

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

**Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de dos compuestos derivados de *Allium cepa* (propil propano tiosulfinato y propil propano tiosulfonato) frente a microorganismos patógenos humanos**

**María Albertuz Crespo**

**Granada 2021**



**UNIVERSIDAD  
DE GRANADA**

**Editor:** Universidad de Granada. Tesis Doctorales

**Autor:** María Albertuz Crespo

**ISBN:** 978-84-1306-945-6

**URI:** <http://hdl.handle.net/10481/69666>





# UNIVERSIDAD DE GRANADA

Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de  
dos compuestos derivados de *Allium cepa* (propil  
propano tiosulfinato y propil propano tiosulfonato)  
frente a microorganismos patógenos humanos

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

**María Albertyz Crespo**

**Granada 2021**

## **AGRADECIMIENTOS**





Realizar una tesis doctoral no es algo que se pueda realizar en solitario, al final se trata de un trabajo en equipo que lentamente va tomando forma, y por ello he de agradecer a todos aquellos que han podido hacer este sueño posible.

En primer lugar agradecer a mis directores por la oportunidad brindada para poder realizar la tesis, por toda la ayuda que me han prestado y por no darse por vencidos ni siquiera en los momentos más duros.

Por supuesto, tampoco puedo olvidarme del apoyo esencial de mis padres y de Juan, que han tenido que aguantarme y aun así siempre me han animado a dar lo mejor de mí.

Y por último, a Isaac, mi compañero de laboratorio y de “fatigas”, con el que las mañanas interminables de pipeteo y siembra fueron más amenas, así como a las personas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina que me han ayudado en todo lo posible durante el camino.

A todos...

**GRACIAS**





## ÍNDICE





---

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>1.1. Propiedades biológicas y terapéuticas de las plantas del género <i>Allium</i></b>	7
<b>1.2. Actividad antimicrobiana de los compuestos organosulfurados obtenidos del ajo y la cebolla</b>	10
1.2.1. Actividad antibacteriana de los compuestos derivados de <i>Allium</i> spp.	13
1.2.2. Actividad antifúngica de los compuestos derivados de <i>Allium</i> spp.	21
1.2.3. Actividad antivírica de los compuestos derivados de <i>Allium</i> spp.	28
1.2.4. Actividad antiparasitaria de los compuestos derivados de <i>Allium</i> spp.	28
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	31
<b>3. MATERIAL Y MÉTODO</b>	35
<b>3.1. Selección de los microorganismos</b>	37
3.1.1. Sensibilidad antimicrobiana mediante microdilución	37
3.1.2. Sensibilidad microbiana por exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO	39
<b>3.2. Selección de los antimicrobianos, PTS y PTSO</b>	40
<b>3.3. Estudio de la sensibilidad antibiótica mediante microdilución</b>	40
<b>3.4. Estudio de la sensibilidad antifúngica mediante microdilución</b>	50
<b>3.5. Estudio de la sensibilidad microbiana por exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO</b>	57
<b>3.6. Análisis estadístico</b>	59
<b>4. RESULTADOS</b>	61
<b>4.1. Sensibilidad antibiótica</b>	63
4.1.1. Sensibilidad de enterobacterias	63
4.1.2. Sensibilidad de bacilos gramnegativos no fermentadores	75
4.1.3. Sensibilidad de cocos grampositivos	79
<b>4.2. Sensibilidad antifúngica</b>	81
<b>4.3. Sensibilidad microbiana por exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO</b>	83

---

	<b>Página</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b>	97
<b>5.1. Actividad antimicrobiana de PTS y PTSO</b>	99
5.1.1. Actividad antibacteriana	101
5.1.2. Actividad antifúngica	104
<b>5.2. Actividad antibacteriana y antifúngica de la fase gaseosa de PTS y PTSO</b>	106
<b>6. CONCLUSIONES</b>	111
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b>	115
<b>8. PUBLICACIONES</b>	139
8.1. In vitro antibacterial activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate derived from <i>Allium</i> spp. against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. <i>BioMed Research International</i> . 2018, 2018, 7861207.	141
8.2. Antibacterial and antifungal activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate, two organosulfur compounds from <i>Allium cepa</i> : In vitro antimicrobial effect via the gas phase. <i>Pharmaceuticals (Basel)</i> , 2020, 14, 21.	153
8.3. Antimicrobial activity of <i>Allium</i> -derived compounds: focus an potential treatment of human infections. En: <i>Allium: ecology, distribution and cultivation</i> . Caleb Wettenhall (ed.). Nova Science Publishers, New York, 2020. ISBN: 978-1-53618-079-4.	171

---

## RESUMEN





---

Propil propano tiosulfinato (PTS) y propil propano tiosulfonato (PTSO) son dos compuestos organosulfurados volátiles, derivados de *Allium cepa*, cuya actividad antimicrobiana ha sido ampliamente documentada. El objetivo del estudio fue la evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y anticandidiásica de ambas sustancias en comparación con diversos antibióticos y antifúngicos comúnmente utilizados en clínica humana, así como determinar la capacidad de sus fases gaseosas para inhibir el crecimiento de una colección de bacterias y levaduras.

Para ello se seleccionaron, a partir de muestras clínicas humanas, 212 bacilos gramnegativos y 267 cocos grampositivos resistentes a, al menos, un grupo de antibióticos, y 203 levaduras del género *Candida*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida o fungicida (CMB/CMF) de estos microorganismos frente a diferentes antimicrobianos, PTS y PTSO, mediante un ensayo de microdilución en caldo Mueller-Hinton, en el caso de las bacterias, y en medio RPMI-1640, en el caso de las levaduras. Para el estudio de la sensibilidad microbiana por exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO se seleccionaron 5 bacterias y 2 levaduras de la colección ATCC y se realizó un procedimiento caracterizado por la ausencia de contacto directo entre el microorganismo y la sustancia evaluada.

PTS mostró actividad moderada frente a *Enterobacteriaceae*, con valores de CMI<sub>50</sub> (y CMB<sub>50</sub>) y CMI<sub>90</sub> (y CMB<sub>90</sub>) entre 128-512 mg/L, mientras que la actividad de PTSO fue superior, con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> entre 64-128 mg/L, y CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub> entre 128-512 mg/L. Ambos compuestos mostraron menor actividad frente a *P. aeruginosa* (CMI<sub>50</sub> = 1024 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 2048 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 2048 mg/L y CMB<sub>90</sub> = 2048 mg/L, para PTS; CMI<sub>50</sub> = 512 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 1024 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 512 mg/L y CMB<sub>90</sub> = 2048 mg/L, para PTSO) que frente a otros bacilos gramnegativos no fermentadores (CMI<sub>50</sub> = 128 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 512 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 128 mg/L y CMB<sub>90</sub> = 512 mg/L, para PTS; CMI<sub>50</sub> = 64 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 256 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 64 mg/L y CMB<sub>90</sub> = 256 mg/L, para PTSO). La actividad frente al conjunto de cocos grampositivos (*S. aureus*, *E. faecalis* y *S. agalactiae*) fue superior a la observada frente a enterobacterias, especialmente en el caso de PTSO (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 8 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 32 mg/L, y CMB<sub>90</sub> = 64 mg/L, en *S. aureus*; CMI<sub>50</sub> = 4 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 8 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 8 mg/L y CMB<sub>90</sub> = 16 mg/L, en *E. faecalis* y *S. agalactiae*).

Todas las levaduras fueron sensibles a los antifúngicos ensayados, a excepción de *C. glabrata* y *C. krusei*, que fueron resistentes a los azoles. También frente a estos microorganismos, PTSO (con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> entre 4-16 mg/L y 8-32 mg/L, respectivamente) fue significativamente más activo que PTS (con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> entre 16-64 mg/L y 32-64 mg/L, respectivamente).

La exposición de los microorganismos a la fase gaseosa de PTS y PTSO generó zonas de inhibición del crecimiento cuyos diámetros se relacionaron directamente con la concentración del compuesto organosulfurado e inversamente con el inóculo microbiano. La cuantificación de las concentraciones de ambas sustancias alcanzadas en el medio de cultivo a través de su difusión aérea mostró la existencia de un gradiente de concentración desde la zona central hacia la periferia, con una relación lineal inversa entre la distancia al centro del medio de cultivo y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado. Sólo *P. aeruginosa* ATCC 27853 se mostró resistente a ambos compuestos, mientras que los mayores halos de inhibición del crecimiento se observaron en las levaduras (*C. albicans* ATCC 200955 y *C. krusei* ATCC 6258).

En todos los procedimientos descritos y frente a todos los microorganismos evaluados (a excepción de *P. aeruginosa*), PTSO se mostró más activo que PTS y el efecto antifúngico fue superior al efecto antibacteriano.

En conclusión, PTS y PTSO poseen actividad antibacteriana y anticandidiásica *in vitro*, incluida su fase gaseosa. Estos resultados proporcionan una información básica y preliminar sobre el potencial de estas sustancias en la prevención o el tratamiento de infecciones humanas, especialmente aquellas en las que las opciones terapéuticas actuales son escasas, siempre que se desarrollen formulaciones adecuadas a la vía de administración y se garantice un uso clínico seguro.



# 1. INTRODUCCIÓN





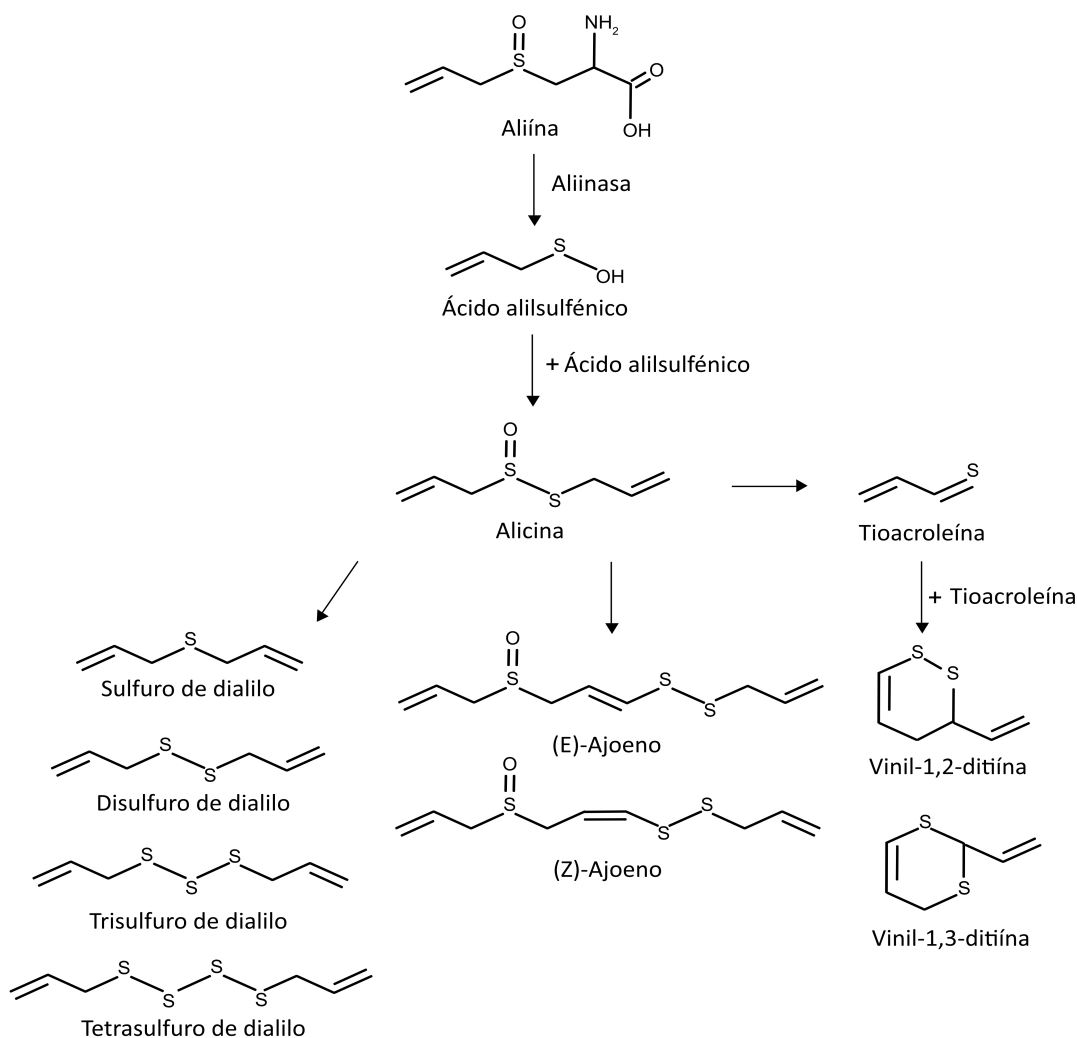
## 1.1. PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y TERAPÉUTICAS DE LAS PLANTAS DEL GÉNERO

### **ALLIUM**

Las propiedades culinarias y terapéuticas de algunas plantas de la familia *Liliaceae*, como el ajo (*Allium sativum*), la cebolla (*Allium cepa*), el cebollino (*Allium schoenoprasum*), el puerro (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) y otras muchas plantas del género *Allium*, se conocen desde tiempos inmemoriales. Así, por ejemplo, los sumerios empleaban el ajo para espantar a los insectos, los egipcios lo suministraban a los esclavos como vigorizador y en Grecia se ingería para evitar el tifus y el cólera.

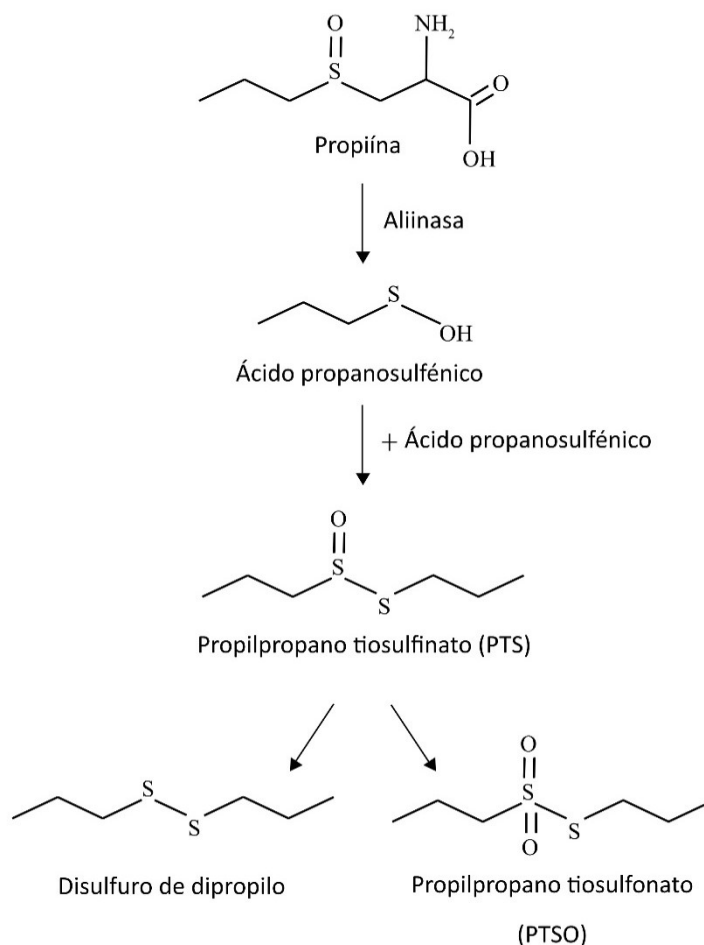
Actualmente, estas propiedades se atribuyen a la presencia de diversos minerales (potasio, magnesio, calcio, hierro, cobre, cobalto, selenio, etc.), aminoácidos esenciales, lípidos, fibra, vitaminas (B1, B2, B3, C), fructooligosacáridos, terpenos y diferentes compuestos fenólicos y azufrados (Koch y Lawson, 1996). Entre estos últimos, hay que destacar la presencia de cantidades variables de precursores S-alqu(en)il-cisteína sulfóxidos, solubles en medios acuosos, que son responsables no solo del olor y sabor característicos de estas plantas, sino, en gran medida, de algunas de las propiedades medicinales atribuidas a su consumo (Kodera y cols., 2017). Conocer en profundidad los efectos que generan en la salud humana y los mecanismos de acción por los que se producen, es el paso previo e imprescindible para poder determinar su potencial uso en medicina. En este sentido, las dos liliáceas que más se han estudiado son el ajo y la cebolla.

En el ajo fresco, el más importante de los compuestos azufrados es la aliína (S-alil-L-cisteína sulfóxido), que se distribuye en el citoplasma celular. Cuando el ajo se corta o machaca, se libera aliinasa, una enzima común a todas las especies del género *Allium* que se concentra en el interior de vacuolas citosólicas. Esta enzima genera ácido alilsulfénico a partir de la aliína. Dos moléculas de ácido alilsulfénico se condensan espontáneamente transformándose en alicina o tiosulfonato de dialilo (Borlinghaus y cols., 2014). La escasa estabilidad de la alicina a temperatura ambiente favorece su transformación, por diferentes mecanismos, en otros derivados organosulfurados, solubles en medios oleosos, como los ajoenos (E-ajoeno, Z-ajoeno), las vinilditiínas (vinil-1,2-ditiína, vinil-1,3-ditiína) y los sulfuros de dialilo (sulfuro de dialilo o DAS, disulfuro de dialilo o DADS, trisulfuro de dialilo o DATS; tetrasulfuro de dialilo o DATTS), principalmente (Corzo-Martínez y cols., 2007) (figura 1).



**Figura 1.** Síntesis de la alicina y otros derivados organosulfurados a partir de la aliína del ajo.

En la cebolla, los compuestos azufrados mayoritarios son la isoaliína (S-propenil-L-cisteína sulfóxido) que se transforma en el factor lacrimógeno por acción de la sintasa del factor lacrimógeno; la metiína (S-metil-L-cisteína sulfóxido), también presente en el ajo, y la propiína (S-propil-L-cisteína sulfóxido). A partir de este último, y por acción de la aliinasa, se forma ácido propanosulfénico y posteriormente propilpropano tiosulfonato (PTS) (Keusgen y cols., 2002). Aunque más estable que la alicina, PTS es también un compuesto lábil, que mediante reacciones de dismutación o desproporción se transforma en disulfuro de dipropilo y propilpropano tiosulfonato (PTSO) (Guillamón, 2018) (figura 2).



**Figura 2.** Síntesis de propilpropano tiosulfinato (PTS) y propilpropano tiosulfonato (PTSO) a partir de la propiína de la cebolla.

Todas estas moléculas (tiosulfinatos y compuestos derivados) presentan diversas propiedades biológicas: carácter antioxidante, efecto hipolipidémico e hipocolesterolemiante, acción hipotensora y cardioprotectora, propiedades antitrombóticas, actividad anticancerígena, efecto antiinflamatorio e inmunomodulador y, muy especialmente, actividad antimicrobiana (antibacteriana, antifúngica, antivírica y antiparasitaria). En concreto, Louis Pasteur fue el primero en demostrar la actividad antibacteriana de la cebolla y el ajo (Sivam, 2001) y múltiples estudios posteriores lo han corroborado desde que, en 1944, se aislara la alicina del ajo (Cavallito y Bailey, 1944). Todas estas propiedades han sido ampliamente evaluadas para dilucidar los mecanismos de acción de estas sustancias y establecer si podrían o no desempeñar un papel importante en la prevención y/o el tratamiento de diversas enfermedades humanas.

## **1.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS OBTENIDOS DEL AJO Y LA CEBOLLA**

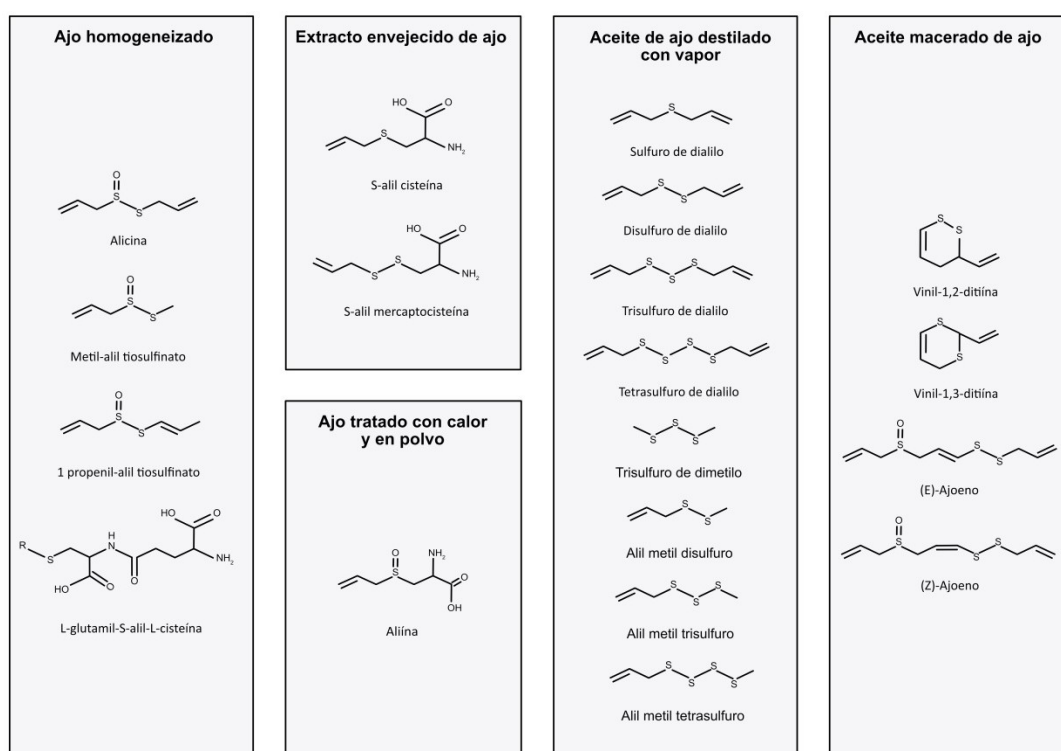
En la capacidad antimicrobiana de la alicina o de PTS, la presencia de un grupo tiosulfinato juega un papel imprescindible. Este grupo químico puede reaccionar con residuos de cisteína, alterando la función de proteínas ricas en este aminoácido, especialmente aquellas implicadas en el equilibrio redox de la célula. También es responsable, en gran medida, de la alteración de la integridad del material genético y del daño sobre membranas biológicas (Borlinghaus y cols., 2014). Sin embargo, debido a la inestabilidad de estos compuestos, se considera que son sus derivados, especialmente los ajoenos y los sulfuros de dialilo en el caso de la alicina, y PTSO en el de PTS, los que desempeñan un papel más relevante en la actividad antimicrobiana atribuible a estas plantas (Miron y cols., 2004), aunque no en todos los casos se ha demostrado esa mayor eficacia (Casella y cols., 2013).

Los tiosulfatos son especies reactivas de azufre (*reactive sulfur species*, RSS) que tienen la capacidad de oxidar moléculas que contengan grupos tiol (-SH o sulfidrido) en su estructura, como el aminoácido cisteína. Este está presente en el glutatión, un tripéptido no proteico, así como en otras proteínas microbianas de naturaleza enzimática (succinato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, tiorredoxina reductasa, ureasas, ARN polimerasas, etc.). La reacción de cisteína con los tiosulfatos provoca la aparición de nuevas moléculas (S-alilmercaptoglutatión, S-alilmercaptocisteína), una disminución intracelular de los niveles de glutatión reducido (GSH), con el consiguiente incremento del estrés oxidativo, y la inhibición del metabolismo microbiano por alteración de algunas funciones enzimáticas (Gruhlke y cols., 2010). Al igual que ocurre con los tiosulfatos, la presencia de un grupo tiosulfonato, también susceptible de reaccionar con moléculas que contengan grupos tiol, puede desencadenar daño celular por mecanismos similares a los descritos para los anteriores (Roth y Theato, 2013).

El ajoeno inhibe la síntesis de fosfatidilcolina, lo que genera daño en las membranas celulares; inhibe a la enzima glutatión reductasa, encargada de reducir el glutatión disulfuro (GSSG) a GSH; y, al igual que alicina, también reacciona con los grupos tiol de residuos de cisteína de diversas proteínas, alterando su funcionalidad (Ledezma y Apitz-Castro, 2006).

Los sulfuros de dialilo también provocan un descenso de los niveles de GSH celular y, por tanto, un incremento del estrés oxidativo. Es este caso el efecto se asocia a la disminución de la actividad de enzimas como la superóxido dismutasa, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y la glutatión peroxidasa, o al incremento de la actividad de la glutatión S-transferasa (Yousuf y cols., 2010). Además, tienen la capacidad de afectar el proceso de respiración mitocondrial al interferir con la cadena transportadora de electrones e inhibir a la ATP sintasa (Lemar y cols., 2007).

Los diversos estudios que han evaluado las propiedades antimicrobianas del género *Allium*, lo han hecho en base a la utilización de distintas formas de presentación, en las que la cantidad de los diferentes principios activos depende del método de preparación o extracción (figura 3). El ajo fresco crudo sólo contiene aliína. El ajo deshidratado o pulverizado incluye aliína y aliinasa, pero no alicina. Los aceites esenciales no contienen alicina ni productos hidrosolubles, pero son ricos en compuestos liposolubles como ajoeno y sulfuros de dialilo. El extracto de ajo envejecido no contiene alicina y, aunque es rico en compuestos organosulfurados solubles en agua, presenta escasa cantidad de los solubles en medios oleosos (ajoeno y sulfuros de dialilo) (Majewski, 2014).



**Figura 3.** Compuestos organosulfurados mayoritarios presentes en los diferentes preparados de ajo (modificado de Committee on Herbal Medicinal Products, 2013).

De los diferentes aceites esenciales, el del ajo y el de la cebolla serían los más eficaces. En la composición del aceite esencial de ajo los tres compuestos principales son DADS, DATS y DATTS, mientras que el componente principal del aceite esencial de cebolla es el disulfuro de dipropilo (Corzo-Martínez y cols., 2007; Mnayer y cols., 2014). Conforme se incrementa el número de átomos de azufre en los compuestos organosulfurados (mono-, di-, tri-, tetra-), el efecto antimicrobiano también es mayor (Lu y cols., 2011b; O'Gara y cols., 2000; Yin y Cheng, 2003). Sin embargo, no solo son importantes los enlaces disulfuro, sino también la presencia de grupos dialilo. De hecho, la ausencia del grupo alilo en la estructura de los sulfuros se asocia a la ausencia total de actividad antimicrobiana (Casella y cols., 2012).

Como se ha comentado previamente, GSH es una molécula clave en la actividad antimicrobiana atribuible a los compuestos azufrados obtenidos a partir de *Allium* spp. Se trata de un antioxidante fundamental, que protege a las células de las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS), como los radicales libres superóxido y los iones peróxido, y que mantiene el ambiente reductor en el interior de las células. Su depleción se asocia a un incremento de ROS, y, por tanto, a un desequilibrio que incrementa el estrés oxidativo y que conduce al daño y la muerte celular (Lemar y cols., 2007). GSH también juega un papel fundamental en numerosas reacciones metabólicas y bioquímicas: controla la permeabilidad de la membrana, interviene en la síntesis y reparación del ADN, en la síntesis de proteínas, en el transporte de aminoácidos y en el mantenimiento de la forma activa de ciertas enzimas. En definitiva, el agotamiento de GSH debilita la maquinaria de defensa celular y afecta su supervivencia (Yousuf y cols., 2010).

Se considera que los principales mecanismos de acción de los compuestos azufrados derivados de *Allium* spp. son una combinación de su capacidad para oxidar e inhibir enzimas cruciales para el metabolismo de la célula y la de disminuir la defensa celular frente al estrés oxidativo, lo que, en gran medida, conduce al efecto antimicrobiano. Sin embargo, más allá de estos mecanismos de acción principales, también se sugiere la posibilidad de inducir daño celular mediante otros procedimientos. Se ha descrito la permeabilización y despolarización de membranas celulares, por un mecanismo independiente de su actividad como reactivo de tiol y asociado a la capacidad de deformar las membranas y abrir poros en estas (Gruhlke y



cols., 2015), aunque este efecto no ha podido ser confirmado en todos los casos (Miron y cols., 2000). También se ha demostrado la capacidad de alterar la síntesis de ácidos nucleicos (Feldberg y cols., 1988) y de modificar la expresión de algunos genes reguladores microbianos (Khodavandi y cols., 2011a; Low y cols., 2008; Sadri y cols., 2016).

Aunque los compuestos organosulfurados derivados de las diferentes especies de *Allium* han sido las sustancias más estudiadas, también en estas plantas se han aislado una gran variedad de otros principios con actividad antimicrobiana. Es el caso de allivina, una proteína aislada de los bulbos de *Allium sativum* var. *round clove* (Wang y Ng, 2001); allicepina, un péptido obtenido de bulbos de cebolla (Wang y Ng, 2004); ciertas saponinas (Lanzotti y cols., 2012; Matsuura y cols., 1988); compuestos como el alcohol alílico, un producto metabólico que se acumula después de triturar dientes de ajo (Lemar y cols., 2005), o diversos compuestos fenólicos (Fратиanni y cols., 2016). Por tanto, la presencia de otras moléculas bioactivas, más allá de los elementos organosulfurados, también es esencial para determinar las propiedades antimicrobianas atribuidas a estas plantas (Petropoulos y cols., 2018).

