobianos, como los usados en este estudio, es que los síntomas pueden desaparecer, pero cuando la terapia es retirada las células persistentes liberadas restablecen la biopelícula y por lo tanto los síntomas reaparecen junto con la disbiosis [21].

El comportamiento de *K. pneumoniae* se presenta con un paradigma frente a los probióticos como tratamiento individual o con antimicrobianos, en niños con TEA. Un estudio utilizando *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*) CIRM653 con actividad anti-biopelículas contra *K.*

*pneumoniae*, desestabilizó su organización y arquitectura [24]. Otro estudio analizando el perfil transcripcional de *K. pneumoniae* en diferentes formas de vida, mostró que las células dispersas de biopelículas tienen una fuerte modulación descendente de los genes *lsr* y una alta regulación al aumento de las fimbrias con genes tipo 3 [25]. Estos datos sugieren que *L. plantarum* CIRM653 induce modificaciones transcripcionales en *K. pneumoniae*, inhibiendo la formación de biopelículas y dispersión de agregados con alta capacidad de colonización. Sin embargo, es difícil predecir cómo los criterios *in vitro* se traducen en la actividad correspondiente *in vivo* [24]. De los 11 pacientes que tuvieron disbiosis persistente habría que evaluar si los probióticos que tomaron contenían la cepa de *L. plantarum* y cuantos millones de unidades formadoras de colonias fueron administradas, puesto que el uso de probióticos no fue lo suficiente para erradicar las biopelículas por *K. pneumoniae*.

Los tratamientos alimentarios o dietéticos pueden cambiar el ambiente intestinal, y estos han sido los más usados e indicados por los profesionales que hacen intervención biomédica en el autismo. En el presente estudio no hubo relación significativa en cuanto al beneficio de la alimentación en la eliminación de la disbiosis. Los alimentos repetitivos favorecen el sobrecrecimiento de bacterias transitorias, el escaso consumo de fibra disminuye la formación de AGCC, el consumo excesivo de carnes rojas incrementa el metabolismo de las proteínas, y las grasas saturadas aumentan la disbiosis [26]; estas características contribuyen a la permanencia de la entidad y de las biopelículas. Por lo antes expuesto, la alimentación de cada paciente debe ser evaluada individualmente, y no aplicar la misma dieta a todos por igual, situación que pudo influenciar en la no reconstitución de la disbiosis por *K. pneumoniae* en el presente estudio. Las dietas de restricción extremas de alimentos son de difícil cumplimiento, pueden generar deficiencias nutritivas, y probablemente conduzcan a una pérdida de funcionalidad de la MI [27].

Podemos concluir que la falla en el tratamiento con antibióticos aplicado en el presente estudio en los pacientes con disbiosis persistente, se vio afectada por la capacidad que presentó *K. pneumoniae* en formar biopelículas a nivel intestinal impidiendo una resolución del problema, ya que los antimicrobianos utilizados (amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, azitromicina, cefadroxilo, ceftriaxona y ciprofloxacina) no fueron capaces de penetrar y desestabilizar la biopelícula existente. Además, habría que evaluar la constancia en el tiempo de la alimentación y el uso y tipo de probióticos para mejorar la visión que se tiene de estos tratamientos, considerando que el uso constante e indiscriminado de los antibióticos se presenta como un problema de salud pública y que repercute en el desequilibrio del MI en individuos con TEA.

## Referencias

- Singh AU. Dysbiosis, small intestinal bacterial overgrowth and biofilms in autism and chronic illness. *AIMS Molecular Science*. 2018; 5:160-5. Doi: <https://doi.org/10.3934/molsci.2018.2.160>
- Frye RE, Slattery J, MacFabe DF, Allen-Vercoe E, Parker W, Rodakis J, et al. Approaches to studying and manipulating the enteric microbiome to improve autism symptoms. *Microb Ecol Health Dis*. 2015; 26:268-78. Doi: <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.26878>
- Mcelhanon BO, Mccracken C, Karpen S, Sharp WG. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics*. 2014; 133:872-83. Doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3995>
- Adams JB, Johansen LJ, Powell LD, Quig D, Rubin RA. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol*. 2011; 11:22. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-22>
- Iovene MR, Bombace F, Maresca R, Sapone A, Iardino P, Picardi A, et al. Intestinal dysbiosis and yeast isolation in stool of subjects with autism spectrum disorders. *Mycopathologia*. 2017; 182:349-63. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0068-6>
- Moreno-Calderón X, Marcano-Vásquez ME, Ferrara-Valvano GA, Panizo-Domínguez MM, García-Centeno NJ. Formación de biopelículas por *Candida parapsilosis* sensu stricto y su perfil de susceptibilidad en Venezuela. *Kasmera*. 2020; 48:e48119122019. Doi: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3660110>
- Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. 2007; 115:891-9. Doi: [https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm\\_630.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x)
- Kaiser TD, Pereira EM, Dos Santos KR, Maciel EL, Schuenck RP, Nunes AP. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 75:235-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.014>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020. Disponible en <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>. Acceso 10 de Mayo 2020.
- Gómez J, Gómez-Lus ML, Bas P, Ramos C, Cafini F, Maestre JR. ¿Es la cuantificación del biofilm un elemento diferenciador en la patogenia de bacilos gramnegativos? *Rev Esp Quimioter*. 2013; 26:102-111. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/26/2/gomez.pdf>. Acceso 10 Abril 2020.
- Azhari A, Azizan F, Esposito G. A systematic review of gut-immune-brain mechanisms in Autism Spectrum