### **1.2.1. Actividad antibacteriana de los compuestos derivados de *Allium* spp.**

La resistencia de las bacterias a los antibióticos que habitualmente se usan en clínica humana ha aumentado dramáticamente en los últimos tiempos, lo que ha llevado a que la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*, WHO) reconozca este hecho como una amenaza global y uno de los principales problemas emergentes para la salud pública mundial (World Health Organization, 2001). La existencia de bacterias multirresistentes (*multidrug-resistant*, MDR), caracterizadas por la resistencia combinada a varios antibióticos, limita de manera importante las opciones terapéuticas frente a las infecciones producidas por estos microorganismos. Como ejemplos más destacados de este fenómeno, la multirresistencia afecta a bacterias grampositivas, entre las que se incluyen *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), *S. aureus* con sensibilidad intermedia a glucopéptidos (*glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus*, GISA) o *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. resistentes a vancomicina (*vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*, VRSA / *vancomycin-resistant*

*Enterococcus*, VRE); a bacterias gramnegativas como las enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) o las bacterias productoras de carbapenemasas; o a bacterias ácido-alcohol resistentes como MDR *Mycobacterium tuberculosis*. En los últimos tiempos, han adquirido una especial importancia las bacterias extensamente resistentes (*extensively drug-resistant*, XDR) y las resistentes a todos los antibióticos (*pandrug-resistant*, PDR) como se ha demostrado en algunos aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y algunas especies de enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, caracterizadas por la resistencia a todas las familias de antibióticos habitualmente empleadas frente a estos microorganismos (Magiorakos y cols., 2012).

Aunque el mayor impacto de esta multirresistencia bacteriana se produce entre los pacientes ingresados en hospitales, por su mayor susceptibilidad y por la posibilidad de diseminación de los microorganismos en ese ambiente, la resistencia antibiótica entre los patógenos comunitarios también ha aumentado considerablemente (Rodríguez-Baño y cols., 2010). En general, se trata de bacterias con una elevada capacidad de diseminación, no sólo dentro del hospital, sino también fuera de él.

Por estos motivos, organizaciones internacionales como el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC), los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) o la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (*Infectious Diseases Society of America*, IDSA), entre otras, recomiendan poner en marcha diversas actuaciones para hacer frente a este problema. Entre ellas, figura el desarrollo de nuevas moléculas con propiedades antibacterianas, algunas de las cuales pueden tener un origen natural (Boucher y cols., 2013). En este sentido, tal y como se ha comentado previamente, diversos productos organosulfurados derivados de *Allium* spp., como la alicina, los ajoenos, las vinilditiínas y los sulfuros de dialilo, han evidenciado poseer actividad antibacteriana.

El compuesto organosulfurado que se ha mostrado más activo es alicina, ya que se considera que la pérdida del grupo tiosulfinato reduce considerablemente dicha capacidad antibiótica (Borlinghaus y cols., 2014; Casella y cols., 2013). Para poder ejercer su efecto, la alicina y otros tiosulfatos, como PTS o S-metil metanotiosulfinato

(derivado de *A. roseum*), y tiosulfonatos como PTSO o S-metil metanotiosulfonato (derivado de *A. ursinum*) tienen que alcanzar sus dianas intracelulares (Tomšik y cols., 2019; Touihri y cols., 2015). Para ello, en primer lugar, deben atravesar la pared celular y la membrana citoplasmática, que no suponen un impedimento para la penetración y difusión de estas moléculas, así como, en su caso, estructuras bacterianas más externas como la capa mucosa o la cápsula (Miron y cols., 2000). Una vez en el interior de la bacteria, las dianas de actuación son múltiples, aunque íntimamente relacionadas entre sí: reacción con moléculas que contengan grupos tiol, inhibición de la síntesis de lípidos, inhibición total de la síntesis de ARN e inhibición parcial de la síntesis de ADN y proteínas. Todo ello conducirá finalmente a la inhibición del crecimiento y a la muerte del patógeno bacteriano (Booyens y Thantsha, 2014; Ross y cols., 1988).

Como se ha comentado previamente, el principal mecanismo de acción de estas moléculas es consecuencia de la rápida reacción de los tiosulfonatos y tiosulfonatos con los residuos de cisteína presentes en el glutatión o en enzimas importantes para el metabolismo bacteriano (Ankri y Mirelman, 1999; Focke y cols., 1990; Rabinkov y cols., 1998). Muller y cols. (2016) demostraron en *Escherichia coli* que el efecto antibiótico de la alicina es consecuencia, por un lado, de la disminución en los niveles de GSH, lo que incrementa el estrés oxidativo de la bacteria; y, por otro, de la inactivación de enzimas a través de la modificación de cisteínas, bien como consecuencia directa de la reacción de los residuos de cisteína con la alicina, o bien, como apuntaron otros autores, por la reacción con el S-alilmercaptoglutaratión (GSSA) (Rabinkov y cols., 2000). La inhibición de enzimas metabólicas tan importantes como las deshidrogenasas o las reductasas de tiorredoxina, a través de este mecanismo de acción, podría ser letal para el microorganismo (Ankri y Mirelman, 1999). En cualquier caso, cuando se comparan estos compuestos con la mayoría de los antibióticos es evidente una ventaja, que al no dirigirse a una proteína específica, el desarrollo de resistencia por mutaciones puntuales es bastante improbable (Muller y cols., 2016).

Algunas de estas enzimas, cuya función puede ser inhibida por acción de la alicina y otros compuestos, también son importantes factores de virulencia bacteriana. Es el caso de las tiol proteasas, que causan daños graves a los tejidos del hospedador y cuya inhibición, si bien puede no ser letal para el microorganismo, puede ser suficiente para bloquear la virulencia del mismo (Ankri y Mirelman, 1999). Así, en

*Porphyromonas gingivalis* se ha comprobado que la inhibición de las enzimas arginina-gingipaína y lisina-gingipaína, unas cisteín-proteasas que actúan como importantes factores de virulencia de esta bacteria, la modificación del aminoácido por su reacción con los grupos tiol es el principal mecanismo de acción de estas sustancias frente a esta bacteria (Bachrach y cols., 2011, Bakri y Douglas, 2005).

Se ha demostrado la capacidad de alicina para inhibir la ureasa de *Proteus mirabilis*, responsable de hidrolizar la urea presente en la orina, alcalinizándola y provocando la formación de cálculos de estruvita en infecciones del tracto urinario por este patógeno (Ranjbar-Omid y cols., 2015). De igual modo, es posible que la alicina pueda inhibir la ureasa de *Helicobacter pylori*, que permite su supervivencia en el ambiente ácido del estómago. Otros estudios han puesto de manifiesto su capacidad de inhibición de toxinas como las hemolisinas de *Streptococcus pneumoniae* (neumolisina), *Streptococcus pyogenes* (estreptolisina O) o *S. aureus* (alfa y gamma toxinas), así como de la exotoxina eritrogénica o pirógena de *S. pyogenes*, por este mismo mecanismo (Arzanlou, 2016; Arzanlou y Bohlooli 2010; Arzanlou y cols., 2011; El-Azzouny y cols., 2018; Leng y cols., 2011).

También se ha evidenciado la capacidad de estas sustancias de inhibir la formación de biofilms, un factor de virulencia asociado a la adherencia a los tejidos vivos y a las superficies de dispositivos artificiales, que hace a las bacterias más resistentes a la fagocitosis y a los antibióticos. Este efecto inhibitor parece estar relacionado con la reactividad de estas sustancias con los grupos tiol presentes en las enzimas que intervienen en la producción del exopolisacárido. Se ha informado que el extracto de ajo inhibe la actividad *quorum sensing*, *in vitro* y en modelos animales, lo que atenuaría la virulencia, facilitaría la fagocitosis y coadyuvaría en el tratamiento antibiótico frente a bacterias formadoras de biofilms como *P. aeruginosa* (Bjarnsholt y cols., 2005; Harjai y cols., 2010; Lihua y cols., 2013), *P. mirabilis* (Ranjbar-Omid y cols., 2015), *Enterococcus faecalis* (Birring y cols., 2015), *S. aureus* (El-Azzouny y cols., 2018) o *Staphylococcus epidermidis* (Pérez-Giraldo y cols., 2003), en las que este juega un papel fundamental para el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio, del tracto urinario o su adherencia a dispositivos intravasculares, entre otros. Sin embargo, ensayos *in vivo* no han demostrado, de forma significativa, la capacidad de inhibir la

formación de biofilms en *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, por lo que es necesario seguir profundizando en el estudio de esta propiedad (Smyth y cols., 2010).

Otro mecanismo de acción antibacteriano importante es la alteración de los lípidos, dañando la integridad de las membranas celulares. Aunque se sugiere que, en gran medida, la capacidad de la alicina para permeabilizar las membranas celulares es independiente de su actividad como reactivo de tiol (Gruhlke y cols., 2015), se ha demostrado que la interacción de las enzimas que forman parte del sistema bacteriano de acetil-CoA con los tiosulfatos (y tiosulfonatos) bloquea la incorporación de acetato en los ácidos grasos, inhibiéndose la formación de lípidos (Focke y cols., 1990). En cualquier caso, el efecto principal de esta interacción es que la formación de la bicapa de fosfolípidos de la membrana bacteriana se ve gravemente afectada (Meriga y cols., 2012).

Además de los mecanismos anteriores, alicina inhibe a la ARN polimerasa y con ello bloquea la síntesis total de ARN bacteriano (Feldberg y cols., 1988). La ARN polimerasa de *E. coli*, en su subunidad alfa, contiene un único grupo sulfhidrilo que reacciona con grupos tiol, lo que sugiere que esta enzima, no sólo en esta bacteria, sino en otras muchas, también podría ser un objetivo para la alicina (Ankri y Mirelman, 1999). Debido a la ausencia de ARN mensajero, ARN ribosómico y ARN de transferencia, la síntesis de proteínas y de ADN bacteriano también se inhibirán, por lo que el crecimiento y desarrollo bacteriano se verán gravemente afectados (Meriga y cols., 2012).

En definitiva, es evidente que la inhibición del crecimiento y la muerte bacteriana se producen debido a modificaciones en las proteínas, ácidos grasos y fosfolípidos de la membrana celular, así como en los ácidos nucleicos (Booyens y Thantsha, 2014). Como consecuencia de todos estos procesos, la exposición a compuestos organosulfurados, especialmente alicina, altera la estructura bacteriana, rompiendo las membranas y paredes celulares, generando deformidades morfológicas evidentes, que, dependiendo del tipo de bacteria, pueden ser el alargamiento o acortamiento celular, el incremento del tamaño, la condensación de material citoplasmático, la desintegración de membranas y, en conjunto, la pérdida de la integridad estructural de la bacteria (Alli y cols., 2011; Booyens y cols., 2014; Lu y cols., 2011a; Lu y cols., 2011b).

A través de este conjunto de mecanismos de acción, los compuestos organosulfurados derivados de *Allium* spp. se consideran activos frente a un amplio grupo de bacterias grampositivas y gramnegativas, si bien, con diferencias entre ellas (Mikaili y cols., 2013). Es posible que la presencia de enzimas bacterianas que destruyan o alteren estos compuestos, o la diferente composición de polisacáridos y lípidos de la pared celular, que puedan alterar la permeabilidad de la bacteria a los mismos, expliquen estas diferencias (Abubakar, 2009; Eja y cols., 2007). Además, actualmente se están evaluando las propiedades antibacterianas de nuevos tiosulfatos de síntesis, con actividad antibacteriana similar, pero con propiedades mejoradas (Leontiev y cols., 2017).

Entre las bacterias patógenas humanas que más se ha estudiado el efecto de los compuestos derivados de *Allium* spp. se encuentran *Staphylococcus* spp. (Cutler y Wilson, 2004), *Streptococcus* spp. (Jain y cols., 2015), *L. monocytogenes* (Lu y cols., 2011b), *Bacillus* spp. (Pundir y cols., 2010), *Clostridium* spp. (De Witt y cols., 1979), *E. coli* (Johnson y Vaughn, 1969), *Klebsiella* spp. (Tsao y Yin, 2001), *Shigella* spp., *Salmonella* spp. (Eja y cols., 2007), *Proteus* spp. (Ranjbar-Omid y cols., 2015), *Burkholderia cepacia* (Wallock-Richards y cols., 2014), *Vibrio cholerae* (Hannan y cols., 2010), *H. pylori* (O’Gara y cols., 2008) o *M. tuberculosis* (Hannan y cols., 2011). También se han realizado estudios sobre patógenos periodontales como *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Prevotella intermedia* y *Actinomyces oris*, entre otros (Bachrach y cols., 2011; Bakri y Douglas, 2005; Kshirsagar y cols., 2018; Shetty y cols., 2013).

En general, diversos trabajos apuntan a que las bacterias grampositivas son más sensibles a los extractos de las diferentes especies de *Allium* que las gramnegativas, lo que podría deberse a las diferencias en la estructura de la pared celular. Las bacterias grampositivas carecen de membrana externa, mientras que la que poseen las bacterias gramnegativas podría actuar como una barrera para muchos tipos de sustancias (Chikwem y cols., 2008; Ismail y cols., 2013). Estos resultados contrastan, sin embargo, con los obtenidos por otros autores, en los que los extractos de *A. sativum* exhibieron principalmente su actividad antibacteriana en bacterias gramnegativas (Iwalokun y cols., 2004). En cualquier caso, es necesario, para poder

explicar mejor las propiedades antibacterianas de las especies de *Allium*, comprender mejor la composición y mecanismo de acción de los diferentes compuestos bioactivos de estas plantas (Farag y cols., 2017).

Es especialmente relevante destacar que esta actividad antibacteriana se mantiene incluso entre aislados clínicos resistentes a antibióticos. Sin embargo, según ponen de manifiesto algunos trabajos, no se muestran tan activos frente a *P. aeruginosa* y otras bacterias relacionadas (bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa). Frente a microorganismos como estos los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI), en comparación con otros antibióticos y otras especies bacterianas, son tan elevados que serían necesarias grandes concentraciones de estos compuestos, lo que no es factible desde el punto de vista terapéutico (Abubakar, 2009; Muller y cols., 2016).

Un aspecto importante a evaluar en estas sustancias es el efecto sinérgico con los antibióticos de uso habitual. Para poder seleccionar un compuesto que pueda actuar en sinergia con un fármaco es necesario comprender el mecanismo de acción del principio activo en presencia y ausencia del compuesto natural, y definir la interacción entre ambos (Ushimaru y cols., 2012). Entre los escasos estudios realizados en este sentido, destaca el efecto sinérgico de los compuestos de *Allium* spp. con otros antibióticos como ampicilina frente a *S. aureus* (Pillai y cols., 2013), vancomicina en aislados VRE (Jonkers y cols., 1999) o levofloxacino, gentamicina, azitromicina y doxiciclina frente a *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. (Abouelfetouh y Moussa, 2012). *In vitro*, se ha demostrado efecto sinérgico con piperacilina y amikacina, y la aplicación conjunta por vía intravenosa de piperacilina-tazobactam y amikacina junto a extracto de ajo a través de sonda nasogástrica, ha resultado útil en el tratamiento de neumonías asociadas a ventilación mecánica por MDR *P. aeruginosa* (Yalindag-Ozturk y cols., 2011).

Por último, dos de las bacterias sobre las que se han centrado diversos autores para valorar el efecto beneficioso que estas sustancias podrían tener son *M. tuberculosis* y *H. pylori*.

La tuberculosis es una enfermedad ampliamente distribuida a nivel mundial, aunque con diferentes prevalencias y tasas de mortalidad según las regiones geográficas, y en la que el desarrollo de resistencia frente a los antibióticos de uso

habitual (tuberculostáticos de primera y segunda línea) supone un problema grave a escala mundial (Dookie y cols., 2018). Desde que Rao y cols. (1946) demostraron por primera vez que alicina inhibía el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis*, y posteriormente Delaha y Garagusi (1985) confirmaran este efecto en otras especies de este género, se han realizado numerosos estudios *in vitro*, si bien han sido más escasas las investigaciones *in vivo*. Nuevamente, el efecto antibacteriano de alicina es significativamente superior al mostrado por otros compuestos (Viswanathan y cols., 2014). Especialmente importante es la constatación de que el efecto inhibitorio sobre este patógeno también se produce en aislados resistentes a isoniacida y rifampicina, fármacos de primera línea en el tratamiento frente a la tuberculosis y cuya presencia representa un problema terapéutico importante a nivel mundial, incluso frente a aislados resistentes también a antibióticos de segunda línea (XDR *M. tuberculosis*) (Gupta y cols., 2010; Hannan y cols., 2011). Además, el estudio del efecto sinérgico con los fármacos antituberculosos actuales representa un área de gran interés, ya que la toxicidad de estos últimos, fundamentalmente hepática, mejoraría si se pudiese reducir su dosificación. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la CMI de isoniazida y rifampicina se reduce significativamente mediante la adición de extracto acuoso crudo de ajo en los medios (Dhamija y cols., 2010), efecto sinérgico que también se ha demostrado *in vivo* (Gupta y cols., 1999). Por último, otros trabajos han puesto en evidencia que la actividad del extracto de ajo frente a *M. tuberculosis* es posible incluso en un modelo de infección intracelular de macrófagos, lo que lo convierte en un candidato adecuado para un mayor desarrollo como agente antituberculoso (Nair y cols., 2017).

La infección de la mucosa gástrica por *H. pylori* es la causa fundamental de la gastritis crónica, así como de la úlcera gastroduodenal, y constituye un cofactor etiológico primordial en el desarrollo del adenocarcinoma y linfoma gástricos (De Brito y cols., 2019). Tanto alicina, como los aceites esenciales o los extractos de diferentes especies de *Allium* han demostrado *in vitro* actividad significativa frente a esta bacteria (Ayala y cols., 2014; Zardast y cols., 2016), aunque algunos estudios han informado resultados negativos (O'Mahony y cols., 2005). En algunos de los estudios *in vivo*, la viabilidad de las bacterias no se vio afectada, ni tampoco se observó mejoría clínica. En el estudio de Graham y cols. (1999) la inclusión de ajo en la dieta de los pacientes no



demostró una clara disminución de la colonización gástrica por *H. pylori*. El tratamiento con aceite de ajo también dio resultados negativos en el trabajo de McNulty y cols. (2001). La administración conjunta de amoxicilina y omeprazol reduce significativamente la prevalencia y la gravedad histológica de las lesiones gástricas precancerosas, mientras que estos resultados no se observan tras la administración de suplementos de ajo (You y cols., 2006). Yassibaş y cols. (2012) también demostraron que el consumo frecuente de ajo no modifica el riesgo de padecer cáncer gástrico. Por lo tanto, aunque algunos estudios *in vitro* sugieren que las especies del género *Allium*, especialmente el ajo, podrían ser posibles candidatos para tratar y prevenir la infección por *H. pylori* y las enfermedades gástricas asociadas, como el cáncer gástrico, gracias a su efecto antibiótico, la evidencia epidemiológica actual no es suficiente para llegar a una conclusión definitiva sobre este posible efecto beneficioso (Li y cols., 2018).

### **1.2.2. Actividad antifúngica de los compuestos derivados de *Allium* spp.**

Las infecciones fúngicas, especialmente las invasoras, tienen una incidencia y unas tasas de mortalidad muy elevadas, sobre todo en pacientes inmunodeprimidos y hospitalizados con graves enfermedades de base. Entre los sujetos con mayor riesgo de desarrollar una enfermedad fúngica invasora hay que destacar los que reciben quimioterapia antineoplásica, los trasplantados de órgano sólido o de progenitores hematopoyéticos, los enfermos con dosis altas y prolongadas de corticoides u otros inmunosupresores, los pacientes con infección VIH en situación avanzada (SIDA) y sin tratamiento antirretroviral, los intervenidos de cirugía mayor gastrointestinal, los recién nacidos prematuros, los pacientes de edad más avanzada y los enfermos ingresados en unidades de críticos (Pemán y Salavert, 2012).

La mayor parte de estas infecciones están producidas por hongos oportunistas como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis jirovecii* o *Aspergillus* spp. *Candida* spp. es la causa más frecuente de infección sistémica en todas las latitudes geográficas y *Aspergillus* spp. es el principal hongo filamentoso involucrado en las mismas. Otros hongos (*Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* o *Paracoccidioides brasiliensis*) representan también una causa

importante de micosis sistémica en determinadas áreas geográficas en las que estos hongos son endémicos (Pfaller y Diekema, 2010).

Aunque las infecciones del tracto urinario y las infecciones vulvo-vaginales producidas por *Candida* spp., son, a priori, procesos leves, tienen una elevada incidencia entre la población general y pueden ser el origen de infecciones graves e invasoras en pacientes con los factores de riesgo indicados anteriormente (Miceli y cols., 2011). De igual modo, su participación como microbiota endógena, colonizando la piel, las mucosas o el tracto gastrointestinal, es un factor de riesgo para el desarrollo de candidiasis sistémicas en pacientes inmunodeprimidos, hospitalizados o con dispositivos intravasculares (Kucukates y cols., 2016).

Otras infecciones fúngicas como las dermatofitosis o tiñas, producidas por *Microsporum* spp., *Trichophyton* spp. o *Epidermophyton* spp., son procesos también comunes, aunque habitualmente leves (Molina de Diego, 2011). Aunque en este momento las infecciones por estos hongos pueden ser tratadas con una amplia gama de medicamentos tópicos y sistémicos, las infecciones recurrentes, las sobreinfecciones bacterianas y la aparición de resistencias a los antifúngicos, han incrementado el interés por desarrollar nuevas sustancias con actividad frente a los dermatofitos (Mahboubi y Kazempour, 2015).

La incidencia de otros hongos oportunistas emergentes está en claro ascenso. Es el caso de *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., *Rhizomucor* spp., *Absidia* spp. o *Cunninghamella* spp., entre otros. Las enfermedades que causan van desde infecciones localizadas en piel, tejidos blandos, huesos, articulaciones o senos paranasales, hasta infecciones generalizadas, que, aunque infrecuentes, son muy graves, debido al elevado grado de inmunosupresión del paciente afecto y a las escasas opciones de tratamiento debido a su perfil de resistencia a la mayoría de los antifúngicos disponibles (Pemán y Salavert, 2012).

El incremento de las tasas de resistencia a antifúngicos de uso habitual en clínica humana (polienos, azoles y equinocandinas, fundamentalmente), tanto en levaduras como en hongos filamentosos, la elevada toxicidad o las interacciones con otros medicamentos, son algunos de los factores más importantes que actualmente limitan el abordaje preventivo y terapéutico de las micosis, especialmente de las más graves, por lo que es recomendable investigar nuevas terapias antifúngicas alternativas

---

a los tratamientos convencionales, con mecanismos de acción fungicida diferentes y/o sinérgicos, y menos efectos secundarios (Cretella y cols., 2016; Ghahfarokhi y cols., 2004; Meis y cols., 2016).

En este contexto, los compuestos derivados de *Allium* spp. también han mostrado una amplia actividad antifúngica, como destacan numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* frente a levaduras del género *Candida* (Ebrahimy y cols., 2015) o *Cryptococcus* (Davis y cols., 1994), hongos filamentosos del género *Aspergillus* o *Fusarium* (Mylona y cols., 2019; Shadkchan y cols., 2004), dermatofitos (Aala y cols., 2010; Pyun y Shin, 2006), y otros (Burian y cols., 2017; San-Blas y cols., 1989; Sanchez-Mirt y cols., 1993).

Se han propuesto diferentes mecanismos de acción que pueden explicar el efecto antifúngico de estas moléculas, y, nuevamente, la capacidad para modificar enzimas esenciales en el metabolismo fúngico (Gruhlke y cols., 2017), de inducir estrés oxidativo (Gruhlke y cols., 2010), de alterar los lípidos dañando la integridad de las membranas celulares (Li y cols., 2016) y de modificar la expresión de algunos genes (Khodavandi y cols., 2011a), serían los que más directamente se asociarían a daño celular y a la reducción en la capacidad de crecimiento del hongo.

Al igual que ocurre en procariotas, los tiosulfatos (alicina, PTS) y tiosulfonatos (PTSO) tienen la capacidad de inducir muerte de la célula fúngica por mecanismos oxidativos dependientes de la disminución de los niveles de GSH y del incremento del estrés oxidativo a consecuencia de los procesos de modificación de los residuos de cisteína (Gruhlke y cols., 2010). En este sentido, se ha demostrado que alicina oxida los residuos de cisteína presentes en Yap1p, un factor de transcripción que regula la síntesis de GSH en respuesta al estrés oxidativo en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, induciendo la síntesis de, entre otras enzimas, glutatión reductasa, que utiliza NADPH para reducir GSSG a GSH. Por tanto, la modificación de cisteínas de Yap1p también contribuye a incrementar la sensibilidad del hongo al estrés oxidativo (Gruhlke y cols., 2017).

Sin embargo, otros compuestos como los sulfuros de dialilo pueden actuar por otros mecanismos diferentes (Lemar y cols., 2007). En *Candida* spp., la exposición a DADS se ha relacionado con la disminución de la actividad de las enzimas glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (necesaria para mantener los niveles intracelulares de NADPH, que a su vez son necesarios para mantener al glutatión en su forma reducida y que

pueda ejercer su acción protectora), de la glutatión peroxidasa (que oxida GSH a GSSG mediante la incorporación de peróxido de hidrógeno, por lo que su inhibición incrementa los niveles de este) y de la superóxido dismutasa, y con el incremento de la actividad de la glutatión S-transferasa. Aunque no está claro el mecanismo último por el que se producen estos efectos, posiblemente puedan estar relacionados con modificaciones oxidativas de estas enzimas o con el incremento de ROS. En cualquier caso, el efecto final es la depleción de los niveles de GSH y el incremento del estrés oxidativo (Yousuf y cols., 2010).

Aunque la disminución de los niveles de GSH y el incremento de ROS es suficiente para explicar el daño celular en procariotas, que no sufren muerte celular programada o apoptosis, se ha puesto de manifiesto que, en hongos, al igual que ocurre en algunas líneas celulares tumorales (Miron y cols., 2008), la alicina y sus productos derivados también pueden alterar el potencial redox de la célula por un mecanismo citotóxico independiente de glutatión, por lo que ambos mecanismos contribuirían a inducir apoptosis (Gruhlke y cols., 2010). Es posible que la despolarización y permeabilización de las membranas fúngicas (plasmática, mitocondrial, etc.) inducida por estos compuestos a través de la formación de poros, sea responsable de este hecho (Gruhlke y cols., 2015). Así, diversos estudios en *Candida* spp. han puesto de manifiesto que los componentes bioactivos de *Allium* spp. que poseen propiedades lipofílicas pueden destruir la integridad de las membranas celulares fúngicas, incluidas las de orgánulos citoplasmáticos como mitocondrias o vacuolas, lo que resulta en la pérdida de gran parte del contenido citoplasmático y el colapso celular. La liberación de enzimas hidrolíticas como proteasas y nucleasas del interior de las vacuolas se considera un paso crítico para la inducción de la muerte celular (Lemar y cols., 2002, Li y cols., 2016). Seguramente, la presencia de una pared celular fúngica más permeable a estos compuestos que la pared del peptidoglucano de las bacterias, permita este efecto citotóxico a dosis más bajas (Lemar y cols., 2002). En el caso de los hongos filamentosos, es posible que esta degradación de la integridad de la membrana celular, acompañada de la desintegración y degradación de componentes del citoplasma celular, sea la responsable de los cambios observados en la morfología y estructura de las hifas (Ghahfarokhi y cols., 2004). Trabajos realizados en *Trichophyton* spp. revelan que las hifas de este dermatofito pasan de un aspecto

---

recto y con superficie lisa, a una forma más curvada e irregular, con superficie rugosa y granular, que conducen al colapso y rotura de la hifa y finalmente a la inhibición del crecimiento del hongo como consecuencia del daño celular (Aala y cols., 2014).

Es posible que la alteración de las membranas celulares no sea la única causa de los cambios ocasionados en la estructura de las hifas. Algunos estudios han señalado que los compuestos organosulfurados tienen la capacidad de suprimir en *Candida* spp. la producción de pseudohifas, uno de sus principales factores de virulencia, ya que favorecen la penetración del hongo en los tejidos del hospedador y, con ello, las infecciones invasivas. Altas concentraciones de estos productos inhiben la formación de estas estructuras de forma similar a como lo hace fluconazol, aunque, al contrario que éste, en el que este fenómeno se asocia a una disminución de la expresión de los genes *SAP* (*secreted aspartyl proteinases*), que regulan la actividad proteolítica, el mecanismo de acción de alicina y sus derivados está mediado por una reducción en la expresión del gen *SIR2* (*silent information regulator gene*) (Khodavandi y cols., 2011a; Low y cols., 2008). Esto explicaría que, actuando de forma diferente, los derivados de *Allium* y los azoles (cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de ergosterol) tendrían un efecto de tipo sinérgico, como se ha demostrado en estudios sobre actividad *in vitro* de ambos compuestos en *Candida* spp. (Khodavandi y cols., 2010), *Trichophyton* spp. (Pyun y Shin, 2006) o *Microsporum* spp. (Ledezma y cols., 2008).

Otros genes, cuya expresión se ha relacionado con la transición desde el estado de levadura a la formación de pseudohifas en *Candida* spp., son el gen represor transcripcional *TUP1* y los genes específicos que regulan la formación de las hifas *HWP1* (*hyphal cell wall protein*), *ALS1* y *ALS3* (*agglutinin like sequence family*). En presencia de extractos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. hirtifolium*, no sólo se ha demostrado una reducción significativa de la cantidad de levaduras, por alteración del crecimiento celular, sino también una incapacidad de estas para formar pseudohifas a consecuencia de que el nivel de expresión del gen represor transcripcional se regula positivamente, mientras que los genes específicos de las hifas están regulados negativamente (Sadri y cols., 2016).

La capacidad de bloquear la transformación de la forma levaduriforme a filamentosa también se ha demostrado en hongos dimórficos como *P. brasiliensis*. San-

Blas y cols. (1997) evidenciaron que los ajoenos producía una marcada reducción de los niveles celulares de fosfatidilcolina (o lecitina) y un incremento de los de su precursor, fosfatidiletanolamina, posiblemente por un bloqueo de la síntesis del primero por inhibición de la enzima fosfatidiletanolamina metiltransferasa. Este hecho impediría la biosíntesis y la generación de nuevas membranas citoplasmáticas, necesarias para la división celular y para la formación de las hifas.

Al igual que con los azoles, citados previamente, también se ha observado efecto sinérgico con anfotericina B. El principal mecanismo de acción de este antifúngico es la unión al ergosterol de la membrana plasmática fúngica, alterando la permeabilidad de la misma y provocando la muerte celular a consecuencia de la pérdida de potasio y otros iones intracelulares (Baginski y cols., 2005). Además de este mecanismo principal, anfotericina B altera la viabilidad celular mediante la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana plasmática, lo que provoca la ruptura de la misma (Okamoto y cols., 2004) e induce daños en la membrana de las vacuolas intracitoplasmáticas (Ogita y cols., 2006). Como ya se ha comentado, la alicina y sus derivados tienen también la capacidad de alterar la permeabilidad de las membranas celulares fúngicas (Gruhlke y cols., 2015), incluidas las de orgánulos como mitocondrias o vacuolas, favoreciendo la desintegración de estas últimas (Borjihan y cols., 2009; Li y cols., 2016) e interfieren con la enzima alquil-hidroperóxido reductasa 1 (AHP1), que protege de la peroxidación de los fosfolípidos de la membrana, aumentando con ello la susceptibilidad al estrés oxidativo (Ogita y cols., 2005). En conjunto, el efecto provocado por los compuestos organosulfurados de *Allium* incrementa el daño de anfotericina B sobre la célula fúngica, y, en última instancia, favorece la muerte celular.

Un sinergismo similar se ha observado con polimixina B. Aunque se trata de un antibiótico polipeptídico, que se une al lipolisacárido de las bacterias gramnegativas destruyendo la membrana celular, lo que se traduce en un efecto bactericida a consecuencia del incremento de la permeabilidad celular, también puede interactuar con la membrana plasmática fúngica (aunque se desconoce con exactitud por qué su actividad fungicida es mucho menor que su actividad bactericida). Su asociación con alicina ha demostrado un incremento de la actividad fungicida de polimixina B como consecuencia de la suma de los daños ocasionados sobre la estructura de las membranas de las vacuolas citoplasmáticas por la primera y sobre la membrana

citoplasmática por el segundo. La repentina desaparición de la arquitectura de la membrana que rodea a la vacuola también debería dar lugar a un fallo en la protección contra el desequilibrio osmótico citoplasmático, debido a la fuga de potasio intracelular por la acción de la polimixina B sobre la membrana plasmática (Ogita y cols., 2007).

Estos efectos sinérgicos, observados fundamentalmente con antifúngicos del grupo de los azoles y con anfotericina B, sugieren la posibilidad de un uso combinado en el tratamiento de infecciones fúngicas utilizando dosis más bajas de estos fármacos, dada su elevada toxicidad, especialmente de anfotericina B, como se ha comprobado en algunos modelos animales de candidiasis sistémica (An y cols., 2009; Guo y cols., 2010; Low y cols., 2008).

Finalmente, diversos estudios han demostrado la actividad antifúngica de los compuestos derivados de *Allium* spp. en modelos animales (Bokaeian y cols., 2010; Khan y Katiyar, 2000; Thomaz y cols., 2008) e incluso su eficacia en el tratamiento de algunas patologías micóticas en humanos, como la vaginitis candidiásica, donde algunos resultados han sido prometedores (Ebrahimi y cols., 2015), pero otros no (Watson y cols., 2014). Se han evaluado las propiedades antimicóticas de nuevas moléculas de síntesis con mecanismos de citotoxicidad similares, pero con propiedades mejoradas, como la termoestabilidad (Leontiev y cols., 2018). Se están probando nuevas rutas y fórmulas de tratamiento en modelos animales, como la instilación intratraqueal conjunta de aliína y de anticuerpos monoclonales frente a *A. fumigatus* ligados a la enzima aliinasa, que transformaría la aliína en alicina directamente en la superficie del hongo, ejerciendo su acción antifúngica, como posible profilaxis o terapia frente a las infecciones respiratorias por este patógeno (Appel y cols., 2010), o la utilización de un extracto de ajo combinado con nanopartículas de plata para un potente efecto antifúngico (Robles-Martínez y cols., 2019). Sin embargo, a pesar de las evidencias que existen actualmente sobre el potencial terapéutico antifúngico de los compuestos derivados de *Allium* spp., aún son necesarios más estudios *in vitro* e *in vivo* que nos permitan obtener conclusiones definitivas.

### **1.2.3. Actividad antivírica de los compuestos derivados de *Allium* spp.**

La utilización de plantas para el tratamiento de infecciones víricas, como el resfriado común o la gripe, ha sido una constante en todas las civilizaciones y épocas (Zhang y cols., 2008). Aunque no existen evidencias científicas que nos permitan asegurar que el consumo de plantas como el ajo o la cebolla ayude a prevenir, o incluso curar, procesos clínicos como el resfriado común (Lissiman y cols., 2014), un número limitado de trabajos ha puesto de manifiesto la actividad antivírica de los compuestos derivados fundamentalmente de *A. sativum*, *in vitro* e *in vivo*. Se han evaluado los efectos de cápsulas de ajo en polvo, ajo macerado en aceite, aceites de ajo y ajo envejecido, entre otros productos, sobre la capacidad de replicación vírica (Corzo-Martinez y cols., 2007). Los virus del herpes simple tipos 1 y 2, citomegalovirus humano, virus influenza A y B, virus parainfluenza tipo 3, virus de la estomatitis vesicular, rinovirus humano tipo 2, rotavirus o virus de la inmunodeficiencia humana, son algunos de los virus cuya infectividad se ve afectada en presencia de estas sustancias (Chavan y cols., 2016; Guo y cols., 1993; Rees y cols., 1993; Tatarintsev y cols., 1992; Tsai y cols., 1985; Weber y cols., 1992). En general, los resultados obtenidos indican que los compuestos más activos son los organosulfurados, y que la actividad virucida depende fundamentalmente de la interacción de estas moléculas con la envoltura viral, en el caso de los virus envueltos, y de la inhibición de la adsorción o penetración viral en el de los virus desnudos (Weber y cols., 1992). Además, la capacidad de modificar la expresión de algunos genes víricos reguladores (Zhen y cols., 2006) y el incremento de la actividad de las células NK (natural killer), que destruyen las células infectadas por virus (Kandil y cols., 1987), también pueden contribuir al efecto antivírico.

### **1.2.4. Actividad antiparasitaria de los compuestos derivados de *Allium* spp.**

Las enfermedades parasitarias son un problema de salud que afecta a la calidad de vida de gran parte de la población mundial, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Como ejemplo se puede señalar a la malaria, quinta causa de mortalidad en el mundo (Aparicio y cols., 2003). Especialmente en estos países, los problemas de salud que provocan los parásitos tienen que ver con la ausencia de medidas sanitarias adecuadas o con un escaso cumplimiento de las mismas. La Organización Mundial de la



---

Salud recomienda la vacunación, la adopción de estrategias de educación sanitaria y el tratamiento con fármacos antiparasitarios, como medidas necesarias para combatir estas enfermedades producidas por diferentes protozoos y helmintos (World Health Organization, 1987).

Sin embargo, aunque actualmente se dispone de un amplio número de fármacos para su tratamiento, la falta de efectividad de algunos de estos, su toxicidad, o el desarrollo de resistencias a los mismos, constituyen un grave problema de salud mundial (Wolstenholme y cols., 2004). A esta realidad hay que sumarle el hecho de que grandes núcleos de población no tienen acceso a los medicamentos, o el costo de estos es muy elevado (Aparicio y cols., 2003). La búsqueda de nuevos antiparasitarios más potentes, menos tóxicos, de mayor espectro de actividad y de fácil acceso para la población, es un objetivo prioritario (Fairlamb, 2003). Por ese motivo, basándose en la medicina tradicional, en la que el uso de plantas ha sido habitualmente aceptado por su bajo costo, la presencia de efectos secundarios es menos frecuente y existe una elevada disponibilidad y riqueza de principios activos (Foroutan-Rad y cols., 2017), desde el año 2000 los organismos sanitarios internacionales recomiendan evaluar los posibles usos terapéuticos de productos derivados de plantas (Tagboto y Townson, 2001).

Siguiendo estas iniciativas, diversos estudios han demostrado, *in vitro* e *in vivo* (estos últimos frecuentemente en modelos animales), la actividad antiparasitaria de los compuestos derivados de *Allium* spp. Protozoos intestinales como *Blastocystis hominis* (Yakoob y cols., 2011), *Giardia* spp., *Entamoeba* spp., (Lun y cols., 1994; Mirelman y cols., 1987), *Cryptosporidium* spp. (Abouel-Nour y cols., 2016); protozoos hemáticos como *Trypanosoma* spp. (Lun y cols., 1994), *Leishmania* spp. (Saleheen y cols., 2004), *Plasmodium* spp. (Waag y cols., 2010), *Babesia* spp. (Salama y cols., 2014), o protozoos urogenitales como *Trichomonas vaginalis* (Azimi y cols., 2011); al igual que helmintos como *Taenia saginata* (Mohamoud y El Alfy, 2003), *Hymenolepis nana* (Soffar y Mokhtar, 1991), *Echinococcus granulosus* (Sadjjadi y cols., 2008), *Schistosoma* spp. (Lima y cols., 2011) o *Trichinella spiralis* (Bany y cols., 2003), son algunos de los ejemplos de parásitos patógenos humanos que se han mostrado sensibles a estas sustancias. Además de su capacidad directa para eliminar al parásito, son capaces de inducir la respuesta inmunológica del hospedador frente a este (Sutton y Haik, 1999).

Nuevamente, los compuestos más ampliamente estudiados han sido los organosulfurados. La capacidad de alicina y otros tiosulfatos para inhibir enzimas con grupos tiol es el principal mecanismo de acción frente a protozoos (Ankri y Mirelman, 1999). La inhibición de cisteín-proteasas en *E. histolytica*, *Plasmodium* spp., *T. brucei* (Ankri y cols., 1997; Waag y cols., 2010) y *Giardia* spp. (Argüello-García y cols., 2018) ha demostrado disminuir la virulencia de estos parásitos, y podría ser responsable también del efecto anti-leishmaniosis de la alicina (Foroutan-Rad y cols., 2017). La actividad antiparasitaria y antiproliferativa del ajoeno también se atribuye a varios efectos funcionales sobre las enzimas clave en el metabolismo antioxidante del tiol (Gallwitz y cols., 1999). Además, el ajoeno se ha relacionado con la alteración de las membranas celulares en *Leishmania* spp. (Ledezma y cols., 2002) y *Trypanosoma cruzi* (Urbina y cols., 1993). Sin embargo, la acción sobre los helmintos es menos conocida que frente a los protozoos, posiblemente debido a que el modo de acción no sea matar a los nematodos, sino estimular el sistema inmunológico del huésped contra los parásitos (Buono y cols., 2019).

En cualquier caso, tanto la capacidad de los diferentes compuestos derivados de *Allium* spp. de inducir apoptosis y destruir los parásitos, como la mejora de las respuestas inmunes innatas y adaptativas del hospedador frente a estos, revelan la utilidad potencial de los compuestos bioactivos de estas plantas (Cortés y cols., 2017; Feng y cols., 2012; Foroutan-Rad y cols., 2017; Ghazanfari y cols., 2000; Liu y cols., 2009; Nantz y cols., 2012).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS





Como se ha comentado previamente, existen un gran número de estudios que evidencian la actividad antibacteriana, antifúngica, antivírica y antiparasitaria de los compuestos organosulfurados derivados de diferentes especies de *Allium* spp. En correspondencia con la necesidad de descubrir nuevos productos naturales con potencial antimicrobiano, la actividad de estas sustancias puede considerarse prometedora.

Dos de estos compuestos, PTS y PTSO, representan una alternativa interesante. Ambas sustancias han demostrado poseer actividad antimicrobiana frente a microorganismos de origen animal y patógenos transmitidos por los alimentos. Consideramos que el potencial antimicrobiano de estas moléculas también debe ser ampliamente explorado frente a microorganismos patógenos humanos. PTS y PTSO pueden ser una buena alternativa de origen natural en la lucha contra las principales causas infecciosas en patología humana. Dos grandes ventajas que facilitarían su uso clínico son que estas sustancias se perciben por la población como inofensivas, ya que se obtienen a partir de un alimento natural como la cebolla, que se consume ampliamente como parte de la dieta en la mayoría de culturas, y que, como ya se ha comentado, diversos estudios sobre líneas celulares humanas han notificado su baja toxicidad.

Por tanto, el uso de compuestos naturales como PTS y PTSO, que puedan administrarse sin grandes restricciones, brinda la posibilidad de su utilización en el tratamiento de patologías infecciosas específicas. Es el caso del tratamiento de infecciones como las del tracto urinario, las gastrointestinales, las respiratorias, las de piel y tejidos blandos, etc., y, muy especialmente, aquellas causadas por microorganismos multirresistentes. Además, ambas sustancias son volátiles, por lo que el estudio de su capacidad antimicrobiana a través de su fase gaseosa o vapor tendría un gran interés para valorar su posible uso en el tratamiento de patógenos respiratorios que pudieran ser sensibles a las mismas, en tanto que puedan alcanzar concentraciones adecuadas en el epitelio pulmonar si se administraran por vía inhalatoria.

En definitiva, la selección de nuevas moléculas con propiedades antimicrobianas, como podrían ser PTS y PTSO, debe realizarse bajo las premisas de que sean activas frente a patógenos humanos, que accedan con facilidad al foco de

infección y que sean potencialmente inocuos. Todo ello solo se podrá demostrar mediante la realización de diferentes estudios, *in vitro* e *in vivo*, que permitan evaluar todas esas circunstancias.

Por todo lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este trabajo fue comparar la actividad antimicrobiana *in vitro* de PTS y PTSO con la de otros antimicrobianos de uso habitual en clínica, frente a microorganismos patógenos humanos. Para ello, se desarrollaron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y las concentraciones mínimas bactericida (CMB) y fungicida (CMF) de PTS y PTSO frente a una selección de aislados clínicos de bacterias grampositivas, gramnegativas y levaduras.
2. Comparar la actividad *in vitro* de estas sustancias de origen natural con la de diversos antibióticos y antifúngicos de uso habitual en clínica humana, para establecer posibles utilidades como alternativas terapéuticas.
3. Evaluar *in vitro* la capacidad de la fase gaseosa de PTS y PTSO de inhibir el crecimiento de diversas bacterias y levaduras tras la exposición al vapor.

### **3. MATERIAL Y MÉTODO**







### 3.1. SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

#### 3.1.1. Sensibilidad antimicrobiana mediante microdilución

Se estudió la sensibilidad antimicrobiana de 267 cocos grampositivos, 212 bacilos gramnegativos y 203 levaduras del género *Candida* frente a diferentes antibióticos, antifúngicos, PTS y PTSO, mediante una técnica estandarizada de microdilución para la determinación de la CMI. Todos los aislados procedieron del cultivo de 682 muestras clínicas diferentes analizadas en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España) en el curso de su actividad clínica asistencial para el diagnóstico microbiológico de infecciones.

Los estudios de identificación y sensibilidad previa de los aislados bacterianos se realizaron mediante los sistemas WIDER (Francisco Soria Melguizo, Madrid, España) o MicroScan (Siemens Healthcare Diagnostics, Madrid, España). En el caso de las levaduras, todas las colonias crecidas en medio CHROMagar Orientation (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EEUU) con aspecto compatible con levadura fueron subcultivadas en medio CHROMagar Candida (Becton Dickinson). Además del subcultivo en este medio, para la identificación a nivel de especie se emplearon la prueba de filamentación y los sistemas ASM Vitek (bioMérieux, Madrid, España) o MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Billerica, EEUU). En ambos casos se siguieron procedimientos previamente descritos (Heras-Cañas y cols., 2015; Sorlózano y cols., 2014).

Además, siguiendo las recomendaciones del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) algunos de los mecanismos de resistencia bacteriana detectados mediante sistemas automatizados fueron confirmados mediante procedimientos fenotípicos (CLSI, 2016). La presencia de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) se confirmó mediante el método de difusión con discos que contenían cefotaxima (30 µg), cefotaxima/ácido clavulánico (30/10 µg), ceftazidima (30 µg) y ceftazidima/ácido clavulánico (30/10 µg). Así mismo, la resistencia a meticilina en *S. aureus* se confirmó mediante el procedimiento de difusión en agar Mueller-Hinton con discos de cefoxitina (30 µg).

Finalmente, los resultados obtenidos a través de estos procesos de identificación y estudio de sensibilidad permitió la selección de los 479 aislados bacterianos en base a la presencia de resistencia a, al menos, un grupo de antibióticos

comúnmente utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos (tabla 1): todos los aislados de *S. aureus* fueron resistentes a meticilina, todos los de *E. faecalis* fueron resistentes a fluoroquinolonas, todos los de *S. agalactiae* fueron resistentes a macrólidos o fluoroquinolonas, y todos los bacilos gramnegativos fueron resistentes a betalactámicos, fluoroquinolonas o aminoglucósidos. En el caso de las levaduras no se siguió ningún criterio de selección basado en la presencia de resistencias antifúngicas. Todos los aislados microbianos seleccionados se conservaron a -20°C hasta la realización de los ensayos de sensibilidad.

**Tabla 1.** Distribución, según la especie, de los 682 microorganismos en los que se estudió la sensibilidad antimicrobiana mediante un procedimiento de microdilución.

<b>Cocos grampositivos (n=267)</b>		
<b>Estafilococos</b>	<b>Enterococos</b>	<b>Estreptococos</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=112)	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=54)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (n=101)
<b>Bacilos gramnegativos (n=212)</b>		<b>Levaduras (n=203)</b>
<b>Enterobacterias (n=151)</b>	<b>BGNMF (n=61)</b>	
<i>Citrobacter amalonaticus</i> (n=1)	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> (n=1)	<i>Candida albicans</i> (n=83)
<i>Enterobacter cloacae</i> (n=7)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (n=9)	<i>Candida glabrata</i> (n=73)
<i>Escherichia coli</i> (n=26)	<i>Aeromonas hydrophila</i> (n=7)	<i>Candida krusei</i> (n=12)
<i>Escherichia coli</i> BLEE (n=42)	<i>Comamonas acidovorans</i> (n=1)	<i>Candida tropicalis</i> (n=35)
<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=1)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=40)	
<i>Klebsiella oxytoca</i> BLEE (n=5)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=3)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=21)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE (n=12)		
<i>Kluyvera cryocrescens</i> (n=1)		
<i>Proteus vulgaris</i> (n=1)		
<i>Providencia stuartii</i> (n=2)		
<i>Salmonella enterica</i> (n=15)		
<i>Yersinia enterocolitica</i> (n=17)		

n: número de aislados

BGNMF: Bacilos gramnegativos no fermentadores de la glucosa

BLEE: aislado productor de betalactamasas de espectro extendido

En la tabla 2 se muestra, para el conjunto de todos estos aislados, la muestra clínica a partir de la cual se obtuvieron.

**Tabla 2.** Distribución de los 682 microorganismos según el tipo de muestra clínica de la que se aislaron.

Microorganismo	Muestra clínica					
	Espudo	Exudado de herida	Heces	Orina	Secreción vagino-rectal	Otras*
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>				1		
<i>Acinetobacter baumannii</i>				9		
<i>Aeromonas caviae</i>			1			
<i>Aeromonas hydrophila</i>			6			
<i>Candida albicans</i>				83		
<i>Candida glabrata</i>				73		
<i>Candida krusei</i>				12		
<i>Candida tropicalis</i>				35		
<i>Citrobacter amalonaticus</i>				1		
<i>Comamonas acidovorans</i>				1		
<i>Enterobacter cloacae</i>				7		
<i>Enterococcus faecalis</i>		21		30		3
<i>Escherichia coli</i>				26		
<i>Escherichia coli</i> BLEE		1		41		
<i>Klebsiella oxytoca</i>				1		
<i>Klebsiella oxytoca</i> BLEE				5		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				21		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BLEE				12		
<i>Kluyvera cryocrescens</i>				1		
<i>Proteus vulgaris</i>				1		
<i>Providencia stuartii</i>				2		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				40		
<i>Salmonella enterica</i>			15			
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	74		4		9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>				3		
<i>Streptococcus agalactiae</i>		3		30	68	
<i>Yersinia enterocolitica</i>			17			

\*Absceso: 1; catéter: 1; hemocultivo: 3; lavado nasal: 1; líquido peritoneal: 1; secreción faríngea: 4; secreción ótica: 1

### 3.1.2. Sensibilidad microbiana por exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO

Se estudió la sensibilidad microbiana tras exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO de 7 microorganismos de la colección ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, EEUU):

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- *Candida albicans* ATCC 200955
- *Candida krusei* ATCC 6258

### 3.2. SELECCIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS, PTS Y PTSO

Para los estudios de sensibilidad a los diferentes antimicrobianos (antibióticos y antifúngicos) mediante la técnica de microdilución, se emplearon diferentes principios activos o sustancias valoradas suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Todos ellos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3.** Antimicrobianos empleados en los ensayos de sensibilidad mediante técnica de microdilución.

Enterobacterias	BGNF	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. agalactiae</i>	Levaduras
Amikacina	Amikacina	Clindamicina	Ampicilina	Ampicilina	Anfotericina B
Amoxicilina-clavulánico	Cefepime	Cotrimoxazol	Daptomicina	Clindamicina	Anidulafungina
Cefepime	Ceftazidima	Daptomicina	Levofloxacino	Daptomicina	Caspofungina
Cefotaxima	Ciprofloxacino	Eritromicina	Linezolid	Eritromicina	Fluconazol
Cefoxitina	Gentamicina	Gentamicina	Teicoplanina	Levofloxacino	Micafungina
Ceftazidima	Imipenem	Levofloxacino	Vancomicina	Linezolid	Voriconazol
Cefuroxima	Meropenem	Linezolid		Vancomicina	
Ciprofloxacino	Piperacilina-tazobactam	Rifampicina			
Cotrimoxazol	Tobramicina	Teicoplanina			
Gentamicina		Tobramicina			
Imipenem		Vancomicina			
Meropenem					
Nitrofurantoína					
Piperacilina-tazobactam					
Tobramicina					

Tanto para el estudio de la sensibilidad microbiana a PTS y PTSO mediante la técnica de microdilución, como por exposición a su fase gaseosa, ambas sustancias fueron suministradas por DOMCA S.A. (Alhendín, Granada, España) disueltas en Tween-80 a una concentración de 500.000 mg/L y una pureza del 95%. Todas las sustancias (antimicrobianos, PTS y PTSO) se conservaron refrigeradas, siguiendo las indicaciones del proveedor, hasta la realización de los diferentes ensayos.

### 3.3. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA MEDIANTE MICRODILUCIÓN

Siguiendo las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2016), se realizó un ensayo de microdilución de los 479 aislados bacterianos en caldo Mueller-Hinton ajustado en la concentración de cationes divalentes calcio y magnesio (*Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth*, CAMHB) a una concentración final de 20-25 mg/L de Ca<sup>2+</sup> y de 10-12,5 mg/L de Mg<sup>2+</sup>, con un pH final de 7,3±0,1. Para la realización del procedimiento de microdilución con daptomicina se ajustó la concentración de calcio del medio Mueller-Hinton a 50 mg/L.

Cada ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo en U, con una concentración final de la suspensión de células bacterianas igual a  $1 \times 10^5$  Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml) y en un volumen final de 100  $\mu$ l en cada pocillo. En cada una de las 8 filas de pocillos que contiene una placa se incluyeron 11 diluciones dobles seriadas y un pocillo de control negativo (que sólo contenía medio de cultivo). Los controles positivos (que sólo contenían suspensión bacteriana en medio de cultivo, sin antibióticos) se agregaron de forma independiente en una placa separada.

De forma más detallada, el procedimiento se realizó atendiendo al siguiente protocolo:

1. Se preparó CAMHB (Becton Dickinson) siguiendo las indicaciones del fabricante. El medio se autoclavó a 121 °C durante 10 minutos y tras dejarlo enfriar se repartió en tubos estériles, que se conservaron refrigerados hasta su uso.
2. Una vez seleccionados los microorganismos a estudiar (tabla 1) y los antibióticos a ensayar (tabla 2), se establecieron los puntos de corte para definir las categorías clínicas de sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de cada especie bacteriana respecto a cada antibiótico, según los criterios definidos por el CLSI (CLSI, 2016). De modo general, se define a un aislado clínico bacteriano como “sensible” cuando la bacteria es inhibida por el antibiótico a dosis terapéuticas habituales, como “intermedio” cuando la bacteria es inhibida por concentraciones mayores del antibiótico, si su toxicidad o vía de administración lo permiten, y como “resistente” cuando la bacteria no se inhibe por altas concentraciones del antibiótico. En las tablas 4 a 8 se muestran los puntos de corte para la categorización clínica de los diferentes grupos de bacterias empleados en el presente trabajo.

**Tabla 4.** Puntos de corte (en mg/L) para la categorización clínica de enterobacterias (CLSI, 2016).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina*	$\geq 64$	32	$\leq 16$
Amoxicilina-clavulánico	$\geq 32/16$	16/8	$\leq 8/4$
Cefepime	$\geq 16$	4 - 8 (SDD)	$\leq 2$
Cefotaxima	$\geq 4$	2	$\leq 1$
Cefoxitina	$\geq 32$	16	$\leq 8$
Ceftazidima	$\geq 16$	8	$\leq 4$
Cefuroxima (para administración oral)	$\geq 32$	8 - 16	$\leq 4$

**Tabla 4.** Continuación

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Ciprofloxacino	≥ 4	2	≤ 1
Ciprofloxacino (para salmonelas)	≥ 1	0,12 - 0,5	≤ 0,06
Cotrimoxazol	≥ 4/76	-	≤ 2/38
Gentamicina*	≥ 16	8	≤ 4
Imipenem	≥ 4	2	≤ 1
Meropenem	≥ 4	2	≤ 1
Nitrofurantoina	≥ 128	64	≤ 32
Piperacilina-tazobactam	≥ 128/4	32/4 - 64/4	≤ 16/4
Tobramicina*	≥ 16	8	≤ 4

\*En *Salmonella* spp. y *Shigella* spp., los aminoglucósidos pueden parecer activos *in vitro* pero no son efectivos clínicamente y no deben notificarse como susceptibles (CLSI, 2016)

SDD: susceptible-dose dependent (CLSI, 2016)

**Tabla 5.** Puntos de corte (en mg/L) para la categorización clínica de BGNNF (CLSI, 2016).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina	≥ 64	32	≤ 16
Cefepime	≥ 32	16	≤ 8
Ceftazidima	≥ 32	16	≤ 8
Ciprofloxacino	≥ 4	2	≤ 1
Gentamicina	≥ 16	8	≤ 4
Imipenem	≥ 8	4	≤ 2
Meropenem	≥ 8	4	≤ 2
Piperacilina-tazobactam	≥ 128/4	32/4 - 64/4	≤ 16/4
Tobramicina	≥ 16	8	≤ 4

**Tabla 6.** Puntos de corte (en mg/L) para la categorización clínica de *S. aureus* (CLSI, 2016).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Clindamicina	≥ 4	2 - 1	≤ 0.5
Cotrimoxazol	≥ 4/76	-	≤ 2/38
Daptomicina	-	-	≤ 1
Eritromicina	≥ 8	4 - 1	≤ 0.5
Gentamicina	≥ 16	8	≤ 4
Levofloxacino	≥ 4	2	≤ 1
Linezolid	≥ 8	-	≤ 4
Rifampicina	≥ 4	2	≤ 1
Teicoplanina	≥ 32	16	≤ 8
Tobramicina	≥ 16	8	≤ 4
Vancomicina	≥ 16	8 - 4	≤ 2

**Tabla 7.** Puntos de corte (en mg/L) para la categorización clínica de *E. faecalis* (CLSI, 2016).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	≥ 16	-	≤ 8
Daptomicina	-	-	≤ 4
Levofloxacino	≥ 8	4	≤ 2
Linezolid	≥ 8	4	≤ 2
Teicoplanina	≥ 32	16	≤ 8
Vancomicina	≥ 32	8 - 16	≤ 4

**Tabla 8.** Puntos de corte (en mg/L) para la categorización clínica de *S. agalactiae* (CLSI, 2016).

Antibiótico	Resistente	Intermedio	Sensible
Ampicilina	-	-	≤ 0,25
Clindamicina	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Daptomicina	-	-	≤ 1
Eritromicina	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Levofloxacino	≥ 8	4	≤ 2
Linezolid	-	-	≤ 2
Vancomicina	-	-	≤ 1

3. A continuación se definieron las 11 diluciones dobles seriadas que se emplearían con cada antibiótico y cada microorganismo. Dichas diluciones debían contener los puntos de corte definidos previamente, que nos indicasen, tras el ensayo, si el aislado era sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) respecto a cada antibiótico. Aunque el CLSI no define los puntos de corte para PTS ni PTSO, al no tratarse de sustancias con actividad antimicrobiana contrastada, realizar el ensayo en las mismas condiciones que los antibióticos nos permitió hacer comparaciones con ellos. Por ese motivo, en las tablas 9 a 13 se muestran las concentraciones empleadas de cada antibiótico, PTS y PTSO, frente a los diferentes grupos de bacterias.

**Tabla 9.** Diluciones dobles seriadas (en mg/L) de los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, ensayados frente a enterobacterias.

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Amikacina</b>										
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<b>Amoxicilina-clavulánico</b>										
256/128	128/64	64/32	32/16	16/8	8/4	4/2	2/1	1/0,5	0,5/0,25	0,25/0,125
<b>Cefepime</b>										
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
<b>Cefotaxima</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Cefoxitina</b>										
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<b>Ceftazidima</b>										
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<b>Cefuroxima</b>										
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<b>Ciprofloxacino</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Cotrimoxazol</b>										
64/1216	32/608	16/304	8/152	4/76	2/38	1/19	0,5/9,5	0,25/4,75	0,125/2,375	0,06/1,1875
<b>Gentamicina</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

**Tabla 9.** Continuación.

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Imipenem</b>										
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016
<b>Meropenem</b>										
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016
<b>Nitrofurantoína</b>										
1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1
<b>Piperacilina-tazobactam</b>										
512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4
<b>Tobramicina</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>PTS</b>										
2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
<b>PTSO</b>										
2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2

**Tabla 10.** Diluciones dobles seriadas (en mg/L) de los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, ensayados frente a BGNNF.