- Disorder. *Develop Psychobiol.* 2019; 61:752-71. Doi: <https://doi.org/10.1002/dev.21803>
12. Balcázar JL, Subirats J, Borrego CM. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front Microbiol.* 2015; 6:1216. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01216>
  13. Pope JL, Yan Y, Newsome RC, Sun W, Sun X, Ukhanoa M, et al. Microbial colonization coordinates the pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* infant isolate. *Sci Rep.* 2019; 9:3380. Doi: <https://doi.org/10.1038/541598-019-39887-8>
  14. Tytgat HLP, Nobrega FL, van der Oost J, de Vos WM. Bowel biofilms: tipping points between a healthy and compromised Gut? *T Microbiol.* 2019; 27:17-25. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.009>
  15. Melo A, Bizerra F, Freymuller E, Arthington-Skaggs B, Colombo A. Biofilm production and evaluation of antifungal susceptibility amongst clinical *Candida* spp. isolates, including strains of the *Candida parapsilosis* complex. *Med Mycol.* 2011; 49:253-62. Doi: <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.530032>
  16. Buret AG, Motta JP, Allain T, Ferraz J, Wallace JL. Pathobiont release from dysbiotic gut microbiota biofilms in intestinal inflammatory diseases: a role for iron?. *J Biome Sci.* 2019; 26:1. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0495-4>
  17. Buendía ER, María Sánchez M, Oscar Maldonado O, Carmelo Dueñas C. La microbiota intestinal en el paciente crítico. *Acta Colomb Cuid Intensivo.* 2019; 19:28-36. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.acci.2018.06.010>
  18. Chow J, Haiging T, Mazmanian S. Pathobionts of the gastrointestinal microbiota and inflammatory disease. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23:473-80. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.07.010>
  19. Garcés MF, Ascanio J, Márquez AC, Moreno X, Puccio F, Martínez C, et al. Manifestaciones clínicas en niños con Trastornos del Espectro Autista y su asociación con anticuerpos específicos tipo Ig E a alimentos. *Arch Ven Puericult Pediat.* 2018; 81:79-86. Disponible en: <http://www.svpdiatria.org/repositorio/publicaciones/2018/AVPP%2081-3.pdf>. Acceso 15 de abril 2020.
  20. Moreno-Calderón X, Vialva-Guerrero AA, Núñez-Bello ML, Macero-Estévez C, López-Barrera KC, Márquez-Duque AC, Garcés-Da Silva MF. Disbiosis intestinal aeróbica asociada a enfermedades de interés clínico en Venezuela. *Kasmera.* 2020. (En prensa).
  21. Frye RE, John Slattery J, MacFabe DF, Allen-Vercoe E, William Parker W, Rodakis J, et al. Approaches to studying and manipulating the enteric microbiome to improve autism symptoms. *Microbial Ecol H & Dis.* 2015; 26:26878. Doi: <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v26.26878>
  22. Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Vaisanen ML, et al. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol.* 2000; 15:429-35. Doi: <https://doi.org/10.1177/088307380001500701>
  23. Gobernado M, Ponce J. Rifaximina. *Rev Esp Quimioterap.* 2004; 7:141-53. Disponible en: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/17/2/141.pdf>. Acceso 5 de mayo 2020.
  24. Lagrèfeuille R, Miquel S, Balestrino D, Vareille-Delarbre M, Chain F, Langella P, et al. Opposing effect of *Lactobacillus* on *in vitro* *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an *in vivo* intestinal colonisation model. *Benef Microbes.* 2018; 9:87-100. Doi: <https://doi.org/10.3920/BM2017.0002>
  25. Guilhen C, Charbonnel N, Parisot N, Gueguen N, Iltis A, Forestier C, et al. Transcriptional profiling of *Klebsiella pneumoniae* defines signatures for planktonic, sessile and biofilm-dispersed cells. *BMC Genomics.* 2016; 17:237. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2557-x>
  26. Moreno X, Olivares A, Santamaria G, Sánchez R, Garcés F, Márquez A, et al. Disbiosis en niños con trastorno autista antes y después de un tratamiento biológico y nutricional. *Arch Ven Puericul Ped.* 2019; 82:15-20. Disponible en: <http://www.svpdiatria.org/repositorio/publicaciones/2019/AVPP%2082-1.pdf>. Acceso 15 de abril 2020.
  27. Kolodziejczyk AA, Danping Zheng D, Elinav E. Diet-microbiota interactions and personalized nutrition. *Nat Rev Microbiol.* 2019; 17:742-53. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0256-8>