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Amikacina</b>										
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<b>Cefepime</b>										
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
<b>Ceftazidima</b>										
512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5
<b>Ciprofloxacino</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Gentamicina</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Imipenem</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Meropenem</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Piperacilina-tazobactam</b>										
512/4	256/4	128/4	64/4	32/4	16/4	8/4	4/4	2/4	1/4	0,5/4
<b>Tobramicina</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>PTS</b>										
2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
<b>PTSO</b>										
2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2



**Tabla 11.** Diluciones dobles seriadas (en mg/L) de los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, ensayados frente a *S. aureus*.

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Clindamicina</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Cotrimoxazol</b>										
64/1216	32/608	16/304	8/152	4/76	2/38	1/19	0,5/9,5	0,25/4,75	0,125/2,375	0,06/1,1875
<b>Daptomicina</b>										
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Eritromicina</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Gentamicina</b>										
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
<b>Levofloxacino</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Linezolid</b>										
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>Rifampicina</b>										
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>Teicoplanina</b>										
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>Tobramicina</b>										
256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
<b>Vancomicina</b>										
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015
<b>PTS</b>										
2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4	2
<b>PTSO</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

**Tabla 12.** Diluciones dobles seriadas (en mg/L) de los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, ensayados frente a *E. faecalis*.

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Ampicilina</b>										
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>Daptomicina</b>										
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Levofloxacino</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Linezolid</b>										
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Teicoplanina</b>										
32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>Vancomicina</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>PTS</b>										
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4
<b>PTSO</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

**Tabla 13.** Diluciones dobles seriadas (en mg/L) de los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, ensayados frente a *S. agalatae*.

Número del pocillo										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Ampicilina</b>										
4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004
<b>Clindamicina</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Daptomicina</b>										
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Eritromicina</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Levofloxacino</b>										
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06
<b>Linezolid</b>										
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Vancomicina</b>										
8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>PTS</b>										
4096	2048	1024	512	256	128	64	32	16	8	4
<b>PTSO</b>										
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125

4. Se prepararon las concentraciones de stock de cada antibiótico, PTS y PTSO, en CAMHB (tabla 14). Para ello, en primer lugar se disolvió cada sustancia en la cantidad mínima necesaria del disolvente indicado por el proveedor y posteriormente se diluyó en CAMHB hasta alcanzar la concentración definitiva. Todas las alícuotas se conservaron a -20°C hasta su utilización. Los disolventes empleados fueron:

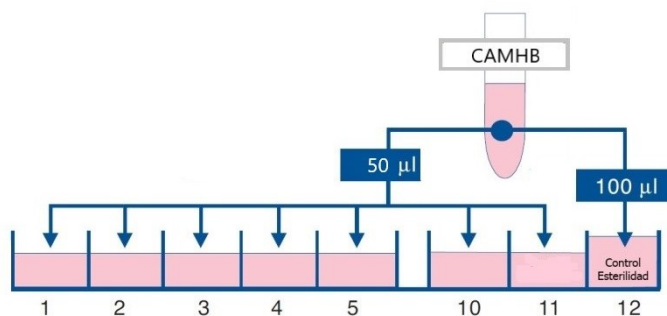
- Disolución en agua: amikacina, cefotaxima, cefoxitina, ciprofloxacino, clindamicina, cotrimoxazol, daptomicina, gentamicina, levofloxacino, linezolid, meropenem, piperacilina, tazobactam, teicoplanina, tobramicina y vancomicina.
- Disolución en tampón fosfato (pH 6,0; 0,1 M): amoxicilina, ampicilina, cefepime, cefuroxima, clavulánico, imipenem, nitrofurantoína.
- Disolución en metanol: eritromicina, rifampicina.
- Disolución en tween-80: PTS, PTSO.

De esta forma, en el pocillo más concentrado, la cantidad final de tampón fosfato, metanol o tween-80, en los casos en que fueron utilizados como disolventes, fue inferior al 1%.

**Tabla 14.** Concentración (en mg/L) de los antibióticos, PTS y PTSO, en stock, para los ensayos de sensibilidad mediante microdilución.

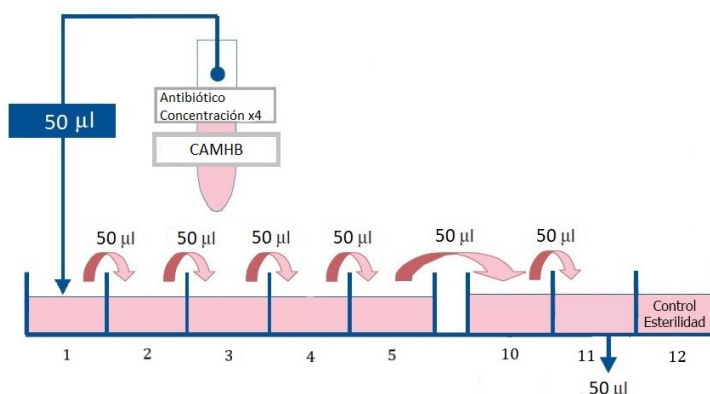
Sustancia	Enterobacterias	BGNMF	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. agalactiae</i>
Amikacina	2048	2048			
Amoxicilina-clavulánico	1024/512				
Ampicilina				128	16
Cefepime	1024	1024			
Cefotaxima	512				
Cefoxitina	2048				
Ceftazidima	2048	2048			
Cefuroxima	2048				
Ciprofloxacino	512	512			
Clindamicina			256		256
Cotrimoxazol	256/4864		256/4864		
Daptomicina			32	32	32
Eritromicina			256		256
Gentamicina	512	512	1024		
Imipenem	64	512			
Levofloxacino			256	256	256
Linezolid			128	32	32
Meropenem	64	512			
Nitrofurantoína	4096				
Piperacilina	2048	2048			
Rifampicina			128		
Tazobactam	40	40			
Teicoplanina			128	128	
Tobramicina	512	512	1024		
Vancomicina			64	256	32
PTS	8192	8192	8192	16384	16384
PTSO	8192	8192	512	512	512

- Se incubaron las bacterias en placas de agar sangre durante 24 horas a  $36\pm 1^\circ\text{C}$ . Al día siguiente, y tras comprobar que el aislado crecía en cultivo monomicrobiano, para descartar posibles contaminaciones, se resuspendieron varias colonias en 2 ml de suero fisiológico hasta obtener una turbidez coincidente con el patrón 0,5 de MacFarland (equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml, en el caso de bacterias).
- Para cada bacteria se atemperó un tubo que contuviese CAMHB y se realizó una dilución 1/1000 del microorganismo suspendido en el suero fisiológico en el medio de cultivo.
- En los pocillos 1 a 11 de cada placa de microtitulación se dispensaron 50  $\mu\text{l}$  de CAMHB y 100  $\mu\text{l}$  en el pocillo 12 (figura 4).



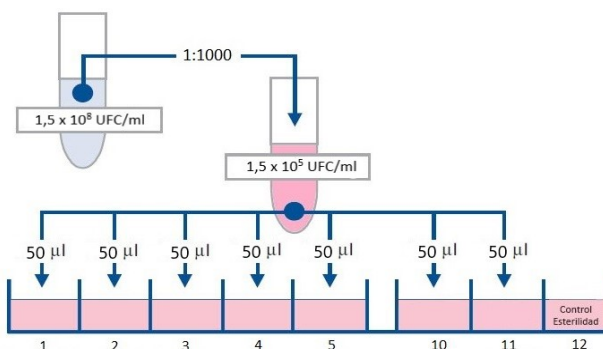
**Figura 4.** Adición del medio de cultivo CAMHB en las placas de microtitulación (adaptado de Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2007).

8. Posteriormente, en el primer pocillo de cada fila, se dispensaron 50 µl del antibiótico, PTS o PTSO, diluido en CAMHB a la concentración de stock previamente preparada (tabla 14). Tras mezclar para homogeneizar el contenido del pocillo, se tomaron 50 µl y se dispensaron en el segundo pocillo de la fila. Tras mezclar, se recogieron 50 µl y se dispensaron en el siguiente pocillo, y así, sucesivamente, hasta llegar al pocillo número 11, del cual se desecharon 50 µl (figura 5). De esta forma, se diluyó el principio activo en los sucesivos pocillos, obteniendo, en cada uno de ellos, una dilución que fue el doble de la del pocillo anterior (diluciones dobles seriadas). En el caso de las filas en las que se ensayó piperacilina-tazobactam, en los pocillos 1 al 11, además de añadir piperacilina según el procedimiento descrito, se añadieron en todos los pocillos 10 µl de tazobactam a una concentración de 40 mg/L para poder alcanzar la concentración final necesaria de esta combinación de antibióticos.



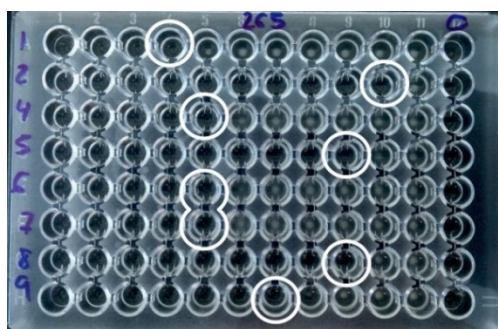
**Figura 5.** Adición del antibiótico, PTS o PTSO, y obtención de las diluciones dobles seriadas de cada uno (adaptado de Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2007).

9. Una vez realizadas todas las diluciones, se dispensaron 50  $\mu$ l de CAMHB con la bacteria suspendida en los pocillos del 1 al 11 (figura 6). De esta forma, en cada pocillo, el volumen final obtenido fue de 100  $\mu$ l (110  $\mu$ l en el pocillo que contenía piperacilina-tazobactam), y la concentración final esperada según las tablas 9 a 13.



**Figura 6.** Adición de la misma cantidad de bacterias en todos los pocillos (adaptado de Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2007).

10. Tras su inoculación, las placas se incubaron a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas, apiladas en torres de 5 y tapando la superior para evitar la evaporación del contenido.
11. En cada ensayo se determinó el valor de CMI como la menor concentración de antibiótico, PTS o PTSO, que inhibió por completo el crecimiento visible de la bacteria en el medio de cultivo tras la incubación de las placas (figura 7). Los aislados se consideraron sensibles, intermedios o resistentes de acuerdo con las recomendaciones del CLSI (CLSI, 2016). Se calcularon los valores de  $\text{CMI}_{50}$  y  $\text{CMI}_{90}$  como la concentración más baja del antibiótico, PTS o PTSO, a la que se inhibió el crecimiento bacteriano en el 50% y el 90% de los aislados de cada grupo, respectivamente.



**Figura 7.** Determinación del valor de CMI en una placa de microtitulación tras la incubación pertinente. Se puede observar el crecimiento bacteriano en los pocillos con concentraciones más bajas y la ausencia de crecimiento visible a partir de un determinado pocillo. Este, marcado con círculos, indica el pocillo correspondiente al valor de la CMI de cada antibiótico (identificados estos con números en el margen izquierdo). La columna 12 corresponde al control negativo (ausencia de crecimiento bacteriano).

12. Por último, se determinó el valor de la concentración mínima bactericida (CMB) para cada antibiótico, PTS o PTSO, según recomendaciones previamente publicadas (García-Rodríguez y cols., 2000). Se consideró como CMB la menor concentración de antibiótico que mató el 99,9% del inóculo original, lo que en la práctica se consideró como la concentración más baja de sustancia que, tras subcultivo en medio con agar, no generó crecimiento bacteriano alguno. Para ello, una vez determinada la CMI de cada principio activo sobre cada bacteria, se homogeneizó el contenido de los pocillos (con pipeta, mezclando de 8 a 10 veces) y se sembraron 100  $\mu$ l (es decir, todo el contenido) de 3-4 pocillos en los que no se observó crecimiento bacteriano (el correspondiente al valor de la CMI y posteriores) en agar Columbia base. Las placas de agar se incubaron durante 24 horas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  y se observaron al día siguiente. Los valores de  $\text{CMB}_{50}$  y  $\text{CMB}_{90}$  se definieron como la concentración más baja del antibiótico, PTS o PTSO, que mató al 50% y 90% de los aislados de cada grupo bacteriano, respectivamente. Se estimó que PTS y PTSO tuvieron efecto bacteriostático cuando la relación CMB/CMI fue superior a 2, y efecto bactericida cuando la relación CMB/CMI se situó entre 2 y 1.
13. Siguiendo las recomendaciones del CLSI, para el control de los procedimientos en los estudios de sensibilidad antibiótica mediante microdilución se usaron las cepas de referencia *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213 y *E. faecalis* ATCC 29212 (CLSI, 2016).

#### **3.4. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA MEDIANTE MICRODILUCIÓN**

De igual modo que en el caso anterior, se realizó un ensayo de microdilución de las 203 levaduras, siguiendo las recomendaciones del CLSI para este microorganismo (CLSI, 2012). Cada ensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos con fondo plano, con una concentración final de la suspensión de levaduras igual a  $0,5-2,5 \times 10^3$  células/ml y en un volumen final de 200  $\mu$ l de medio de cultivo, en cada pocillo. En cada una de las filas de pocillos que contiene una placa se incluyeron 10 diluciones dobles seriadas de cada antifúngico, PTS y PTSO. En este caso, los pocillos 11 y 12 de cada fila se utilizaron para el control positivo y negativo, respectivamente.

De forma más detallada, el procedimiento se realizó atendiendo al siguiente protocolo:

1. Como medio de cultivo se utilizó RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico (Sigma-Aldrich), suplementado con glucosa al 0,2% y ajustado con ácido morfolino propano sulfónico (0,165 M) a un pH = 7,0±0,1.
2. Se establecieron los puntos de corte para definir las categorías clínicas de cada levadura respecto a cada antifúngico (tabla 15), según los criterios definidos por el CLSI (CLSI, 2017) o EUCAST (EUCAST, 2017).

**Tabla 15.** Puntos de corte (en mg/L) para la categorización clínica de levaduras (CLSI, 2017; EUCAST, 2017).

Antifúngico	Especie	Resistente	Intermedio	SDD	Sensible
Anfotericina B <sup>a</sup>	<i>C. albicans</i>	>1	-	-	≤1
	<i>C. glabrata</i>	>1	-	-	≤1
	<i>C. tropicalis</i>	>1	-	-	≤1
	<i>C. krusei</i>	>1	-	-	≤1
Anidulafungina <sup>b</sup>	<i>C. albicans</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
	<i>C. glabrata</i>	≥0,5	0,25	-	≤0,12
	<i>C. tropicalis</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
	<i>C. krusei</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
Caspofungina <sup>b</sup>	<i>C. albicans</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
	<i>C. glabrata</i>	≥0,5	0,25	-	≤0,12
	<i>C. tropicalis</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
	<i>C. krusei</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
Fluconazol	<i>C. albicans</i>	≥8	-	4	≤2
	<i>C. glabrata</i>	≥64	-	≤32	-
	<i>C. tropicalis</i>	≥8	-	4	≤2
	<i>C. krusei</i> <sup>c</sup>	-	-	-	-
Micafungina <sup>b</sup>	<i>C. albicans</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
	<i>C. glabrata</i>	≥0,25	0,12	-	≤0,06
	<i>C. tropicalis</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
	<i>C. krusei</i>	≥1	0,5	-	≤0,25
Voriconazol	<i>C. albicans</i>	≥1	0,25-0,5	-	≤0,12
	<i>C. glabrata</i> <sup>c</sup>	-	-	-	-
	<i>C. tropicalis</i>	≥1	0,25-0,5	-	≤0,12
	<i>C. krusei</i>	≥2	1	-	≤0,5

<sup>a</sup>Puntos de corte definidos por EUCAST (EUCAST, 2017)

<sup>b</sup>Los aislados sensibles a anidulafungina y micafungina deben considerarse sensibles también a caspofungina (CLSI, 2017)

<sup>c</sup>No existen puntos de corte definidos en CLSI ni EUCAST para *C. krusei* frente a fluconazol ni para *C. glabrata* frente a voriconazol, por lo que todos los aislamientos de estas especies deben considerarse resistentes a fluconazol o voriconazol, respectivamente, independientemente de los valores de CMI.

SDD: susceptible-dose dependent (CLSI, 2017)

3. A continuación se definieron las 10 diluciones dobles seriadas que se emplearían con cada antifúngico y cada microorganismo (tabla 16). Las concentraciones alcanzadas en cada pocillo debían contener los puntos de corte definidos

previamente, que nos indicasen, tras el ensayo, si la levadura era sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) respecto a cada antifúngico. Aunque CLSI y EUCAST no definen los puntos de corte para PTS o PTSO, al no tratarse de sustancias con actividad antimicrobiana contrastada, realizar el ensayo en las mismas condiciones que los antifúngicos nos permitió hacer comparaciones con ellos.

**Tabla 16.** Diluciones seriadas (en mg/L) de los diferentes antifúngicos, PTS y PTSO, ensayados frente a *Candida* spp.

Número del pocillo									
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>Anfotericina B</b>									
16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03
<b>Anidulafungina</b>									
4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Caspofungina</b>									
4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Fluconazol</b>									
64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
<b>Micafungina</b>									
4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>Voriconazol</b>									
4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008
<b>PTS</b>									
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
<b>PTSO</b>									
128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25

4. Se prepararon las concentraciones de stock de cada antifúngico, PTS y PTSO, en medio RPMI-1640 (tabla 17). Para ello, en primer lugar se disolvió cada sustancia en la cantidad mínima necesaria del disolvente indicado por el proveedor y posteriormente se diluyó en RPMI-1640 hasta alcanzar la concentración definitiva. Todas las alícuotas se conservaron a -20°C hasta su utilización. Los disolventes empleados fueron:

- Disolución en agua: fluconazol, caspofungina y micafungina.
- Disolución en DMSO (dimetil sulfóxido) a una concentración de 1600 µg/mL: anfotericina B, anidulafungina y voriconazol.
- Disolución en tween-80: PTS, PTSO.

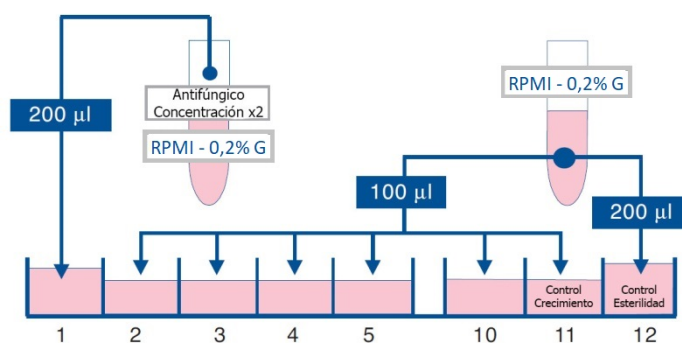
De esta forma, en el pocillo más concentrado, la cantidad final de DMSO o tween-80, en los casos en que fueron utilizados como disolventes, fue inferior al 1%.



**Tabla 17.** Concentración (en mg/L) de los antifúngicos, PTS y PTSO, en stock, para los ensayos de sensibilidad mediante microdilución.

Sustancia	Concentración
Anfotericina B	32
Anidulafungina	8
Caspofungina	8
Fluconazol	128
Micafungina	8
Voriconazol	8
PTS	256
PTSO	256

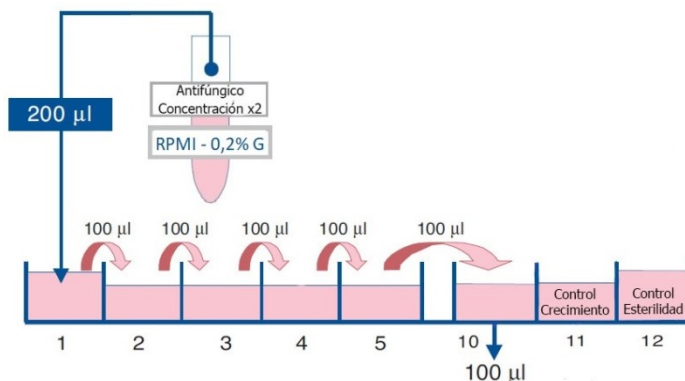
- Se sembraron las levaduras en placas de agar dextrosa Sabouraud. Tras 24-48 horas de incubación a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  y comprobar que el cultivo era monomicrobiano, para descartar posibles contaminaciones, se resuspendieron varias colonias en 2 ml de suero fisiológico hasta obtener una turbidez coincidente con el patrón 0,5 de McFarland (equivalente a  $1-5 \times 10^6$  UFC/ml, en el caso de levaduras).
- Para cada aislado se atemperó un tubo que contuviese RPMI-1640 y se realizó una dilución 1/1000 del microorganismo suspendido en el suero fisiológico en el medio de cultivo.
- En el pocillo 1 de cada placa de microtitulación se dispensaron 200  $\mu\text{l}$  de la concentración en stock de cada antifúngico, PTS o PTSO. En los pocillos 2 a 11 se dispensaron 100  $\mu\text{l}$  de RPMI-1640 y 200  $\mu\text{l}$  en el pocillo 12 (figura 8).



**Figura 8.** Inoculación de las placas con el medio RPMI-1640 y adición del antifúngico, PTS o PTSO (adaptado de Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2007).

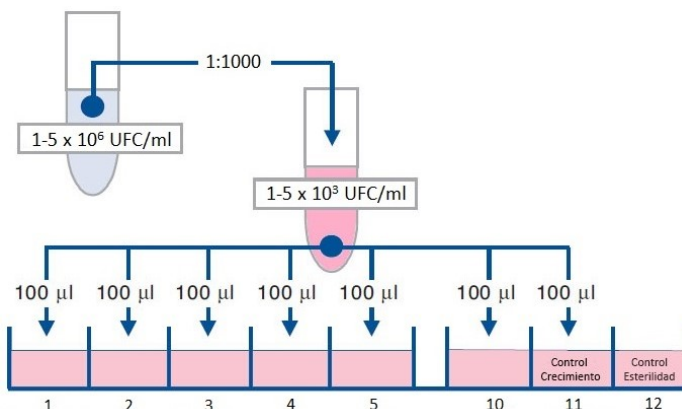
- Posteriormente, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  del pocillo 1 y se dispensaron en el segundo pocillo de la fila. Tras mezclar, se recogieron 100  $\mu\text{l}$  y se dispensaron en el siguiente pocillo, y así, sucesivamente, hasta llegar al pocillo número 10, del cual se desecharon 100  $\mu\text{l}$  (figura 9). De esta forma, se diluyó el principio activo en los

sucesivos pocillos, obteniendo, en cada uno de ellos, una dilución que fue el doble de la del pocillo anterior (diluciones dobles seriadas).



**Figura 9.** Obtención de las diluciones dobles seriadas de cada antifúngico (adaptado de Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2007).

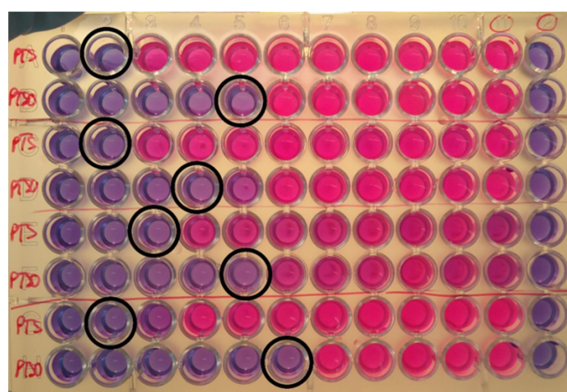
- Una vez realizadas todas las diluciones, se dispensaron 100 µl de RPMI-1640, con la levadura suspendida en los pocillos del 1 al 11 (figura 10). De esta forma, en cada pocillo, el volumen final obtenido fue de 200 µl, y la concentración final esperada según la tabla 16.



**Figura 10.** Adición de la misma cantidad de levaduras en todos los pocillos (adaptado de Cuenca-Estrella y Rodríguez-Tudela, 2007).

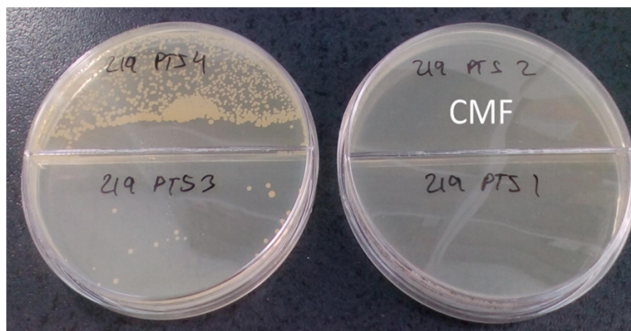
- Tras su inoculación, las placas de microtitulación se incubaron a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 24 horas (48 horas en el caso de los azoles), no apilando más de 5 placas y tapando la superior para evitar la evaporación del contenido.
- Para anfotericina B, el CLSI define la CMI como la concentración más baja del antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento visible, tras 24 horas de incubación. Para las equinocandinas y los azoles, sin embargo, la CMI es la

concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ( $\geq 50\%$ ), comparada con el crecimiento control después de 24 y 48 horas de incubación, respectivamente. Debido a la dificultad que tiene la interpretación de los valores de CMI en el caso de las levaduras, se optó por utilizar un sistema colorimétrico, basado en la utilización de resazurina, que permite la detección del crecimiento microbiano. La resazurina es un indicador de óxido-reducción, que, en ausencia de crecimiento celular posee un color azulado y en presencia del mismo se torna rojizo. Ello es debido a que la resazurina (de color azul no fluorescente) es reducida a resorufina (de color rojo fluorescente) por óxido-reductasas que se encuentran principalmente en la mitocondria de células vivas, en este caso, las levaduras. En nuestra metodología, transcurrido el tiempo de incubación necesario según el principio activo utilizado (24 o 48 horas), en cada pocillo se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de resazurina 4  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich) y se volvieron a incubar las placas durante 2 horas, procediendo posteriormente a la lectura e interpretación de la CMI (figura 11). En el caso de anfotericina B, PTS y PTSO, se consideró como CMI el valor de la concentración del principio activo en el primer pocillo que mostró un cambio de color intenso respecto al pocillo del control de crecimiento; mientras que, en equinocandinas y azoles, se consideró como CMI el valor de la concentración del principio activo en el primer pocillo que mostró un mínimo cambio de color respecto al pocillo de control de crecimiento.



**Figura 11.** Placa de microtitulación tras la incubación con resazurina. Se puede observar el crecimiento de la levadura en los pocillos con concentraciones más bajas y en el de control de crecimiento (columna 11), todos ellos de coloración rojiza, así como la ausencia de crecimiento a partir de un determinado pocillo, con coloración azulada. Este, marcado con círculos negros, indica el pocillo correspondiente al valor de la CMI. La columna 12 corresponde al control negativo (ausencia de crecimiento bacteriano).

11. Se calcularon los valores de  $CMI_{50}$  y  $CMI_{90}$  como la concentración más baja del antifúngico, PTS o PTSO, a la que se inhibió el crecimiento del 50% y 90% de los aislados de cada levadura, respectivamente.
12. Por último, se determinó la concentración mínima fungicida (CMF) para cada antifúngico, PTS y PTSO. Se consideró como CMF la menor concentración de sustancia que mató el 99,9% del inóculo original, lo que en la práctica se consideró como la concentración más baja de sustancia que, tras subcultivo en medio sólido, no generó crecimiento fúngico alguno. Para ello, una vez determinada la CMI de cada principio activo sobre cada levadura, se homogeneizó el contenido de los pocillos (con pipeta, mezclando de 8 a 10 veces) y se sembraron 100  $\mu$ l de 3-4 pocillos en los que no se observó crecimiento microbiano (el correspondiente al valor de la CMI y posteriores) en agar dextrosa Sabouraud. Las placas de agar se incubaron durante 48 horas a  $35\pm 1^{\circ}\text{C}$  y se visualizaron al día siguiente (figura 12). Los valores de  $CMF_{50}$  y  $CMF_{90}$  se definieron como la concentración más baja del antifúngico, PTS o PTSO, que mató al 50% y 90% de los aislados de cada levadura, respectivamente. Se estimó que PTS y PTSO tuvieron efecto fungistático cuando la relación  $CMF/CMI$  fue superior a 2, y efecto fungicida cuando la relación  $CMF/CMI$  se situó entre 2 y 1.

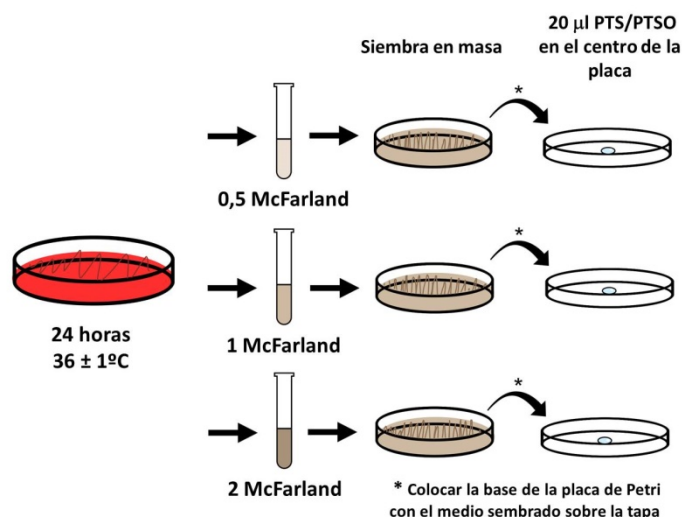


**Figura 12.** Placas con medio dextrosa Sabouraud para la determinación de la CMF de PTS. Como se aprecia en la figura, en este caso concreto, la concentración más baja del principio activo que, tras subcultivo en medio sólido, no generó crecimiento fúngico alguno (CMF) corresponde a la del pocillo 2.

13. Siguiendo las recomendaciones del CLSI y EUCAST, para el control de los procedimientos en los estudios de sensibilidad antifúngica mediante microdilución se usó la cepa de referencia *C. krusei* ATCC 6258 (CLSI, 2017; EUCAST, 2017).

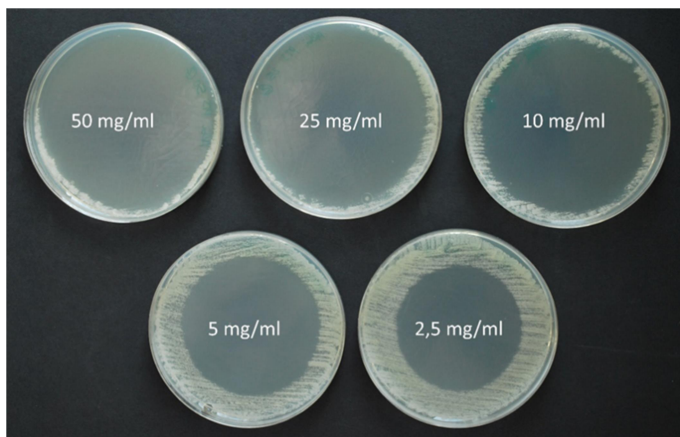
### 3.5. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD MICROBIANA POR EXPOSICIÓN A LA FASE GASEOSA DE PTS Y PTSO

La sensibilidad de 7 microorganismos de la colección ATCC a la fase gaseosa de PTS y PTSO se realizó siguiendo un procedimiento previamente descrito (Leontiev y cols., 2018; Reiter y cols., 2017). Las bacterias y levaduras se sembraron en placas de agar sangre y agar dextrosa Sabouraud, respectivamente, e incubaron durante 24 horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , en atmósfera aerobia. Tras comprobar que los cultivos eran monomicrobianos, varias colonias se resuspendieron en 3 tubos con 5 ml de solución salina hasta alcanzar una turbidez coincidente con el 0,5, 1 y 2 de la escala de McFarland en cada uno de ellos. A partir de cada una de estas suspensiones microbianas se realizaron siembras en masa en agar Mueller-Hinton para las bacterias y agar Mueller-Hinton suplementado con glucosa al 2% para las levaduras. En el centro de la tapa de cada una de las placas de Petri se depositaron 20  $\mu\text{l}$  de alguna de las diferentes concentraciones de PTS y PTSO previamente preparadas (50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL y 2,5 mg/mL). Las placas ya sembradas se colocaron invertidas sobre la tapa, de forma que no hubiese contacto directo entre la sustancia depositada en la gota y el agar, sino aire interpuesto (figura 13). Cada ensayo se repitió 10 veces.



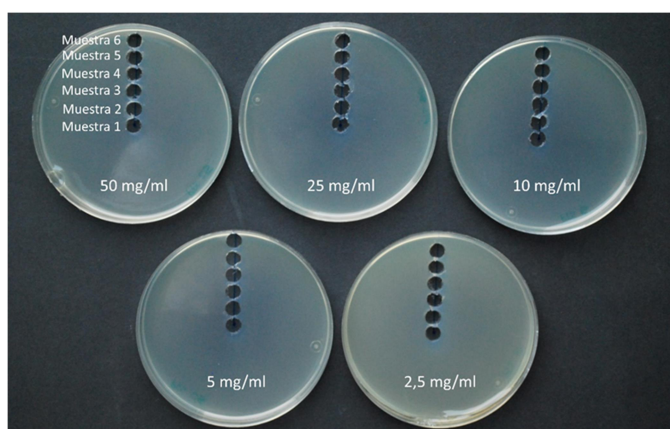
**Figura 13.** Procedimiento para el estudio de la sensibilidad microbiana por exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO.

Tras el periodo de incubación se midió el diámetro correspondiente a la zona de inhibición del crecimiento microbiano en el medio de cultivo (figura 14).



**Figura 14.** Halos de inhibición del crecimiento microbiano tras 24 horas de incubación a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  en presencia de la fase gaseosa de diferentes concentraciones de PTS o PTSO.

Con la finalidad de determinar la concentración de PTS y PTSO alcanzada en el medio de cultivo a través de la fase gaseosa, por aire interpuesto, se depositaron  $20\ \mu\text{l}$  de las mismas concentraciones de PTS y PTSO en el centro de varias tapas de placas de Petri que contenían agar Mueller-Hinton sin sembrar. Tras colocar el medio sobre la tapa, y tras 24 horas de incubación a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ , se extrajeron muestras del medio con un diámetro de 7,5 mm, desde el centro de la placa hacia la periferia (figura 15). Cada muestra se introdujo en un tubo tipo eppendorf estéril para su posterior cuantificación mediante cromatografía líquida de alta resolución utilizando un detector de UV (HPLC-UV). Cada ensayo se repitió por triplicado.



**Figura 15.** Procedimiento de extracción de muestras para la cuantificación de las concentraciones alcanzadas por PTS y PTSO en el medio a partir de su fase gaseosa.

La detección de la concentración de PTS y PTSO alcanzada en cada una de las muestras de agar Mueller-Hinton mediante HPLC-UV se realizó en los laboratorios de DOMCA siguiendo una metodología previamente desarrollada por esta empresa (Abad

y cols., 2015; Abad y cols., 2017; Abad y cols., 2019). Se utilizó el sistema Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Alemania), que incluye una bomba cuaternaria, un desgasificador en línea, un muestreador automático, un termostato de columna y un detector de matriz de diodos. El análisis se realizó en una columna C18 (Zorbax Eclipse Plus 50 mm x 4,6 mm; 1,8  $\mu$ m) utilizando agua con ácido perclórico 30 mM y MeCN como disolventes A y B, respectivamente, a un caudal de 0,85 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 ml y el programa de elución en gradiente fue el siguiente: 0 min, 50% de B; 2,2 min, 50% de B; 4,5 min, 100% de B; 6,8 min, 100% de B; 8 min, 50% de B; 10,5 min, 50% B. La longitud de onda de detección se fijó en 200 nm. Las muestras de agar se pesaron individualmente y se extrajeron en 500  $\mu$ l de metanol durante 5 minutos en vórtex. El extracto se filtró y se inyectó directamente en el sistema descrito para HPLC-UV.

### **3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el software IBM SPSS Statistics versión 25.0. (IBM Corporation, Armonk, EEUU). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar la distribución de los valores de CMI, CMB y CMF de los diferentes antibióticos, antifúngicos, PTS y PTSO, en los diferentes grupos de microorganismos estudiados. Se empleó la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon para comparar los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento y las concentraciones alcanzadas en los límites de la zona de inhibición del crecimiento microbiano tras la exposición a la fase gaseosa de PTS y PTSO. En ambos casos se consideró un nivel de significación  $p < 0,05$ .





## 4. RESULTADOS





#### 4.1. SENSIBILIDAD ANTIBIÓTICA

Los resultados del ensayo de microdilución en CAMHB de los 479 aislados bacterianos se resumen a continuación, distribuidos en tres apartados en función del tipo de bacteria: enterobacterias, bacilos gramnegativos no fermentadores y cocos grampositivos.

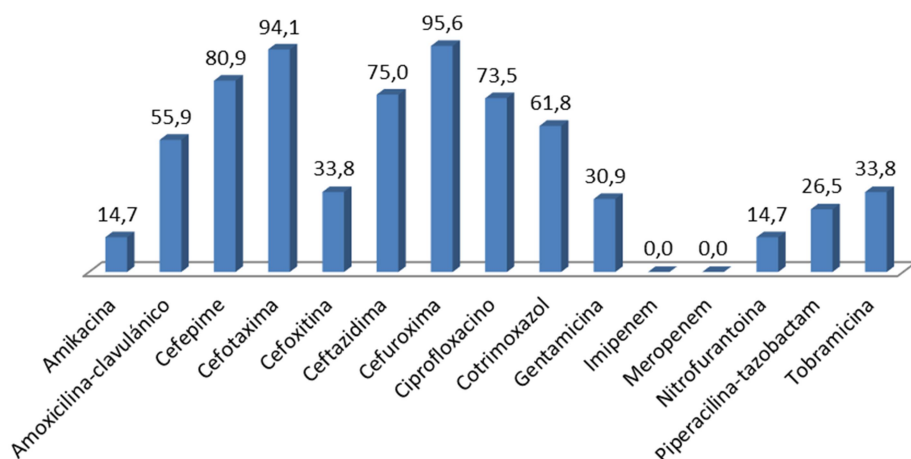
##### 4.1.1. Sensibilidad de enterobacterias

En la tabla 18 se muestran los rangos de los valores de CMI y CMB obtenidos en los 68 aislados clínicos de *E. coli* en los que se estudió la sensibilidad frente a los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, así como los valores correspondientes de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub>.

**Tabla 18.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *E. coli*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - ≥1024	8	32	1 - ≥1024	32	128
Amoxicilina-clavulánico	4/2 – ≥512/256	16/8	256/128	16/8 – ≥512/256	64/32	≥512/256
Cefepime	≤0,25 - ≥512	16	128	≤0,25 - ≥512	64	256
Cefotaxima	≤0,125 - ≥256	128	≥256	0,5 - ≥256	≥256	≥256
Cefoxitina	2 - 512	8	128	4 - ≥1024	32	256
Ceftazidima	≤0,5 - ≥1024	32	256	≤0,5 - ≥1024	64	≥1024
Cefuroxima	4 - ≥1024	≥1024	≥1024	8 - ≥1024	≥1024	≥1024
Ciprofloxacino	≤0,125 - ≥256	64	128	≤0,125 - ≥256	128	≥256
Cotrimoxazol	≤0,06/1,1875 - ≥128/2432	≥128/2432	≥128/2432	0,5/9,5 - ≥128/2432	≥128/2432	≥128/2432
Gentamicina	0,5 - ≥256	4	64	0,5 - ≥256	16	128
Imipenem	0,06 - 1	0,5	1	0,125 - 16	2	4
Meropenem	≤0,016 - 1	0,06	1	≤0,016 - 16	0,125	4
Nitrofurantoina	≤1 - ≥2048	32	64	≤1 - ≥2048	64	256
Piperacilina-tazobactam	≤0,5/4 – ≥1024/4	8/4	128/4	1/4 – ≥1024/4	32/4	256/4
Tobramicina	0,25 - ≥256	4	64	0,5 - ≥256	16	128
PTS	64 - 512	128	256	64 - 1024	256	512
PTSO	32 - 256	64	128	32 - 1024	128	512

En la figura 16 se representan los porcentajes de aislados de *E. coli* con algún nivel de resistencia a cada una de los antibióticos, considerando como tal la suma de aquellos con categoría clínica R o I, según los criterios del CLSI.



**Figura 16.** Porcentaje de aislados clínicos de *E. coli* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

*E. coli* fue la enterobacteria más frecuente. En ella se observó un predominio de resistencias a antibióticos betalactámicos, especialmente a cefalosporinas de segunda a cuarta generación: cefuroxima ( $CMI_{50} \geq 1024$  mg/L;  $CMI_{90} \geq 1024$  mg/L; 95,6% de aislados resistentes), cefotaxima ( $CMI_{50} = 128$  mg/L;  $CMI_{90} \geq 256$  mg/L; 94,1% de aislados resistentes), ceftazidima ( $CMI_{50} = 32$  mg/L;  $CMI_{90} = 256$  mg/L; 75,0% de aislados resistentes) y cefepime ( $CMI_{50} = 16$  mg/L;  $CMI_{90} = 128$  mg/L; 80,9% de aislados resistentes). Sin embargo, los antibióticos carbapenémicos, imipenem ( $CMI_{50} = 0,5$  mg/L;  $CMI_{90} = 1$  mg/L) y meropenem ( $CMI_{50} = 0,06$  mg/L;  $CMI_{90} = 1$  mg/L) se mostraron activos frente a la totalidad de estas bacterias. Las resistencias a cefoxitina, una cefalosporina de segunda generación del grupo de las cefamicinas, y a las combinaciones de betalactámicos con inhibidores de betalactamasas (amoxicilina-clavulánico y piperacilina-tazobactam) presentaron porcentajes intermedios respecto a los otros dos grupos comentados previamente (33,8%, 55,9% y 26,5% de aislados resistentes a cada antibiótico). Este fenotipo de resistencia es característico de bacterias productoras de BLEE, que, en este estudio, representaron el 61,8% de los aislados clínicos de esta especie y, por tanto, condicionó las tasas de resistencia observadas frente a los antibióticos betalactámicos.

*E. coli* también mostró resistencia a aminoglucósidos como amikacina ( $CMI_{50} = 8$  mg/L;  $CMI_{90} = 32$  mg/L; 14,7% de aislados resistentes), gentamicina ( $CMI_{50} = 4$  mg/L;  $CMI_{90} = 64$  mg/L; 30,9% de aislados resistentes) y tobramicina ( $CMI_{50} = 4$  mg/L;  $CMI_{90} = 64$  mg/L; 33,8% de aislados resistentes), aunque las tasas observadas nos indican que

esta no es especialmente relevante en estos aislados, en comparación con otros de la familia *Enterobacteriaceae*, como se describirá más adelante.

La resistencia a ciprofloxacino, representante del grupo de fluoroquinolonas en el estudio de sensibilidad en enterobacterias, así como a cotrimoxazol, fue elevada (CMI<sub>50</sub> = 64 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 128 mg/L; 73,5% de aislados resistentes a ciprofloxacino; CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> ≥ 128/2432 mg/L; 61,8% de aislados resistentes a cotrimoxazol), y superior a la obtenida para el conjunto de enterobacterias, lo que indicó la elevada presencia de co-resistencia en estos aislados clínicos a betalactámicos, fluoroquinolonas y cotrimoxazol.

Por último, destacó un porcentaje relativamente bajo de resistencia de *E. coli* a nitrofurantoína, en comparación a lo descrito con otros antibióticos (CMI<sub>50</sub> = 32 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 64 mg/L; 14,7% de aislados resistentes).

PTS y PTSO fueron, junto con los antibióticos carbapenémicos, los que presentaron rangos de CMI y CMB más estrechos, lo que se asocia a una actividad más uniforme de estas dos sustancias sobre el conjunto de los aislados clínicos de *E. coli*. Además, las diferencias obtenidas, en cada uno de los aislados, entre los valores de CMI y CMB fueron pequeñas, de forma que ambos coincidieron en la misma concentración o difirieron en una sola dilución, lo que sugiere que ambos compuestos poseen actividad bactericida. Por último, PTSO mostró valores de CMI significativamente inferiores a PTS, es decir, PTSO (CMI<sub>50</sub> = 64 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 128 mg/L) fue más activo que PTS (CMI<sub>50</sub> = 128 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 256 mg/L) frente al conjunto de todas los aislados clínicos de *E. coli* ( $p < 0,001$ ).

*Klebsiella* spp. fue la segunda enterobacteria más frecuente, tras *E. coli* en el presente trabajo. En la tabla 19 se muestran los rangos y valores de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub> obtenidos en los 39 aislados clínicos de esta bacteria en los que se estudió la sensibilidad frente a los diferentes antibióticos, PTS y PTSO. En la figura 17 se representan los porcentajes de aislados con algún nivel de resistencia a cada uno de los antibióticos, considerando como tal la suma de aquellos con categoría clínica R o I, según los criterios del CLSI.

Tabla 19. Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *Klebsiella* spp.

Antimicrobianos	Rango de CMI <sub>s</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMB <sub>s</sub>	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - ≥1024	64	≥1024	2 - ≥1024	128	≥1024
Amoxicilina-clavulánico	1/0,5 - ≥512/256	32/16	64/32	1/0,5 - ≥512/256	64/32	256/128
Cefepime	≤0,25 - ≥512	16	64	≤0,25 - ≥512	32	256
Cefotaxima	1 - ≥256	64	≥256	8 - ≥256	128	≥256
Cefoxitina	1 - 512	32	512	2 - ≥1024	64	≥1024
Ceftazidima	≤0,5 - 512	64	256	1 - ≥1024	128	512
Cefuroxima	1 - ≥1024	≥1024	≥1024	1 - ≥1024	≥1024	≥1024
Ciprofloxacino	1 - ≥256	128	≥256	4 - ≥256	≥256	≥256
Cotrimoxazol	0,25/4,75 - ≥128/2432	≥128/2432	≥128/2432	0,5/9,5 - ≥128/2432	≥128/2432	≥128/2432
Gentamicina	0,25 - ≥256	64	≥256	0,5 - ≥256	64	≥256
Imipenem	0,03 - 1	1	1	0,25 - 8	2	4
Meropenem	≤0,016 - 1	0,06	0,25	≤0,016 - 8	0,125	1
Nitrofurantoina	4 - ≥2048	64	128	8 - ≥2048	128	256
Piperacilina-tazobactam	1/4 - ≥1024/4	32/4	512/4	4/4 - ≥1024/4	64/4	≥1024/4
Tobramicina	0,25 - ≥256	32	≥256	0,25 - ≥256	32	≥256
PTS	64 - 512	256	512	128 - 2048	256	512
PTSO	32 - 256	128	256	64 - 1024	128	512

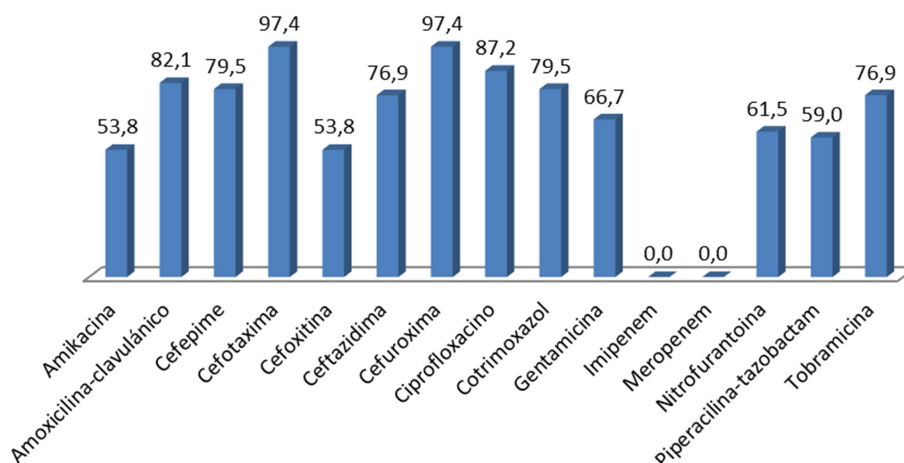


Figura 17. Porcentaje de aislados clínicos de *Klebsiella* spp. resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

Al igual que en *E. coli*, se observó un fenotipo de resistencia a antibióticos betalactámicos, con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> en *Klebsiella* spp. incluso superiores a los hallados en la primera. Nuevamente, este fenotipo fue consecuencia de un predominio en la producción de BLEEs, presentes en el 43,6% de los aislados clínicos: 97,4% resistentes a cefuroxima y cefotaxima; 76,9% resistentes a ceftazidima, 79,5% resistentes a cefepime; y ausencia de resistencia a imipenem y meropenem. Sin embargo, otros antibióticos betalactámicos como cefoxitina (53,8% de aislados

resistentes) y las combinaciones con inhibidores de betalactamasas (82,1% de aislados resistentes a amoxicilina-clavulánico y 61,5% de aislados resistentes a piperacilina-tazobactam) presentaron, en esta bacteria, porcentajes de resistencia superiores a las observadas en *E. coli*, posiblemente debido a la hiperproducción de una penicilinasa natural, que es característica de esta bacteria.

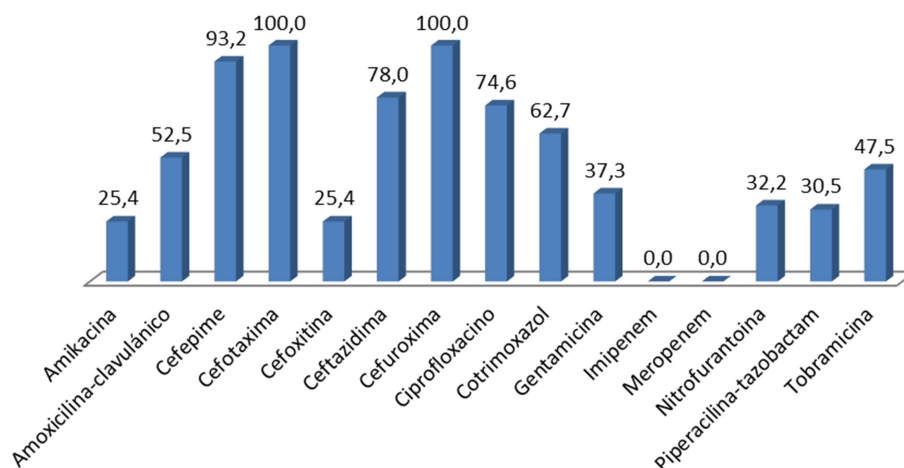
Los valores de CMI y CMB, así como las tasas de resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, nitrofurantoína y cotrimoxazol, fueron superiores en estos aislados clínicos a los encontrados en *E. coli*, lo que indicó una mayor prevalencia de co-resistencias en *Klebsiella* spp.

Del mismo modo que en *E. coli*, los rangos de CMI y CMB de PTS y PTSO fueron estrechos, las diferencias entre los valores de CMI y CMB fueron pequeñas, sugiriendo que estos compuestos poseen actividad bactericida, y PTSO se mostró significativamente más activo que PTS ( $p < 0,001$ ).

Como ya se ha comentado, la presencia de BLEEs en el 55,1% de los aislados clínicos de *E. coli* y *Klebsiella* spp. fue el principal determinante de las altas tasas de resistencia a antibióticos betalactámicos en estas bacterias. Un análisis más detallado de las 59 bacterias productoras de BLEEs se muestra en la tabla 20 y figura 18.

**Tabla 20.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a los aislados productores de BLEEs.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - $\geq 1024$	16	128	2 - $\geq 1024$	64	128
Amoxicilina-clavulánico	4/2 - $\geq 512/256$	16/8	$\geq 512/256$	16/8 - $\geq 512/256$	64/32	$\geq 512/256$
Cefepime	$\leq 0,25$ - $\geq 512$	32	128	2 - $\geq 512$	64	$\geq 512$
Cefotaxima	4 - $\geq 256$	128	$\geq 256$	8 - $\geq 256$	$\geq 256$	$\geq 256$
Cefoxitina	1 - 512	8	64	2 - 512	32	128
Ceftazidima	$\leq 0,5$ - 512	64	256	1 - $\geq 1024$	256	$\geq 1024$
Cefuroxima	8 - $\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 1024$	8 - $\geq 1024$	$\geq 1024$	$\geq 1024$
Ciprofloxacino	$\leq 0,125$ - $\geq 256$	64	$\geq 256$	0,5 - $\geq 256$	128	$\geq 256$
Cotrimoxazol	$\leq 0,06/1,1875$ - $\geq 128/2432$	$\geq 128/2432$	$\geq 128/2432$	0,5/9,5 - $\geq 128/2432$	$\geq 128/2432$	$\geq 128/2432$
Gentamicina	0,25 - $\geq 256$	4	128	0,5 - $\geq 256$	16	$\geq 256$
Imipenem	0,06 - 1	0,5	1	0,25 - 16	2	4
Meropenem	$\leq 0,016$ - 1	0,125	1	$\leq 0,016$ - 8	0,25	4
Nitrofurantoína	4 - $\geq 2048$	32	128	8 - $\geq 2048$	64	256
Piperacilina-tazobactam	$\leq 0,5/4$ - $\geq 1024/4$	8/4	256/4	1/4 - $\geq 1024/4$	32/4	512/4
Tobramicina	0,25 - $\geq 256$	4	128	0,25 - $\geq 256$	32	$\geq 256$
PTS	64 - 512	128	256	64 - 2048	256	512
PTSO	32 - 256	64	128	32 - 1024	128	512



**Figura 18.** Porcentaje de aislados clínicos productores de BLEEs resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

Los aislados clínicos productores de BLEEs fueron más resistentes a las cefalosporinas de segunda a cuarta generación como cefuroxima ( $CMI_{50} \geq 1024$  mg/L;  $CMI_{90} \geq 1024$  mg/L; 100% de aislados resistentes), cefotaxima ( $CMI_{50} = 128$  mg/L;  $CMI_{90} \geq 256$  mg/L; 100% de aislados resistentes), ceftazidima ( $CMI_{50} = 64$  mg/L;  $CMI_{90} = 256$  mg/L; 78,0% de aislados resistentes) y cefepime ( $CMI_{50} = 32$  mg/L;  $CMI_{90} = 128$  mg/L; 93,2% de aislados resistentes), que a cefoxitina ( $CMI_{50} = 8$  mg/L;  $CMI_{90} = 64$  mg/L; 25,4% de aislados resistentes), a las combinaciones de antibióticos betalactámicos con inhibidores de betalactamasas como amoxicilina-clavulánico ( $CMI_{50} = 16/8$  mg/L;  $CMI_{90} \geq 512/256$  mg/L; 52,5% de aislados resistentes) y piperacilina-tazobactam ( $CMI_{50} = 8/4$  mg/L;  $CMI_{90} = 256/4$  mg/L; 30,5% de aislados resistentes), o a los carbapenémicos como imipenem ( $CMI_{50} = 0,5$  mg/L;  $CMI_{90} = 1$  mg/L; 100% de aislados sensibles) y meropenem ( $CMI_{50} = 0,125$  mg/L;  $CMI_{90} = 1$  mg/L; 100% de aislados sensibles).

La co-resistencia fue otra de las características de los aislados clínicos productores de BLEEs. Hay que destacar, sobre todo, que el 74,6% y el 62,7% de estas bacterias fueron también resistentes a ciprofloxacino y/o cotrimoxazol y, en menor medida, a aminoglucósidos (25,4% de aislados resistentes a amikacina; 37,3% de resistencias a gentamicina; 47,5% a tobramicina) y nitrofurantoina (32,2% de los aislados).

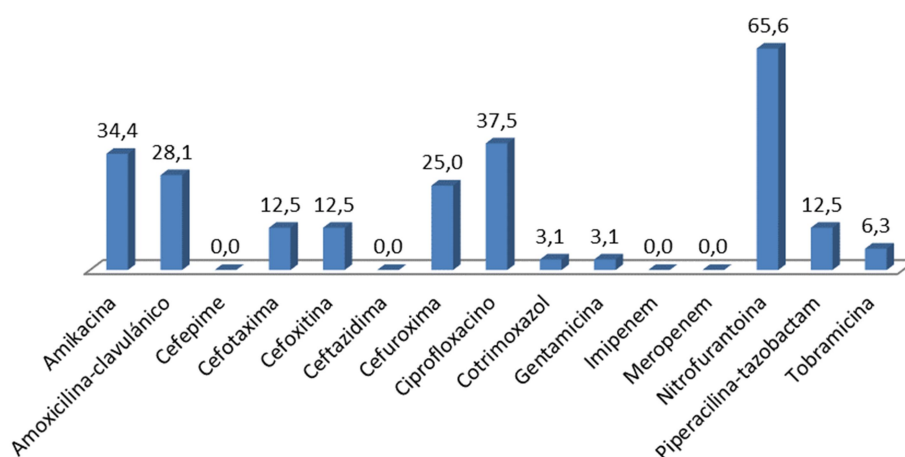
No hubo diferencias significativas en la actividad de PTS y PTSO frente a los aislados productores de BLEEs en comparación con los no productores. La actividad bactericida fue uniforme y PTSO fue significativamente más activo que PTS ( $p < 0,001$ ).



Los rangos de los valores de CMI y CMB obtenidos en los 32 aislados clínicos de *S. enterica* y *Y. enterocolitica* en los que se estudió la sensibilidad frente a los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, así como los valores correspondientes de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub> se resumen en la tabla 21. En la figura 19 se representan los porcentajes de aislados con algún nivel de resistencia a cada uno de los antibióticos.

**Tabla 21.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *S. enterica* y *Y. enterocolitica*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	8 - 256	16	128	16 - 512	128	256
Amoxicilina-clavulánico	4/2 - $\geq$ 512/256	8/4	256/128	16/8 - $\geq$ 512/256	64/32	256/128
Cefepime	$\leq$ 0,25 - 64	2	32	$\leq$ 0,25 - 64	16	64
Cefotaxima	$\leq$ 0,125 - $\geq$ 256	1	1	0,25 - $\geq$ 256	8	64
Cefoxitina	1 - $\geq$ 1024	8	64	2 - $\geq$ 1024	64	128
Ceftazidima	$\leq$ 0,5 - 4	4	4	$\leq$ 0,5 - 64	16	64
Cefuroxima	2 - $\geq$ 1024	4	$\geq$ 1024	4 - $\geq$ 1024	32	$\geq$ 1024
Ciprofloxacino	0,5 - $\geq$ 256	1	128	8 - $\geq$ 256	8	128
Cotrimoxazol	2/38 - $\geq$ 128/2432	2/38	2/38	16/304 - $\geq$ 128/2432	16/304	$\geq$ 128/2432
Gentamicina	4 - $\geq$ 256	4	4	8 - $\geq$ 256	32	32
Imipenem	0,5 - 1	1	1	1 - 16	16	16
Meropenem	1	1	1	1 - 16	4	8
Nitrofurantoina	32 - 1024	256	512	256 - $\geq$ 2048	512	1024
Piperacilina-tazobactam	$\leq$ 0,5/4 - 512/4	2/4	128/4	$\leq$ 0,5/4 - $\geq$ 1024/4	16/4	128/4
Tobramicina	4 - $\geq$ 256	4	4	8 - $\geq$ 256	32	32
PTS	16 - 512	256	256	16 - 512	256	512
PTSO	4 - 256	64	128	4 - 256	64	128



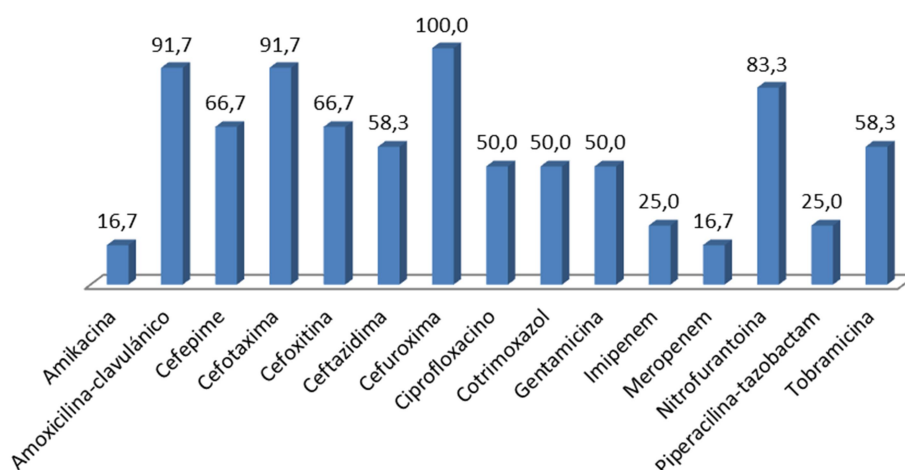
**Figura 19.** Porcentaje de aislados clínicos de *S. enterica* y *Y. enterocolitica* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

La ausencia de BLEEs en *S. enterica* y *Y. enterocolitica* explica que los valores de CMI y CMB, así como los porcentajes de resistencia a antibióticos betalactámicos en este grupo de enterobacterias (rango 0% - 28,1%), fuesen inferiores a los hallados en *E. coli* y *Klebsiella* spp. Estas bacterias se mostraron especialmente resistentes a nitrofurantoína (65,6% de aislados resistentes) y ciprofloxacino (37,5%). La actividad de PTS y PTSO frente a este grupo de enterobacterias no fue diferente a la mostrada frente al resto.

En la tabla 22 se muestran los rangos y valores de CMI y CMB obtenidos en los 12 aislados clínicos de otras enterobacterias no pertenecientes a las especies anteriores (*C. amalonaticus*, *E. cloacae*, *K. cryocrescens*, *P. vulgaris* y *P. stuartii*), mientras que en la figura 20 se representan los porcentajes de aislados con algún nivel de resistencia a cada uno de los antibióticos ensayados.

**Tabla 22.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente al resto de enterobacterias.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - ≥1024	4	256	1 - ≥1024	8	≥1024
Amoxicilina-clavulánico	8/4 - ≥512/256	64/32	128/64	32/16 - ≥512/256	256/128	256/128
Cefepime	≤0,25 - 256	8	64	1 - ≥512	8	256
Cefotaxima	1 - ≥256	64	≥256	4 - ≥256	128	≥256
Cefoxitina	2 - ≥1024	256	≥1024	16 - ≥1024	256	≥1024
Ceftazidima	≤0,5 - 512	8	128	2 - 512	32	512
Cefuroxima	16 - ≥1024	≥1024	≥1024	32 - ≥1024	≥1024	≥1024
Ciprofloxacino	0,5 - ≥256	1	≥256	0,5 - ≥256	8	≥256
Cotrimoxazol	2/38 - ≥128/2432	2/38	≥128/2432	16/304 - ≥128/2432	16/304	≥128/2432
Gentamicina	0,5 - 64	4	32	0,5 - ≥256	32	≥256
Imipenem	0,5 - 4	1	4	1 - ≥32	2	16
Meropenem	≤0,016 - 4	0,06	1	0,03 - 8	0,125	4
Nitrofurantoína	32 - ≥2048	64	≥2048	64 - ≥2048	128	≥2048
Piperacilina-tazobactam	≤0,5/4 - 256/4	4/4	64/4	2/4 - 256/4	8/4	256/4
Tobramicina	2 - 64	8	32	4 - ≥256	16	≥256
PTS	128 - 512	128	256	128 - 512	256	256
PTSO	32 - 256	64	128	32 - 512	128	256



**Figura 20.** Porcentaje de aislados clínicos de otras especies de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

En este grupo de bacterias se observaron valores de CMI y porcentajes de resistencia elevados frente a los antibióticos betalactámicos, incluida, en mayor medida que en otros grupos de enterobacterias, la resistencia a carbapenémicos (CMI<sub>50</sub> = 1 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 4 mg/L; 25,0% de aislados resistentes a imipenem; CMI<sub>50</sub> = 0,06 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 1 mg/L; 16,7% de aislados resistentes a meropenem) en *P. vulgaris* y *P. stuartii*.

Además, también hubo resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas (sobre todo en *E. cloacae* y *P. stuartii*), nitrofurantoina (en todas las especies salvo *K. cryocrescens*) y cotrimoxazol (fundamentalmente en *E. cloacae* y *P. vulgaris*). Nuevamente, la actividad de PTS y PTSO mantuvo las mismas características que hemos descrito previamente frente a otros grupos de enterobacterias.

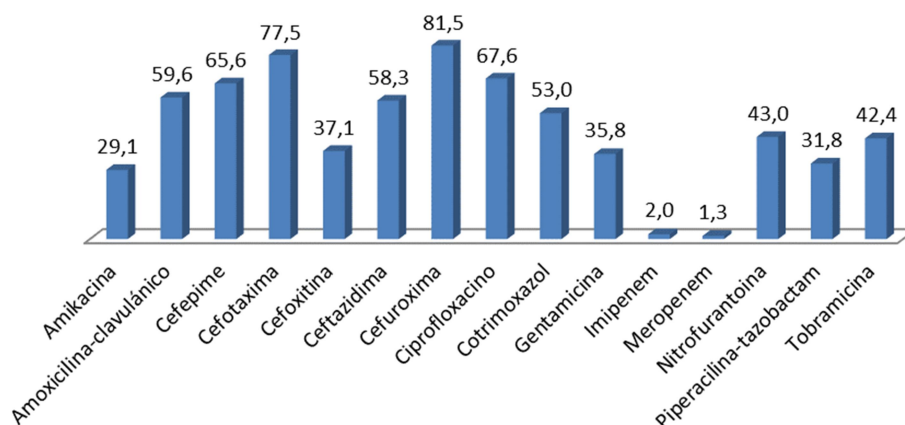
Tras analizar los resultados de los ensayos de sensibilidad en los diferentes grupos de enterobacterias, cabe realizar un análisis de los resultados hallados en el conjunto de estos aislados clínicos, como se muestra en la tabla 23 y figura 21.

Como se ha ido observando a lo largo de este apartado, las enterobacterias fueron fundamentalmente resistentes a los antibióticos betalactámicos, aunque los porcentajes fueron muy variables, oscilando entre la mayor resistencia a cefalosporinas de segunda a cuarta generación como cefuroxima (CMI<sub>50</sub> ≥ 1024 mg/L; CMI<sub>90</sub> ≥ 1024 mg/L; 81,5% de aislados resistentes), cefotaxima (CMI<sub>50</sub> = 64 mg/L; CMI<sub>90</sub> ≥ 256 mg/L; 77,5% de aislados resistentes), ceftazidima (CMI<sub>50</sub> = 16 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 256 mg/L; 58,3% de aislados resistentes) y cefepime (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 128 mg/L;

65,6% de aislados resistentes), la menor resistencia a antibióticos carbapenémicos como imipenem (CMI<sub>50</sub> = 1 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 1 mg/L; 2,0% de aislados resistentes) y meropenem (CMI<sub>50</sub> = 0,125 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 1 mg/L; 1,3% de aislados resistentes), y una sensibilidad intermedia a cefoxitina (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 256 mg/L; 37,1% de aislados resistentes) y combinaciones de antibióticos betalactámicos e inhibidores de betalactamasas (CMI<sub>50</sub> = 32/16 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 256/128 mg/L; 59,6% de aislados resistentes a amoxicilina-clavulánico; CMI<sub>50</sub> = 8/4 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 256/4mg/L; 31,8% de aislados resistentes a piperacilina-tazobactam). Como se ha comentado en varias ocasiones, este fenotipo de resistencia a betalactámicos se corresponde, fundamentalmente, con la presencia de aislados clínicos de *E. coli* y *Klebsiella* spp. productores de BLEEs, que supusieron el 39,1% de todas las enterobacterias (42 *E. coli*, 12 *K. pneumoniae* y 5 *K. oxytoca*). Las pequeñas tasas de resistencia a carbapenémicos, que no pueden ser explicadas por la presencia de BLEEs, se explican, sin embargo, por la resistencia a estos antibióticos en *P. vulgaris* y *P. stuartii*.

**Tabla 23.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a enterobacterias.

Antimicrobiano	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - ≥1024	16	≥1024	1 - ≥1024	64	≥1024
Amoxicilina-clavulánico	1/0,5 - ≥512/256	32/16	256/128	1/0,5 - ≥512/256	64/32	256/128
Cefepime	≤0,25 - ≥512	8	128	≤0,25 - ≥512	32	256
Cefotaxima	≤0,125 - ≥256	64	≥256	0,25 - ≥256	128	≥256
Cefoxitina	1 - ≥1024	8	256	2 - ≥1024	64	512
Ceftazidima	≤0,5 - ≥1024	16	256	≤0,5 - ≥1024	64	512
Cefuroxima	1 - ≥1024	≥1024	≥1024	1 - ≥1024	≥1024	≥1024
Ciprofloxacino	≤0,125 - ≥256	64	≥256	≤0,125 - ≥256	128	≥256
Cotrimoxazol	≤0,06/1,1875 - ≥128/2432	2/38	≥128/2432	0,5/9,5 - ≥128/2432	64/1216	≥128/2432
Gentamicina	0,25 - ≥256	4	128	0,5 - ≥256	32	≥256
Imipenem	0,03 - 4	1	1	0,125 - ≥32	2	16
Meropenem	≤0,016 - 4	0,125	1	≤0,016 - 16	0,25	4
Nitrofurantoina	≤1 - ≥2048	32	256	≤1 - ≥2048	128	512
Piperacilina-tazobactam	≤0,5/4 - ≥1024/4	8/4	256/4	≤0,5/4 - ≥1024/4	32/4	512/4
Tobramicina	0,25 - ≥256	4	128	0,25 - ≥256	32	≥256
PTS	16 - 512	256	512	16 - 2048	256	512
PTSO	4 - 256	64	128	4 - 1024	128	512



**Figura 21.** Porcentaje de enterobacterias resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

Entre los aminoglucósidos, amikacina fue el antibiótico más activo frente a enterobacterias ( $CMI_{50} = 16 \text{ mg/L}$ ;  $CMI_{90} \geq 1024 \text{ mg/L}$ ; 29,1% de aislados resistentes), en contraposición al 35,8% de aislados resistentes a gentamicina ( $CMI_{50} = 4 \text{ mg/L}$ ;  $CMI_{90} = 128 \text{ mg/L}$ ) o el 42,4% de resistencias a tobramicina ( $CMI_{50} = 4 \text{ mg/L}$ ;  $CMI_{90} = 128 \text{ mg/L}$ ). La resistencia a aminoglucósidos fue significativamente superior en *Klebsiella* spp. que en el resto de enterobacterias.

En general, las enterobacterias se mostraron resistentes a las fluoroquinolonas ( $CMI_{50} = 64 \text{ mg/L}$ ;  $CMI_{90} \geq 256 \text{ mg/L}$ ; 67,6% de aislados resistentes a ciprofloxacino) y a cotrimoxazol ( $CMI_{50} = 2/38 \text{ mg/L}$ ,  $CMI_{90} \geq 128/2432 \text{ mg/L}$ ; 53,0% de aislados resistentes), a excepción del grupo de *S. enterica* y *Y. enterocolitica*, que presentó las tasas más bajas (37,5% y 3,1% de aislados resistentes a ciprofloxacino y cotrimoxazol, respectivamente).

En relación a nitrofurantoina ( $CMI_{50} = 32 \text{ mg/L}$ ,  $CMI_{90} = 256 \text{ mg/L}$ ; 43,0% de aislados resistentes), *E. coli* fue la bacteria con menor resistencia a este antibiótico ( $CMI_{50} = 32 \text{ mg/L}$ ,  $CMI_{90} = 64 \text{ mg/L}$ ; 14,7% de aislados resistentes).

Como se ha ido comentando, PTS y PTSO fueron, junto con los antibióticos carbapenémicos, los compuestos que presentaron rangos de CMI y CMB más estrechos, lo que se asocia a una actividad uniforme sobre el conjunto de todas las enterobacterias. Las diferencias entre los valores de CMI y CMB fueron pequeñas, de forma que ambos valores coincidieron en la misma concentración o difirieron en una sola dilución, lo que sugiere la actividad bactericida de ambos compuestos. PTSO

mostró valores de CMI significativamente inferiores a PTS, es decir, PTSO fue más activo que PTS frente al conjunto de todas las enterobacterias ( $p < 0,001$ ). Además, no hubo diferencias en la actividad mostrada por PTS y PTSO frente a los aislados productores de BLEEs, en comparación al resto de enterobacterias.

Algunas de estas enterobacterias expresaron resistencia, al mismo tiempo, a dos o más grupos de antibióticos, por lo que una característica relevante fue la alta frecuencia de co-resistencia, como se describe en la tabla 24. El 74,0% de las enterobacterias resistentes a algún antibiótico betalactámico también lo fueron a ciprofloxacino, el 61,8% a cotrimoxazol y el 48,8% a aminoglucósidos. Cabe señalar que el 22,8% de los aislados clínicos de este grupo de bacterias con resistencia a betalactámicos también fueron resistentes a todos los demás grupos de antibióticos ensayados, al mismo tiempo.

**Tabla 24.** Análisis de las co-resistencias de las enterobacterias resistentes a antibióticos betalactámicos.

	<b>Enterobacterias resistentes a algún antibiótico betalactámico (n=123; 81,5%)</b>	<b>Enterobacterias productoras de BLEE (n=59; 39,1%)</b>	<b>Enterobacterias no productoras de BLEE resistentes a algún antibiótico betalactámico (n=64; 42,4%)</b>
<b>Co-resistencia a aminoglucósidos</b>	48,8%	47,5%	50%
<b>Co-resistencia a fluoroquinolonas</b>	74,0%	74,6%	73,4%
<b>Co-resistencia a cotrimoxazol</b>	61,8%	62,7%	60,9%
<b>Co-resistencia a nitrofurantoína</b>	41,5%	32,2%	50,0%
<b>Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas</b>	46,3%	44,1%	50,0%
<b>Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas + cotrimoxazol</b>	41,5%	39,0%	45,3%
<b>Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas + cotrimoxazol + nitrofurantoína</b>	22,8%	22,0%	23,4%

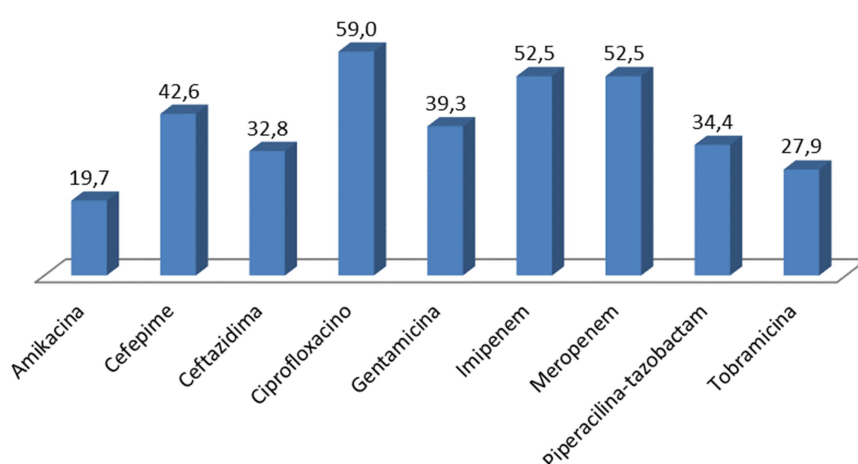
En el caso concreto de los aislados clínicos productores de BLEEs, la resistencia a otros grupos de antibióticos fue similar a la del conjunto de enterobacterias, lo que indica que la aparición de estas co-resistencias a amikacina (25,4% entre aislados productores de BLEEs vs. 29,1% en el conjunto de enterobacterias), gentamicina (37,3% vs. 35,8%), tobramicina (47,5% vs. 42,4%), ciprofloxacino (74,6% vs. 67,6%), nitrofurantoína (32,2% vs. 43,0%) y cotrimoxazol (62,7% vs. 53,0%) fue independiente de la presencia o no de este tipo de enzimas inhibitoras de la actividad de los antibióticos betalactámicos.

#### 4.1.2. Sensibilidad de bacilos gramnegativos no fermentadores

En la tabla 25 se muestran los rangos de los valores de CMI y CMB obtenidos en los 61 bacilos gramnegativos no fermentadores en los que se estudió la sensibilidad frente a los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, así como los valores correspondientes de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, CMB<sub>50</sub>, CMB<sub>90</sub>. De igual modo, en la figura 22 se muestran los porcentajes de aislados con algún nivel de resistencia a cada uno de estos, considerando como tal la suma de aquellos con categoría clínica R o I, según los criterios del CLSI. Finalmente, el desglose de estos resultados, en función de si las bacterias eran de la especie *P. aeruginosa* u otras, se realiza en las tablas 26 y 27, y en las figuras 23 y 24, respectivamente.

**Tabla 25.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a bacilos gramnegativos no fermentadores.

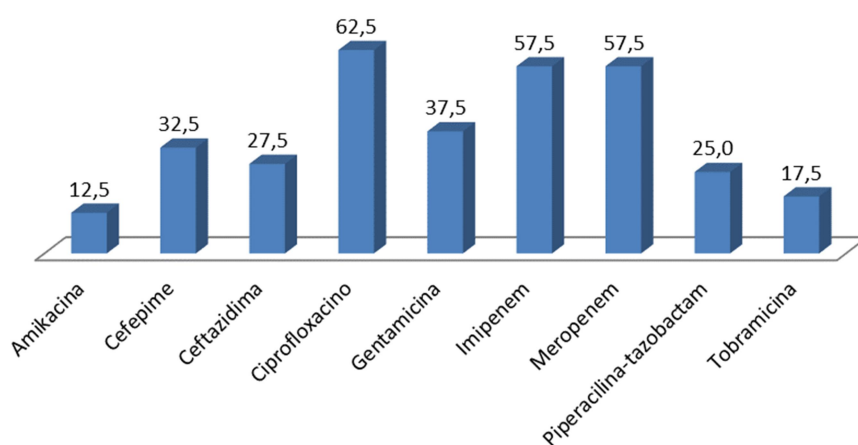
Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - ≥1024	8	128	1 - ≥1024	32	256
Cefepime	≤0,25 - 128	8	32	≤0,25 - ≥512	64	256
Ceftazidima	≤0,5 - 256	8	128	≤0,5 - ≥1024	64	512
Ciprofloxacino	≤0,125 - ≥256	32	≥256	≤0,125 - ≥256	64	≥256
Gentamicina	≤0,125 - ≥256	4	≥256	0,25 - ≥256	32	≥256
Imipenem	0,25 - ≥256	16	128	0,25 - ≥256	32	≥256
Meropenem	≤0,125 - 128	4	64	≤0,125 - ≥256	16	128
Piperacilina-tazobactam	≤0,5/4 - ≥1024/4	16/4	512/4	2/4 - ≥1024/4	128/4	512/4
Tobramicina	0,25 - ≥256	4	≥256	0,25 - ≥256	32	≥256
PTS	16 - ≥4096	1024	2048	16 - ≥4096	1024	2048
PTSO	8 - ≥4096	256	1024	16 - ≥4096	512	2048



**Figura 22.** Porcentaje de aislados clínicos de bacilos gramnegativos no fermentadores resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

**Tabla 26.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *P. aeruginosa*.

Antimicrobianos	Rango de CMI <sub>s</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMB <sub>s</sub>	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	2 - 128	8	32	2 - 128	32	128
Cefepime	4 - 128	8	32	16 - 256	64	128
Ceftazidima	1 - 256	8	64	2 - ≥1024	64	256
Ciprofloxacino	1 - ≥256	32	≥256	2 - ≥256	64	≥256
Gentamicina	0,5 - ≥256	4	≥256	2 - ≥256	16	≥256
Imipenem	2 - ≥256	16	128	2 - ≥256	32	128
Meropenem	2 - 128	4	64	4 - 128	32	128
Piperacilina-tazobactam	4/4 - 256/4	16/4	256/4	4/4 - 512/4	128/4	256/4
Tobramicina	0,25 - ≥256	4	128	0,25 - ≥256	16	≥256
PTS	1024 - ≥4096	1024	2048	1024 - ≥4096	2048	2048
PTSO	128 - ≥4096	512	1024	256 - ≥4096	512	2048

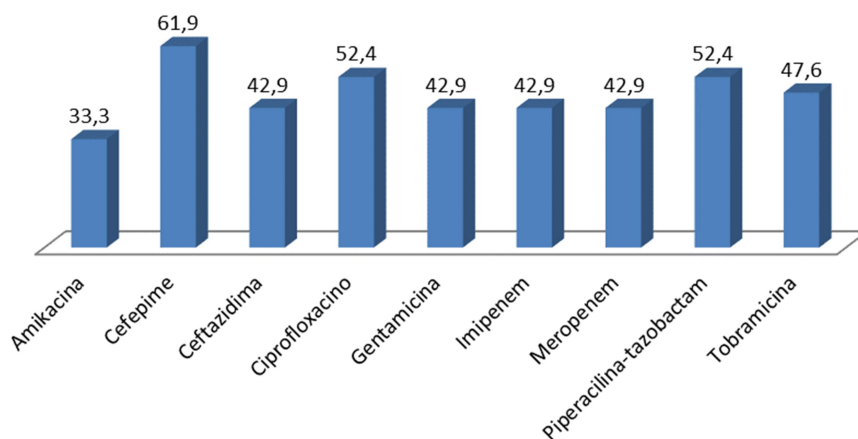


**Figura 23.** Porcentaje de aislados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

**Tabla 27.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a otros bacilos gramnegativos no fermentadores diferentes a *P. aeruginosa*.

Antimicrobianos	Rango de CMI <sub>s</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMB <sub>s</sub>	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Amikacina	1 - ≥1024	16	256	1 - ≥1024	64	256
Cefepime	≤0,25 - 64	16	64	≤0,25 - ≥512	128	256
Ceftazidima	≤0,5 - 256	8	128	≤0,5 - ≥1024	64	512
Ciprofloxacino	≤0,125 - ≥256	4	≥256	≤0,125 - ≥256	32	≥256
Gentamicina	≤0,125 - ≥256	4	≥256	0,25 - ≥256	32	≥256
Imipenem	0,25 - ≥256	2	≥256	0,25 - ≥256	16	≥256
Meropenem	≤0,125 - 128	2	16	≤0,125 - ≥256	8	≥256
Piperacilina-tazobactam	≤0,5/4 - ≥1024/4	128/4	512/4	2/4 - ≥1024/4	512/4	≥1024/4
Tobramicina	0,25 - ≥256	4	≥256	0,5 - ≥256	32	≥256
PTS	16 - 2048	128	512	16 - 2048	128	512
PTSO	8 - ≥4096	64	256	8 - ≥4096	64	256





**Figura 24.** Porcentaje de aislados clínicos de otros bacilos gramnegativos no fermentadores diferentes a *P. aeruginosa* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

En estas bacterias el comportamiento frente a los antibióticos betalactámicos osciló entre el 32,8% de aislados resistentes a ceftazidima, el antibiótico de este grupo que se mostró más activo (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 128 mg/L) y el 52,5% de resistencias a carbapenémicos (CMI<sub>50</sub> = 16 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 128 mg/L frente a imipenem y CMI<sub>50</sub> = 4 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 64 mg/L frente a meropenem). Sin embargo, mientras que ceftazidima y cefepime fueron más activos frente a *P. aeruginosa* (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 64 mg/L; 27,5% de aislados resistentes a ceftazidima; CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 32 mg/L; 32,5% de aislados resistentes a cefepime), los carbapenémicos lo fueron frente a bacterias como *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp. y *Stenotrophomonas* spp. (CMI<sub>50</sub> = 2 mg/L; CMI<sub>90</sub> ≥ 256 mg/L; 42,9% de aislados resistentes a imipenem; CMI<sub>50</sub> = 2 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 16 mg/L; 42,9% de aislados resistentes a meropenem).

Entre los aminoglucósidos, amikacina fue el antibiótico más activo frente a ambos grupos de bacilos gramnegativos no fermentadores (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 128 mg/L; 19,7% de aislados resistentes). El 59,0% de los aislados fueron resistentes a ciprofloxacino (CMI<sub>50</sub> = 32 mg/L, CMI<sub>90</sub> ≥ 256 mg/L), siendo esta actividad menor frente a *P. aeruginosa* (CMI<sub>50</sub> = 32 mg/L; CMI<sub>90</sub> ≥ 256 mg/L; 62,5% de aislados resistentes) que frente a otras bacterias de este grupo (CMI<sub>50</sub> = 4 mg/L; CMI<sub>90</sub> ≥ 256 mg/L; 52,4% de aislados resistentes).

En relación a la expresión de co-resistencias, es destacable que el 75,0% de los aislados clínicos de bacilos no fermentadores que fueron resistentes a fluoroquinolonas también lo fueron a algún antibiótico betalactámico, el 63,9% a algún

aminoglucósido, y el 55,6% fueron resistentes a los tres grupos de antibióticos al mismo tiempo.

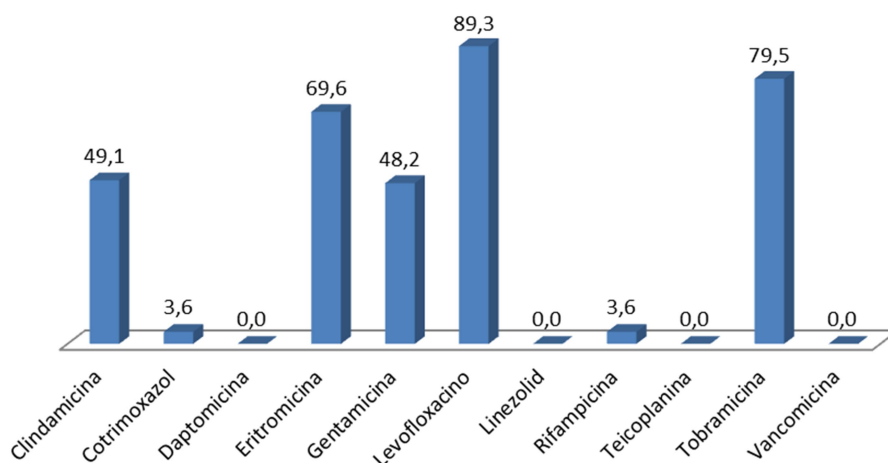
Al igual que con el resto de antibióticos, al comparar el comportamiento, tanto de PTS como de PTSO frente a estas bacterias, los resultados obtenidos en *P. aeruginosa* fueron significativamente diferentes a los obtenidos en otros bacilos gramnegativos no fermentadores. En el caso de PTS, los resultados en *P. aeruginosa* fueron CMI<sub>50</sub> = 1024 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 2048 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 2048 mg/L y CMB<sub>90</sub> = 2048 mg/L, mientras que en el resto de bacterias se mostró más activo (CMI<sub>50</sub> = 128 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 512 mg/L; CMB<sub>50</sub> = 128 mg/L; CMB<sub>90</sub> = 512 mg/L) ( $p < 0,001$ ). Así mismo, los resultados para PTSO indicaron una menor actividad frente a *Pseudomonas* spp. (CMI<sub>50</sub> = 512 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 1024 mg/L; CMB<sub>50</sub> = 512 mg/L; CMB<sub>90</sub> = 2048 mg/L) en comparación al resto de aislados (CMI<sub>50</sub> = 64 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 256 mg/L; CMB<sub>50</sub> = 64 mg/L; CMB<sub>90</sub> = 256 mg/L) ( $p < 0,001$ ). Se puede observar, por tanto, que *P. aeruginosa* se muestra significativamente más resistente a PTS y PTSO, no sólo si se compara con otros bacilos gramnegativos no fermentadores, sino también si se hace con otras bacterias gramnegativas como las enterobacterias.

#### 4.1.3. Sensibilidad de cocos grampositivos

Los valores de CMI y CMB obtenidos en los 112 *S. aureus* resistentes a meticilina y los porcentajes de aislados clínicos con algún nivel de resistencia a los antibióticos ensayados se muestran en la tabla 28 y figura 25, respectivamente.

**Tabla 28.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *S. aureus*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Clindamicina	≤0,06 - ≥128	≥128	≥128	0,125 - ≥128	≥128	≥128
Cotrimoxazol	≤0,06/1,1875 - ≥128/2432	≤0,06	0,5	0,125/2,375 - ≥128/2432	0,5	2
Daptomicina	0,03 - 1	0,25	0,5	0,06 - 4	0,5	2
Eritromicina	≤0,06 - ≥128	≥128	≥128	0,25 - ≥128	≥128	≥128
Gentamicina	≤0,25 - ≥512	4	256	0,5 - ≥512	16	≥512
Levofloxacino	≤0,06 - ≥128	8	32	0,25 - ≥128	32	≥128
Linezolid	0,125 - 4	2	4	0,5 - 16	4	8
Rifampicina	≤0,03 - ≥64	≤0,03	0,5	0,06 - ≥64	0,125	1
Teicoplanina	≤0,03 - 4	0,25	1	0,06 - 16	0,5	4
Tobramicina	≤0,25 - ≥512	64	≥512	2 - ≥512	≥512	≥512
Vancomicina	0,125 - 2	0,5	1	0,25 - 16	1	4
PTS	64 - 256	64	128	256 - 2048	512	1024
PTSO	1 - 16	8	8	4 - 128	32	64



**Figura 25.** Porcentaje de aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados.

Puesto que todos los aislados de *S. aureus* fueron resistentes a meticilina, todos fueron resistentes a los antibióticos betalactámicos, motivo por el que estos no se ensayaron frente a este grupo de bacterias. En el otro extremo se sitúan antibióticos como los glucopéptidos (vancomicina, teicoplanina), lipopéptidos (daptomicina) y oxazolidinonas (linezolid) que fueron activos frente a la totalidad de aislados clínicos.

Se observaron altas tasas de resistencia a fluoroquinolonas ( $\text{CMI}_{50} = 8 \text{ mg/L}$ ;  $\text{CMI}_{90} = 32 \text{ mg/L}$ ; 89,3% de aislados resistentes a levofloxacino), a aminoglucósidos ( $\text{CMI}_{50} = 4 \text{ mg/L}$ ,  $\text{CMI}_{90} 256 \text{ mg/L}$ ; 48,2% de aislados resistentes a gentamicina;  $\text{CMI}_{50} = 64 \text{ mg/L}$ ,  $\text{CMI}_{90} \geq 512 \text{ mg/L}$ ; 79,5% de aislados resistentes a tobramicina), a macrólidos ( $\text{CMI}_{50}$  y  $\text{CMI}_{90} \geq 128 \text{ mg/L}$ ; 69,6% de aislados resistentes a eritromicina) o a lincosamidas ( $\text{CMI}_{50}$  y  $\text{CMI}_{90} \geq 128 \text{ mg/L}$ ; 49,1% de aislados resistentes a clindamicina). En contraste, cotrimoxazol ( $\text{CMI}_{50} \leq 0,06 \text{ mg/L}$ ;  $\text{CMI}_{90} = 0,5 \text{ mg/L}$ ; 3,6% de aislados resistentes) y rifampicina ( $\text{CMI}_{50} \leq 0,03 \text{ mg/L}$ ;  $\text{CMI}_{90} = 0,5 \text{ mg/L}$ ; 3,6% de aislados resistentes) fueron los antibióticos más activos frente a esta bacteria.

En el análisis de las co-resistencias en los aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina, como se observa en la tabla 29, destaca que el 75,9% de estas bacterias fueron resistentes, tanto a aminoglucósidos como a fluoroquinolonas, el 60,7% también mostró resistencia a macrólidos y el 45,5% a clindamicina.

**Tabla 29.** Análisis de las co-resistencias en los aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a meticilina.

	<i>S. aureus</i>
Co-resistencia a aminoglucósidos	79,5%
Co-resistencia a fluoroquinolonas	89,3%
Co-resistencia a cotrimoxazol	3,6%
Co-resistencia a macrólidos (eritromicina)	69,6%
Co-resistencia a lincosamidas (clindamicina)	49,1%
Co-resistencia a rifampicina	3,6%
Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas	75,9%
Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas + cotrimoxazol	2,7%
Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas + macrólidos	60,7%
Co-resistencia a aminoglucósidos + fluoroquinolonas + macrólidos + lincosamidas	45,5%

A continuación se muestran los rangos de los valores de CMI y CMB obtenidos en los 54 *E. faecalis* (tabla 30) y 101 *S. agalactiae* (tabla 31) en los que se estudió la sensibilidad frente a los diferentes antibióticos, PTS y PTSO, así como los valores correspondientes de CMI<sub>50</sub>, CMI<sub>90</sub>, CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub>.

**Tabla 30.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *E. faecalis*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Ampicilina	≤0,03 - 4	1	2	0,06 - 16	2	8
Daptomicina	0,5 - 4	2	4	1 - 16	4	8
Levofloxacino	8 - ≥128	32	64	16 - ≥128	≥128	≥128
Linezolid	≤0,008 - 2	2	2	0,06 - 16	4	8
Teicoplanina	≤0,03 - 0,25	≤0,03	0,125	0,06 - 1	0,25	1
Vancomicina	0,25 - 2	0,5	1	0,5 - 8	2	4
PTS	32 - 256	128	128	512 - 4096	2048	4096
PTSO	0,25 - 8	4	8	0,5 - 64	8	16

**Tabla 31.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antibióticos (en mg/L) frente a *S. agalactiae*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMBs	CMB <sub>50</sub>	CMB <sub>90</sub>
Ampicilina	0,015 - 0,125	0,06	0,125	0,03 - 1	0,125	0,5
Clindamicina	≤0,06 - ≥128	≥128	≥128	0,125 - ≥128	≥128	≥128
Daptomicina	≤0,008 - 1	0,125	0,5	0,015 - 4	0,5	2
Eritromicina	≤0,06 - ≥128	≥128	≥128	0,25 - ≥128	≥128	≥128
Levofloxacino	0,125 - 32	0,5	1	0,5 - ≥128	2	8
Linezolid	0,5 - 2	1	2	1 - 8	2	4
Vancomicina	0,5 - 1	1	1	0,5 - 8	2	4
PTS	64 - 128	64	128	64 - 4096	512	2048
PTSO	0,5 - 8	4	8	1 - 64	8	16

Todos estos aislados clínicos fueron sensibles a ampicilina, vancomicina, teicoplanina (no se ensayó en *S. agalactiae*), daptomicina y linezolid. El 100% de los aislados de *E. faecalis* fueron resistentes a levofloxacino (CMI<sub>50</sub> = 32 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 64 mg/L). *S. agalactiae* mostró resistencia a eritromicina (CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> ≥ 128 mg/L;

94,1% de aislados resistentes) y clindamicina ( $CMI_{50}$  y  $CMI_{90} \geq 128$  mg/L; 85,1% de aislados resistentes)

PTSO fue significativamente más activo que PTS en los tres grupos de bacterias grampositivas ( $p < 0,001$ , en todos los casos) y los valores de  $CMI_{50}$ ,  $CMI_{90}$ ,  $CMB_{50}$  y  $CMB_{90}$  fueron, para ambos compuestos, inferiores a los obtenidos frente a bacterias gramnegativas, tanto enterobacterias como bacilos no fermentadores. Sin embargo, los valores de CMI y CMB en bacterias grampositivas difirieron significativamente, especialmente para PTS (más de 2 diluciones), lo que indica que estos compuestos podrían tener un efecto bacteriostático y no bactericida frente a estas bacterias, al menos a bajas concentraciones.

#### 4.2. SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICA

Los resultados del ensayo de microdilución en RPMI-1640 de las 203 levaduras, desglosados por especies, se muestran en las tablas 32 a 35.

**Tabla 32.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antifúngicos (en mg/L) frente a *C. albicans*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	$CMI_{50}$	$CMI_{90}$	Rango de CMFs	$CMF_{50}$	$CMF_{90}$
Anfotericina B	0,125 - 0,25	0,25	0,25	1 - 16	4	8
Anidulafungina	$\leq 0,008$ - 0,25	0,015	0,06	0,015 - >4	0,25	1
Caspofungina	$\leq 0,008$ - 0,25	0,06	0,06	0,06 - 4	0,5	2
Fluconazol	$\leq 0,125$ - 2	0,25	2	8 - >64	>64	>64
Micafungina	$\leq 0,008$ - 0,25	0,03	0,125	0,03 - 4	0,5	2
Voriconazol	$\leq 0,008$ - 0,06	$\leq 0,008$	$\leq 0,008$	0,03 - 0,5	0,5	0,5
PTS	16 - 64	32	32	16 - >128	32	128
PTSO	8 - 64	16	32	8 - 128	32	64

**Tabla 33.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antifúngicos (en mg/L) frente a *C. glabrata*.

Antimicrobianos	Rango de CMIs	$CMI_{50}$	$CMI_{90}$	Rango de CMFs	$CMF_{50}$	$CMF_{90}$
Anfotericina B	0,06 - 1	0,25	0,5	1 - >16	4	8
Anidulafungina	$\leq 0,008$ - 0,125	0,015	0,03	0,06 - >4	0,25	0,5
Caspofungina	$\leq 0,008$ - 0,125	0,03	0,03	0,06 - 4	1	2
Fluconazol	0,25 - $\geq 64$	4	$\geq 64$	16 - >64	>64	>64
Micafungina	$\leq 0,008$ - 0,06	$\leq 0,008$	0,03	0,008 - 4	0,06	0,25
Voriconazol	0,03 - $\geq 4$	0,5	$\geq 4$	2 - >4	>4	>4
PTS	8 - 64	32	32	16 - >128	64	128
PTSO	16 - 32	16	32	8 - >128	32	64

**Tabla 34.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antifúngicos (en mg/L) frente a *C. krusei*.

Antimicrobianos	Rango de CMI <sub>s</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMF <sub>s</sub>	CMF <sub>50</sub>	CMF <sub>90</sub>
Anfotericina B	0,25 - 1	0,5	1	4 - 16	8	16
Anidulafungina	≤0,008 - 0,06	0,015	0,03	0,125 - 0,5	0,25	0,5
Caspofungina	0,06 - 0,25	0,125	0,25	1 - 4	1	2
Fluconazol	8 - ≥64	16	≥64	>64	>64	>64
Micafungina	0,06 - 0,25	0,125	0,125	0,5 - 4	0,5	1
Voriconazol	0,03 - 0,5	0,125	0,5	2 - >4	>4	>4
PTS	4 - 32	16	32	32 - >128	32	128
PTSO	4 - 16	4	8	64 - >128	128	128

**Tabla 35.** Actividad *in vitro* de PTS, PTSO y diferentes antifúngicos (en mg/L) frente a *C. tropicalis*.

Antimicrobianos	Rango de CMI <sub>s</sub>	CMI <sub>50</sub>	CMI <sub>90</sub>	Rango de CMF <sub>s</sub>	CMF <sub>50</sub>	CMF <sub>90</sub>
Anfotericina B	≤0,03 - 1	0,125	0,25	2 - 16	2	8
Anidulafungina	≤0,008 - 0,25	0,06	0,25	0,015 - 2	1	2
Caspofungina	≤0,008 - 0,25	0,06	0,25	0,06 - 4	1	4
Fluconazol	≤0,125 - 2	≤0,125	1	8 - >64	>64	>64
Micafungina	≤0,008 - 0,25	0,06	0,25	0,008 - 2	0,5	2
Voriconazol	≤0,008 - 0,06	≤0,008	0,015	0,03 - 0,5	0,5	0,5
PTS	32 - 64	64	64	64 - >128	128	128
PTSO	4 - 32	16	32	4 - 128	32	64

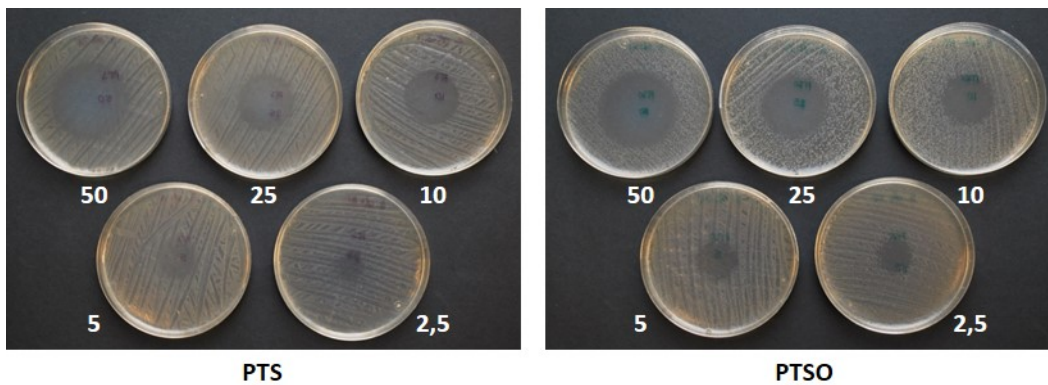
Todos los aislados de *C. albicans* y *C. tropicalis* se mostraron sensibles al conjunto de antifúngicos. *C. glabrata* y *C. krusei* fueron sensibles a anfotericina B y a las tres equinocandinas (anidulafungina, caspofungina y micafungina). Ambas especies fueron resistentes a fluconazol, expresando *C. glabrata* también resistencia a voriconazol, mientras que *C. krusei* se mostró sensible a este último.

Anfotericina B fue significativamente más activo frente a *C. albicans* (CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> = 0,25 mg/L) y *C. tropicalis* (CMI<sub>50</sub> = 0,125 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 0,25 mg/L) que frente a las otras dos especies ( $p < 0,001$ ). *C. glabrata* fue la especie con los valores de CMI a anidulafungina (CMI<sub>50</sub> = 0,015 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 0,03 mg/L), caspofungina (CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> = 0,03 mg/L) y micafungina (CMI<sub>50</sub> ≤ 0,008 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 0,03 mg/L) significativamente más bajos ( $p < 0,001$ ).

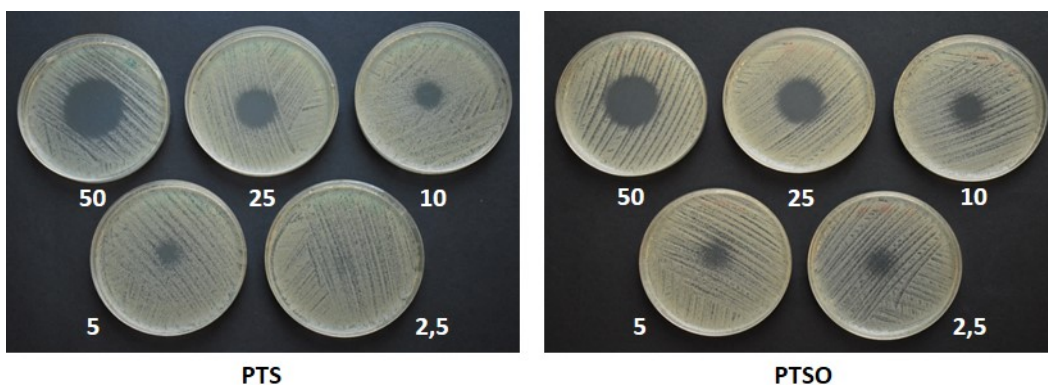
La actividad de PTS y PTSO fue uniforme sobre el conjunto de levaduras. Considerando todos los aislados clínicos de *Candida* spp., los datos indican que PTSO fue significativamente más activo que PTS ( $p < 0,001$ ) y que ambos compuestos demostraron actividad fungicida, ya que los valores de CMI y CMF difirieron en una sola dilución para ambos, PTS (CMI<sub>50</sub> = 32 mg/L y CMF<sub>50</sub> = 64 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 64 mg/L y CMF<sub>90</sub> = 128 mg/L) y PTSO (CMI<sub>50</sub> = 16 mg/L y CMF<sub>50</sub> = 32 mg/L; CMI<sub>90</sub> = 32 mg/L y CMF<sub>90</sub> = 64 mg/L).

### 4.3. SENSIBILIDAD MICROBIANA POR EXPOSICIÓN A LA FASE GASEOSA DE PTS Y PTSO

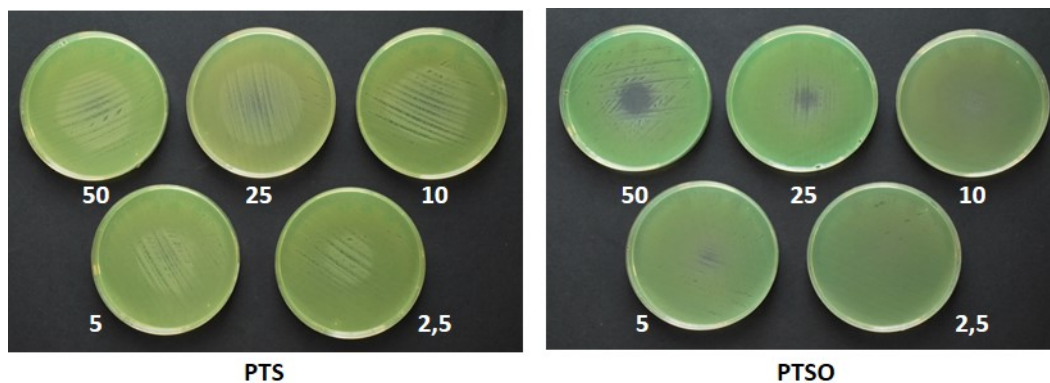
PTS y PTSO inhibieron el crecimiento de 6 de los 7 microorganismos empleados en el presente estudio a través de su fase gaseosa, sin entrar en ningún momento en contacto con el medio ni, por tanto, con el microorganismo, salvo por su difusión aérea. Como se puede observar en las figuras 26 a 32, el vapor generado por ambas sustancias, tras difundir en el aire del interior de la placa de Petri y alcanzar el medio de cultivo, inhibió el crecimiento microbiano en un área circular por encima de la gota colocada en la tapa de la placa. La ausencia de cualquier tipo de crecimiento microbiano en la zona de inhibición sugiere un efecto predominantemente microbicida de estas sustancias.



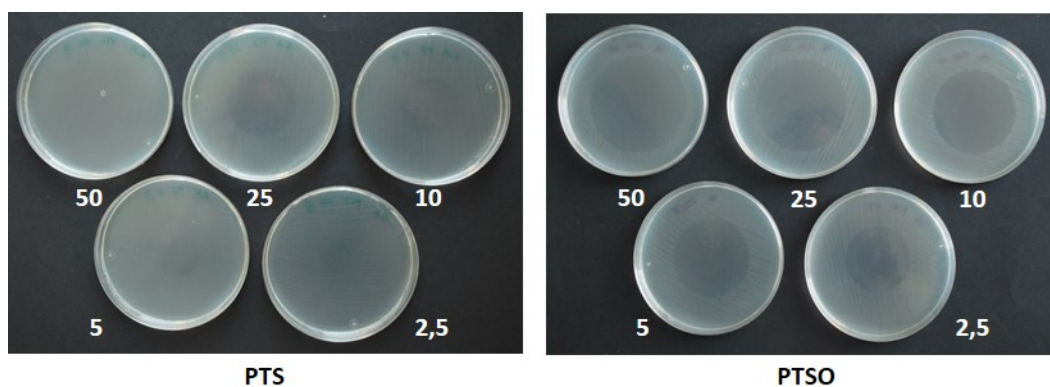
**Figura 26.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *E. coli* ATCC 25922



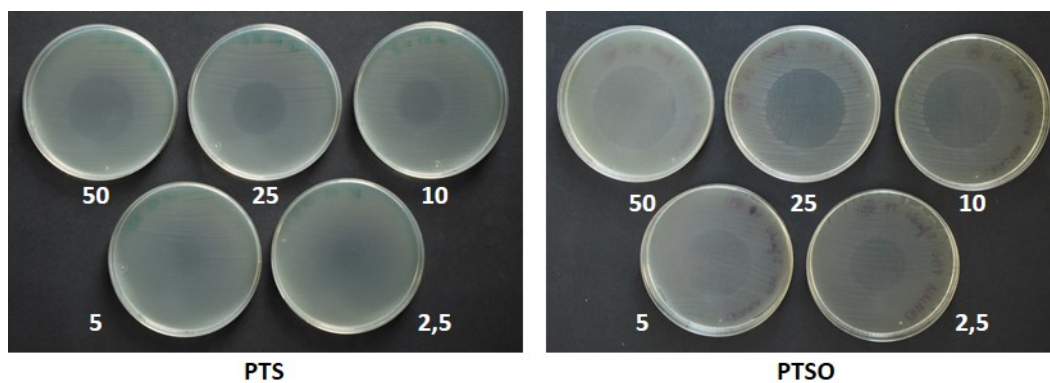
**Figura 27.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *K. pneumoniae* ATCC 700603



**Figura 28.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *P. aeruginosa* ATCC 27853

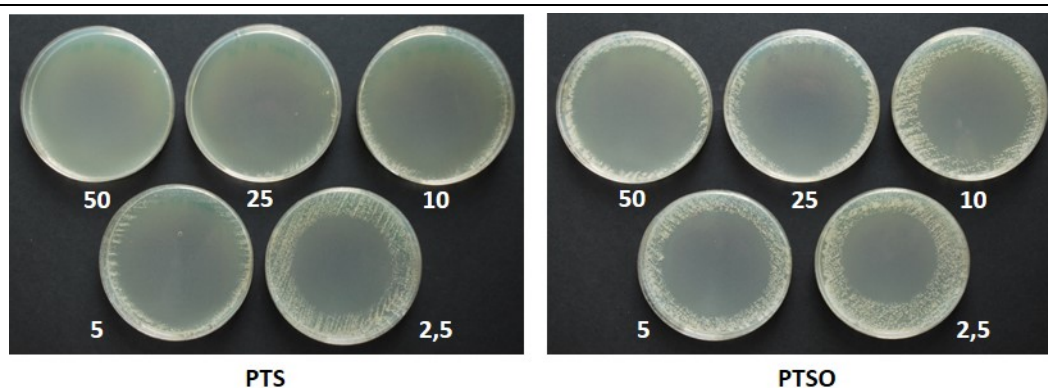


**Figura 29.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *S. aureus* ATCC 29213

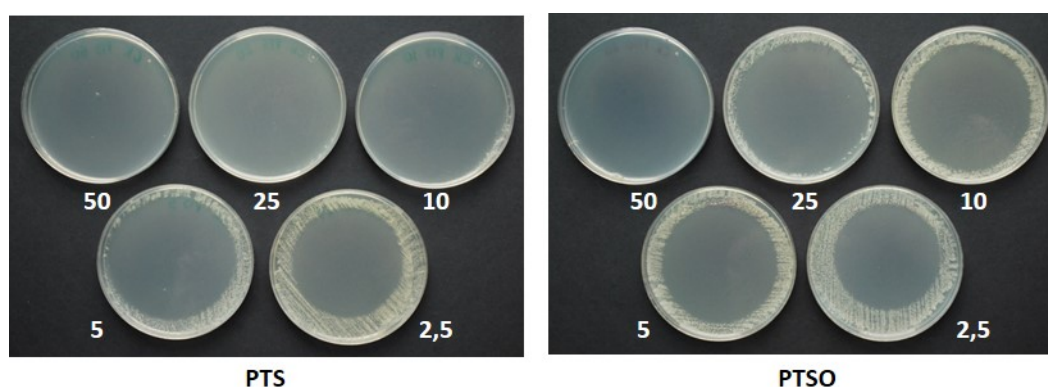


**Figura 30.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *E. faecalis* ATCC 29212





**Figura 31.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *C. albicans* ATCC 20955



**Figura 32.** Actividad de la fase gaseosa de PTS y PTSO sobre un inóculo al 0,5 McFarland de *C. krusei* ATCC 6258

En las tablas 36 y 37 se recogen los valores medios del diámetro  $\pm$  desviación estándar, en milímetros, de las zonas de inhibición del crecimiento generadas por la fase gaseosa de PTS y PTSO, respectivamente, en cada uno de los microorganismos, para cada concentración del compuesto e inóculo, tras los 10 ensayos realizados repitiendo cada una de las condiciones (mismo microorganismo, mismo inóculo, misma sustancia y misma concentración).

*P. aeruginosa* ATCC 27853 fue el microorganismo que mostró mayor grado de resistencia a ambos compuestos, observándose ausencia del halo de inhibición del crecimiento en la mayoría de las concentraciones e inóculos bacterianos empleados. Sólo se observaron pequeños halos, con un diámetro alrededor de 10 mm, cuando se empleó PTSO a 50 mg/mL y 25 mg/mL frente a un inóculo bacteriano al 0,5 de la escala McFarland.

**Tabla 36.** Diámetro  $\pm$  desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de cada uno de los microorganismos, para cada concentración de PTS e inóculo microbiano ensayados.

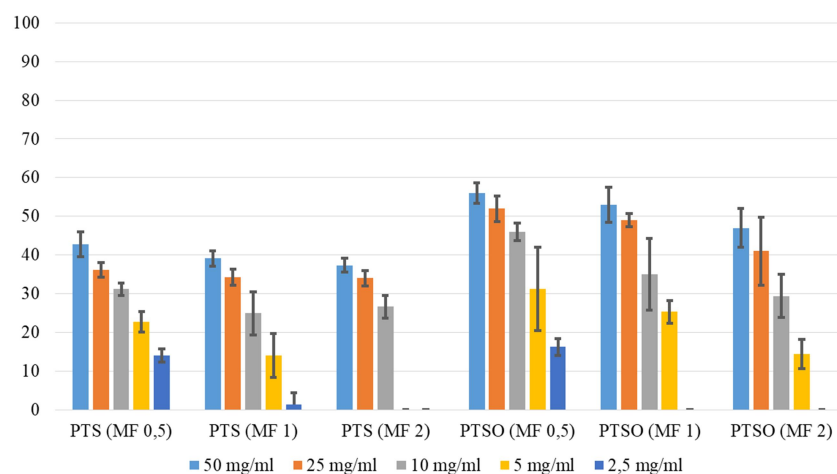
Microorganismo	Inóculo (McFarland)	Diámetro $\pm$ desviación estándar				
		50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	43 $\pm$ 3,2	36 $\pm$ 1,9	31 $\pm$ 1,6	23 $\pm$ 2,7	14 $\pm$ 1,6
	1	39 $\pm$ 2,0	34 $\pm$ 2,1	25 $\pm$ 5,6	14 $\pm$ 5,7	1 $\pm$ 3,0
	2	37 $\pm$ 1,8	34 $\pm$ 2,0	27 $\pm$ 3,0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,5	28 $\pm$ 3,3	22 $\pm$ 2,2	17 $\pm$ 1,8	5 $\pm$ 2,0	0
	1	28 $\pm$ 3,9	23 $\pm$ 2,2	12 $\pm$ 2,8	0	0
	2	28 $\pm$ 3,6	22 $\pm$ 3,8	11 $\pm$ 3,3	1 $\pm$ 1,8	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	45 $\pm$ 3,6	39 $\pm$ 3,3	31 $\pm$ 2,4	28 $\pm$ 2,4	3 $\pm$ 3,5
	1	42 $\pm$ 1,8	38 $\pm$ 2,5	29 $\pm$ 2,0	11 $\pm$ 10,3	1 $\pm$ 3,2
	2	39 $\pm$ 2,1	34 $\pm$ 2,1	25 $\pm$ 2,8	12 $\pm$ 7,1	1 $\pm$ 1,6
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	35 $\pm$ 4,6	30 $\pm$ 4,0	21 $\pm$ 5,2	1 $\pm$ 1,2	0
	1	33 $\pm$ 1,8	30 $\pm$ 1,6	8 $\pm$ 8,7	0	0
	2	31 $\pm$ 1,9	28 $\pm$ 2,7	3 $\pm$ 5,3	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 200955	0,5	82 $\pm$ 3,4	77 $\pm$ 1,2	74 $\pm$ 1,9	69 $\pm$ 2,3	61 $\pm$ 4,9
	1	79 $\pm$ 1,3	77 $\pm$ 4,5	69 $\pm$ 2,3	64 $\pm$ 3,3	59 $\pm$ 4,5
	2	76 $\pm$ 2,5	75 $\pm$ 1,9	71 $\pm$ 1,5	62 $\pm$ 5,5	55 $\pm$ 1,9
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,5	86 $\pm$ 3,0	83 $\pm$ 2,5	81 $\pm$ 3,9	73 $\pm$ 2,5	69 $\pm$ 3,9
	1	85 $\pm$ 0,0	84 $\pm$ 3,3	75 $\pm$ 3,2	71 $\pm$ 2,6	65 $\pm$ 5,0
	2	84 $\pm$ 2,7	78 $\pm$ 4,5	74 $\pm$ 4,9	68 $\pm$ 4,7	61 $\pm$ 3,2

**Tabla 37.** Diámetro  $\pm$  desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de cada uno de los microorganismos, para cada concentración de PTSO e inóculo microbiano ensayados.

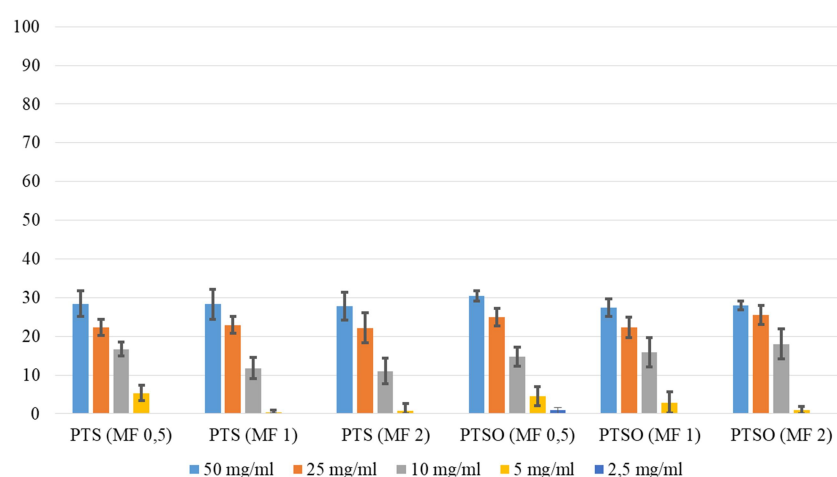
Microorganismo	Inóculo (McFarland)	Diámetro $\pm$ desviación estándar				
		50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2,5 mg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	56 $\pm$ 2,7	52 $\pm$ 3,3	46 $\pm$ 2,2	31 $\pm$ 10,8	16 $\pm$ 2,1
	1	53 $\pm$ 4,5	49 $\pm$ 1,8	35 $\pm$ 9,2	25 $\pm$ 3,0	0
	2	47 $\pm$ 5,1	42 $\pm$ 8,8	29 $\pm$ 5,5	14 $\pm$ 3,9	0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,5	30 $\pm$ 1,3	25 $\pm$ 2,2	15 $\pm$ 2,5	5 $\pm$ 2,5	1 $\pm$ 0,7
	1	27 $\pm$ 2,3	22 $\pm$ 2,7	16 $\pm$ 3,8	3 $\pm$ 2,7	0
	2	28 $\pm$ 1,2	26 $\pm$ 2,4	18 $\pm$ 3,9	1 $\pm$ 0,9	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,5	10 $\pm$ 2,7	2 $\pm$ 0,9	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	56 $\pm$ 2,0	53 $\pm$ 1,8	50 $\pm$ 2,3	31 $\pm$ 10,4	14 $\pm$ 3,3
	1	55 $\pm$ 3,1	52 $\pm$ 2,5	47 $\pm$ 3,2	21 $\pm$ 7,1	0
	2	50 $\pm$ 4,9	46 $\pm$ 2,7	29 $\pm$ 13,5	19 $\pm$ 4,3	3 $\pm$ 4,8
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	44 $\pm$ 1,3	38 $\pm$ 6,5	20 $\pm$ 6,3	3 $\pm$ 5,3	0
	1	44 $\pm$ 2,1	34 $\pm$ 7,8	21 $\pm$ 1,6	11 $\pm$ 14,0	0
	2	40 $\pm$ 6,3	35 $\pm$ 6,2	14 $\pm$ 11,6	0	0
<i>C. albicans</i> ATCC 200955	0,5	84 $\pm$ 3,4	82 $\pm$ 2,2	77 $\pm$ 2,5	70 $\pm$ 2,4	67 $\pm$ 3,5
	1	84 $\pm$ 3,2	81 $\pm$ 3,4	78 $\pm$ 2,1	72 $\pm$ 3,0	65 $\pm$ 5,8
	2	81 $\pm$ 2,8	76 $\pm$ 1,9	71 $\pm$ 3,0	67 $\pm$ 3,2	64 $\pm$ 2,9
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,5	87 $\pm$ 2,1	87 $\pm$ 2,3	82 $\pm$ 5,6	77 $\pm$ 4,5	75 $\pm$ 4,5
	1	83 $\pm$ 2,5	84 $\pm$ 3,2	76 $\pm$ 4,7	73 $\pm$ 3,6	69 $\pm$ 3,4
	2	82 $\pm$ 2,8	79 $\pm$ 3,5	75 $\pm$ 3,2	72 $\pm$ 2,5	67 $\pm$ 2,8

La concentración 2,5 mg/mL de PTS y PTSO se mostró la menos eficaz, puesto que, en varios microorganismos, no se observó halo de inhibición del crecimiento microbiano, independientemente del inóculo empleado.

Las figuras 33 a 39 son representaciones gráficas de los datos anteriores. Como se puede observar, los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento se relacionaron directamente con la concentración de PTS o PTSO, e inversamente con el inóculo microbiano. Así, cuanto mayor fue la concentración de PTS o PTSO y menor fue la cantidad de microorganismo, mayor fue el diámetro del halo ( $p < 0,001$ ). Los mayores halos y, por tanto, la mayor sensibilidad a estos compuestos, se produjo en el caso de las levaduras (*C. albicans* ATCC 200955 y *C. krusei* ATCC 6258).



**Figura 33.** Diámetro  $\pm$  desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.



**Figura 34.** Diámetro  $\pm$  desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *K. pneumoniae* ATCC 700603, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.

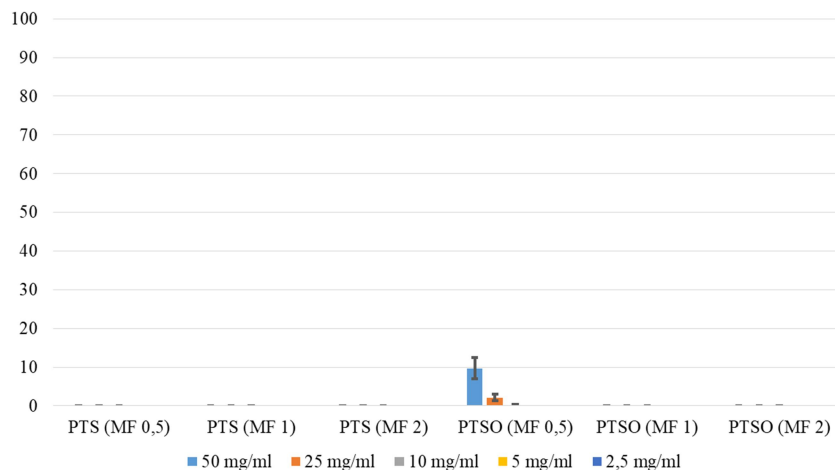


Figura 35. Diámetro ± desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.

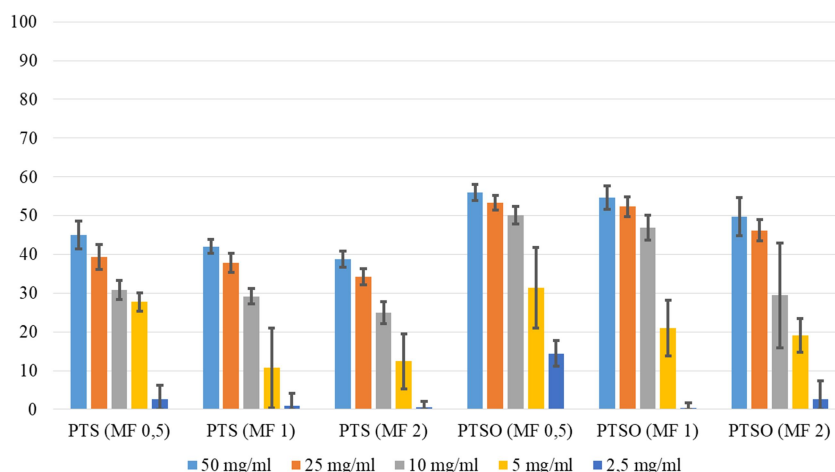


Figura 36. Diámetro ± desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.

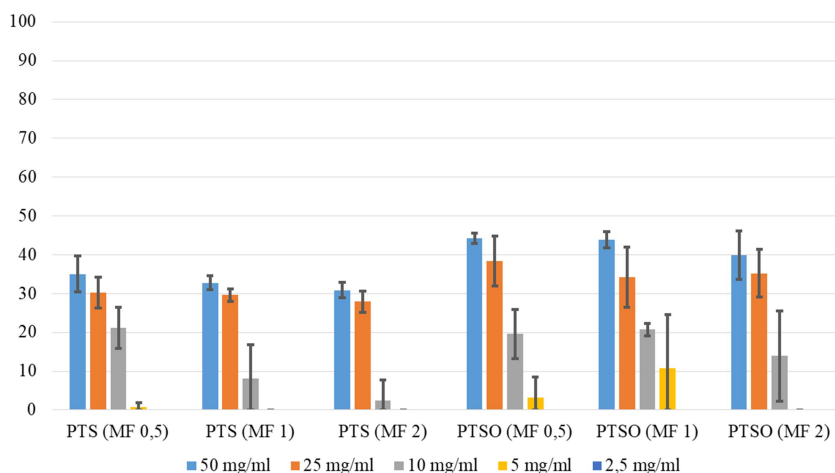
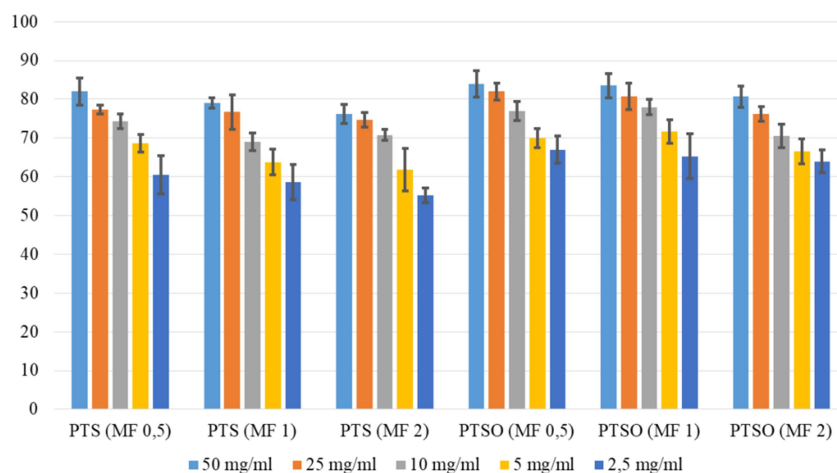
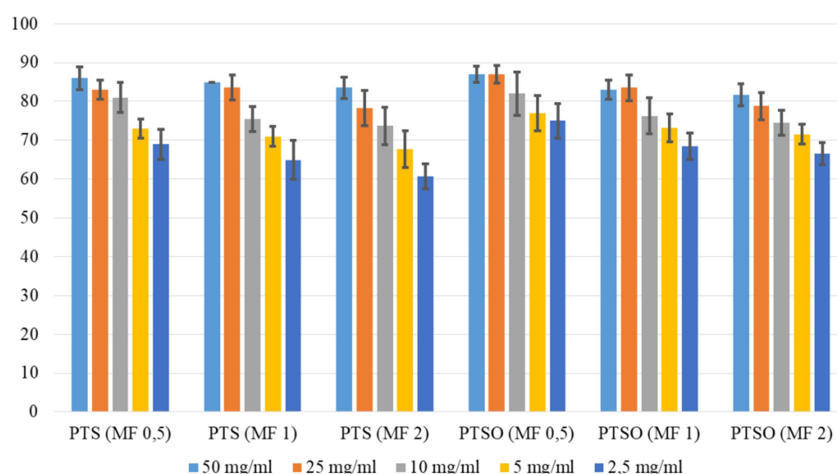


Figura 37. Diámetro ± desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *E. faecalis* ATCC 29212, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.



**Figura 38.** Diámetro  $\pm$  desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *C. albicans* ATCC 200955, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.



**Figura 39.** Diámetro  $\pm$  desviación estándar (en mm) de los halos de inhibición del crecimiento de *C. krusei* ATCC 6258, para cada concentración de PTS y PTSO, en cada uno de los inóculos ensayados.

Considerando el conjunto de microorganismos empleados en este estudio (a excepción de *P. aeruginosa* ATCC 27853, debido a la resistencia demostrada a ambos compuestos), la actividad antimicrobiana de PTSO fue significativamente superior a la de PTS, ya que, para un mismo inóculo microbiano y concentración de sustancia, los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento generados por la fase gaseosa de PTSO fueron significativamente mayores que los obtenidos a partir de PTS ( $p < 0,01$ , en todos los casos).

Estos resultados indicaron, por tanto, que la fase gaseosa de ambos compuestos, depositados sobre la tapa de la placa de Petri, alcanzó el medio de cultivo, pudiendo ser detectada y cuantificada en este. Los valores medios ( $\pm$

desviación estándar) de las tres determinaciones en las que se cuantificaron, mediante HPLC-UV, las concentraciones de PTS y PTSO alcanzadas en el medio Mueller-Hinton, a través de su fase gaseosa, se recogen en la tabla 38.

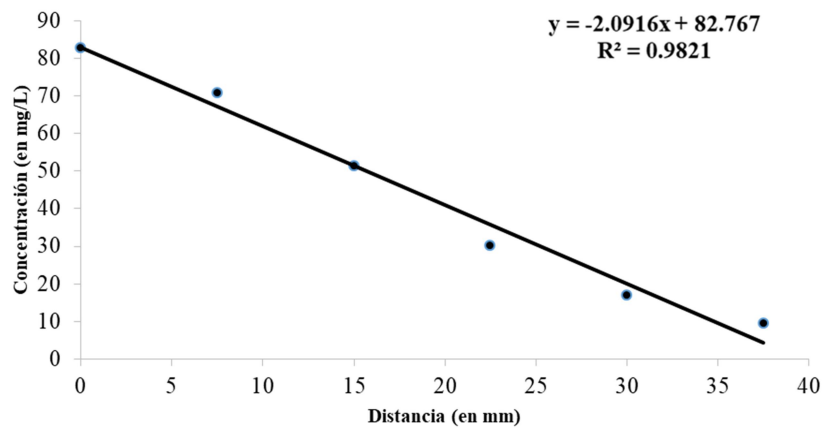
**Tabla 38.** Concentración media  $\pm$  desviación estándar (en mg/L) de PTS y PTSO alcanzada en el medio Mueller-Hinton en cada una de las muestras tomadas, en relación a la concentración inicial de cada sustancia en la gota depositada en la tapa de la placa de Petri.

		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
<b>PTS</b>	<b>50 mg/mL</b>	82,7 $\pm$ 0,1	70,8 $\pm$ 0,3	51,2 $\pm$ 0,1	30,2 $\pm$ 0,2	17,0 $\pm$ 0,3	9,4 $\pm$ 0,1
	<b>25 mg/mL</b>	68,6 $\pm$ 0,2	59,6 $\pm$ 0,1	42,4 $\pm$ 0,3	25,1 $\pm$ 0,2	12,4 $\pm$ 0,1	5,8 $\pm$ 0,2
	<b>10 mg/mL</b>	57,3 $\pm$ 0,2	48,6 $\pm$ 0,1	35,5 $\pm$ 0,1	22,1 $\pm$ 0,2	4,2 $\pm$ 0,1	<LD
	<b>5 mg/mL</b>	48,5 $\pm$ 0,2	36,4 $\pm$ 0,2	28,6 $\pm$ 0,3	8,5 $\pm$ 0,2	<LD	<LD
	<b>2,5 mg/mL</b>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
<b>PTSO</b>	<b>50 mg/mL</b>	28,6 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,2	20,9 $\pm$ 0,2	14,8 $\pm$ 0,1	9,9 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,2
	<b>25 mg/mL</b>	23,4 $\pm$ 0,2	18,6 $\pm$ 0,2	14,8 $\pm$ 0,2	12,7 $\pm$ 0,2	8,2 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1
	<b>10 mg/mL</b>	18,7 $\pm$ 0,1	15,8 $\pm$ 0,1	13,8 $\pm$ 0,1	12,9 $\pm$ 0,3	7,5 $\pm$ 0,1	<LD
	<b>5 mg/mL</b>	17,9 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,3	13,4 $\pm$ 0,2	7,5 $\pm$ 0,1	2,8 $\pm$ 0,3	<LD
	<b>2,5 mg/mL</b>	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

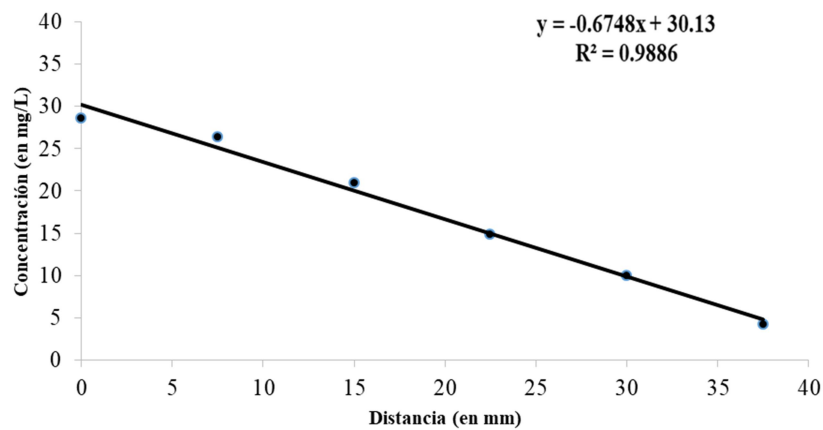
LD: Límite inferior de detección de la técnica HPLC-UV

La concentración más alta en todos los casos se alcanzó en la muestra 1, que coincidía con el centro de la placa, situada en la posición más vertical, justo encima de la gota depositada sobre la tapa. Conforme la muestra se alejó del centro (muestras 2 a 6), la concentración disminuyó, creando un gradiente desde la zona central de la placa (concentración más elevada) hacia su periferia (concentración más baja). En determinados casos, bien porque la concentración de la gota fuese pequeña (2,5 mg/mL) y/o porque la distancia al centro fuese mayor (muestra 6), la concentración alcanzada en el medio no se pudo cuantificar, por no alcanzar el límite inferior de detección de la técnica HPLC-UV.

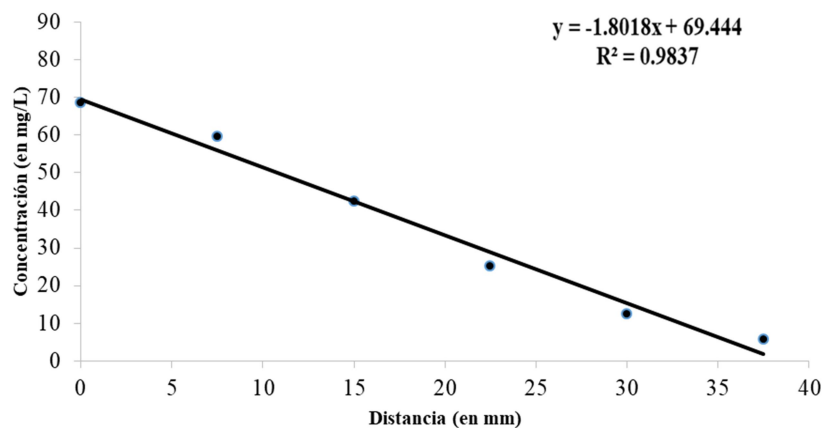
A partir de los resultados expuestos en la tabla 38 se confeccionaron las rectas de regresión lineal (figuras 40 a 47), que relacionan la distancia al centro de la placa (medida en mm) y la concentración que alcanzó PTS o PTSO en un punto determinado (en mg/L) según cada una de las concentraciones de la gota depositada sobre la tapa. Como se puede observar, existió una elevada correlación en todos los casos, lo que determinó la calidad del ajuste.



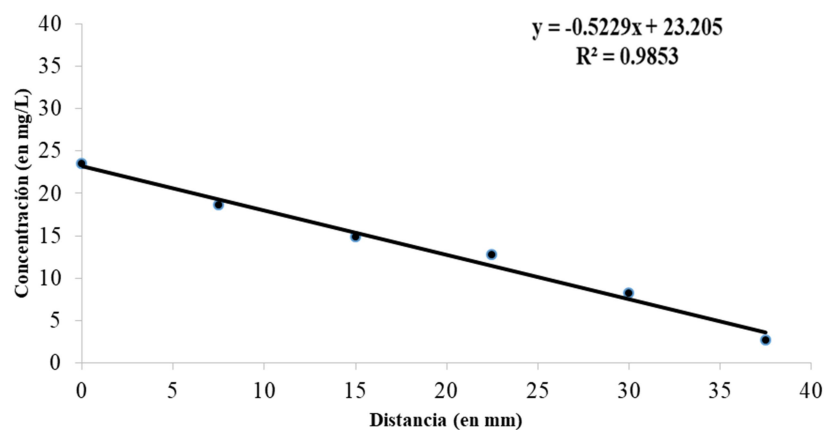
**Figura 40.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTS a una concentración de 50 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.



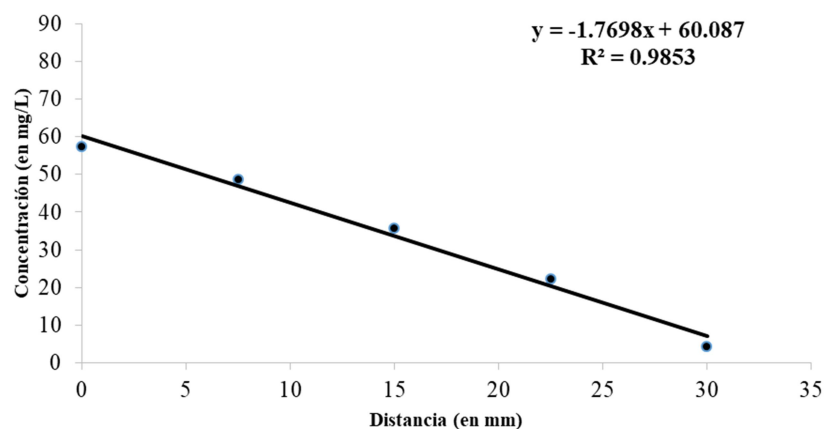
**Figura 41.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTSO a una concentración de 50 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.



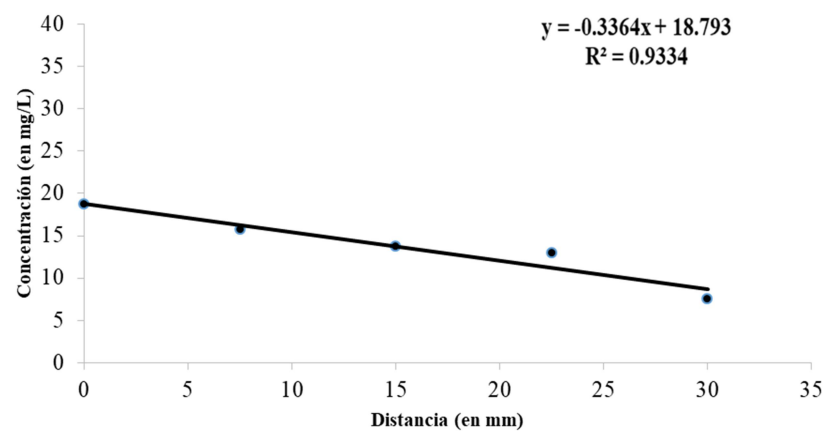
**Figura 42.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTS a una concentración de 25 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.



**Figura 43.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTSO a una concentración de 25 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.

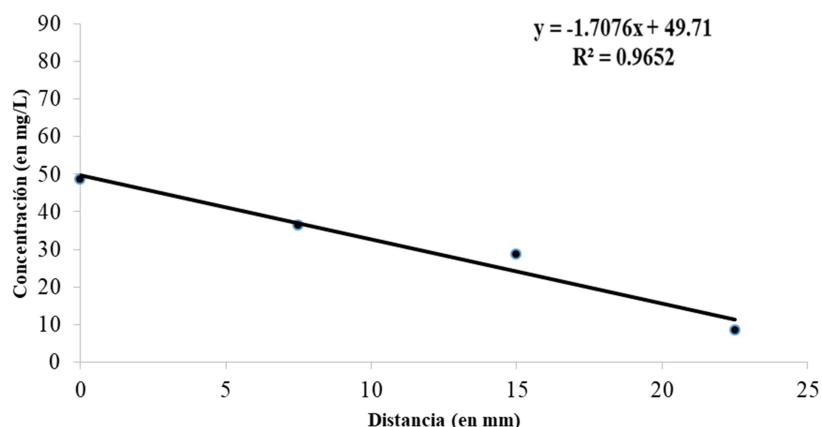


**Figura 44.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTS a una concentración de 10 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.

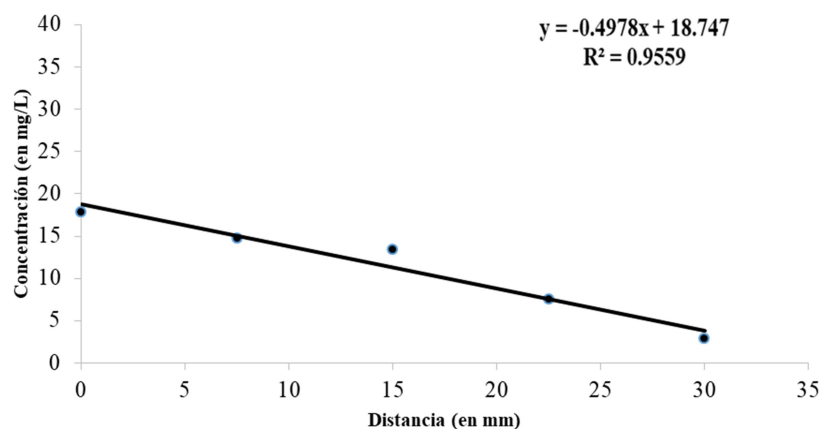


**Figura 45.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTSO a una concentración de 10 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.





**Figura 46.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTS a una concentración de 5 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.



**Figura 47.** Relación entre la distancia al centro y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado del medio Mueller-Hinton tras depositar 20  $\mu$ l de PTSO a una concentración de 5 mg/mL en la tapa de la placa de Petri.

La extrapolación de los valores de los radios de las zonas de inhibición del crecimiento microbiano en todos los ensayos realizados, para los diferentes microorganismos, inóculos y concentraciones, sobre cada una de las rectas de regresión lineal, indicaron el valor teórico de la concentración de PTS y PTSO que se alcanzó en la zona límite de inhibición del crecimiento, como se muestra en las tablas 39 y 40, respectivamente). Como se puede observar, las concentraciones de PTSO a las que se inhibió el crecimiento microbiano fueron inferiores a las de PTS ( $p < 0,01$ ), demostrando su mayor actividad antimicrobiana. Además, la inhibición del crecimiento de las levaduras en comparación con el de las bacterias, se produjo con concentraciones menores, con cualquiera de los dos compuestos.

**Tabla 39.** Valor medio  $\pm$  desviación estándar (en mg/L) de la concentración de PTS alcanzada en el límite de la zona de inhibición del crecimiento microbiano (radio del halo en mm) para cada uno de los microorganismos e inóculos microbianos ensayados

Microorganismo	Inóculo (McFarland)		Concentración de PTS			
			50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	Radio del halo	21,5	18	15,5	11,5
		Concentración	38,1 $\pm$ 3,3	36,9 $\pm$ 1,7	32,5 $\pm$ 1,4	30,3 $\pm$ 2,3
	1	Radio del halo	19,5	17	12,5	7
		Concentración	41,9 $\pm$ 2,1	38,5 $\pm$ 1,9	38,1 $\pm$ 5,0	37,8 $\pm$ 4,9
	2	Radio del halo	18,5	17	13,5	0
		Concentración	43,8 $\pm$ 1,8	38,8 $\pm$ 1,8	36,5 $\pm$ 2,6	$\geq$ 48,5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,5	Radio del halo	14	11	8,5	2,5
		Concentración	53,1 $\pm$ 3,4	49,4 $\pm$ 1,9	45,3 $\pm$ 1,6	45,2 $\pm$ 1,7
	1	Radio del halo	14	11,5	6	0
		Concentración	53,2 $\pm$ 4,0	48,8 $\pm$ 2,0	49,6 $\pm$ 2,5	$\geq$ 48,5
	2	Radio del halo	14	11	5,5	0,5
		Concentración	53,7 $\pm$ 3,7	49,4 $\pm$ 3,4	50,4 $\pm$ 2,9	$\geq$ 48,5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	Radio del halo	17,5	15	10,5	0,5
		Concentración	46,2 $\pm$ 4,9	42,2 $\pm$ 3,6	41,3 $\pm$ 4,6	$\geq$ 48,5
	1	Radio del halo	16,5	15	4	0
		Concentración	48,5 $\pm$ 1,8	42,8 $\pm$ 1,4	52,9 $\pm$ 7,7	$\geq$ 48,5
	2	Radio del halo	15,5	14	1,5	0
		Concentración	50,5 $\pm$ 2,0	44,3 $\pm$ 2,4	57,9 $\pm$ 4,7	$\geq$ 48,5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	Radio del halo	22,5	19,5	15,5	14
		Concentración	36,1 $\pm$ 3,7	34,0 $\pm$ 2,9	32,8 $\pm$ 2,1	26,1 $\pm$ 2,0
	1	Radio del halo	21	19	14,5	5,5
		Concentración	39,4 $\pm$ 1,9	35,4 $\pm$ 2,2	34,2 $\pm$ 1,8	40,6 $\pm$ 8,8
	2	Radio del halo	19,5	17	12,5	6
		Concentración	42,3 $\pm$ 2,2	38,6 $\pm$ 1,9	38,0 $\pm$ 2,5	39,1 $\pm$ 6,1
<i>C. albicans</i> ATCC 200955	0,5	Radio del halo	41	38,5	37	34,5
		Concentración	$\leq$ 9,4	$\leq$ 5,8	$\leq$ 4,2	$\leq$ 8,5
	1	Radio del halo	39,5	38,5	34,5	32
		Concentración	$\leq$ 9,4	$\leq$ 5,8	$\leq$ 4,2	$\leq$ 8,5
	2	Radio del halo	38	37,5	35,5	31
		Concentración	$\leq$ 9,4	$\leq$ 5,8	$\leq$ 4,2	$\leq$ 8,5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,5	Radio del halo	43	41,5	40,5	36,5
		Concentración	$\leq$ 9,4	$\leq$ 5,8	$\leq$ 4,2	$\leq$ 8,5
	1	Radio del halo	42,5	42	37,5	35,5
		Concentración	$\leq$ 9,4	$\leq$ 5,8	$\leq$ 4,2	$\leq$ 8,5
	2	Radio del halo	42	36	37	34
		Concentración	$\leq$ 9,4	$\leq$ 5,8	$\leq$ 4,2	$\leq$ 8,5

Radio: valor medio (en mm) del radio de los halos de inhibición del crecimiento para los 10 ensayos realizados con cada microorganismo, inóculo, concentración y compuesto (ver tabla 36)

**Tabla 40.** Valor medio  $\pm$  desviación estándar (en mg/L) de la concentración de PTSO alcanzada en el límite de la zona de inhibición del crecimiento microbiano (radio del halo en mm) para cada uno de los microorganismos e inóculos microbianos ensayados

Microorganismo	Inóculo (McFarland)		Concentración de PTSO			
			50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,5	Radio del halo	28	26	23	15,5
		Concentración	11,3 $\pm$ 0,9	9,5 $\pm$ 0,9	11,1 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 2,7
	1	Radio del halo	26,5	24,5	17,5	12,5
		Concentración	12,2 $\pm$ 1,5	10,4 $\pm$ 0,5	12,9 $\pm$ 1,5	12,4 $\pm$ 0,7
	2	Radio del halo	23,5	21	14,5	7
		Concentración	14,2 $\pm$ 1,7	12,2 $\pm$ 2,3	13,8 $\pm$ 0,9	15,2 $\pm$ 1,0
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0,5	Radio del halo	15	12,5	7,5	2,5
		Concentración	19,9 $\pm$ 0,5	16,7 $\pm$ 0,6	16,3 $\pm$ 0,4	17,6 $\pm$ 0,6
	1	Radio del halo	13,5	11	8	1,5
		Concentración	20,9 $\pm$ 0,8	17,4 $\pm$ 0,7	16,1 $\pm$ 0,6	18,0 $\pm$ 0,7
	2	Radio del halo	14	13	9	0,5
		Concentración	20,7 $\pm$ 0,4	16,5 $\pm$ 0,6	15,8 $\pm$ 0,6	$\geq$ 17,9
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0,5	Radio del halo	22	19	10	1,5
		Concentración	15,2 $\pm$ 0,5	13,2 $\pm$ 1,7	15,5 $\pm$ 1,1	18,0 $\pm$ 1,3
	1	Radio del halo	22	17	10,5	5,5
		Concentración	15,4 $\pm$ 0,7	14,3 $\pm$ 2,0	15,3 $\pm$ 0,3	16,1 $\pm$ 3,5
	2	Radio del halo	20	17,5	7	0
		Concentración	16,7 $\pm$ 2,1	14,0 $\pm$ 1,6	16,5 $\pm$ 2,0	$\geq$ 17,9
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5	Radio del halo	28	26,5	25	15,5
		Concentración	11,3 $\pm$ 0,7	9,3 $\pm$ 0,5	10,4 $\pm$ 0,4	10,9 $\pm$ 2,6
	1	Radio del halo	27,5	26	23,5	10,5
		Concentración	11,7 $\pm$ 1,0	9,5 $\pm$ 0,7	10,9 $\pm$ 0,5	13,5 $\pm$ 1,8
	2	Radio del halo	25	26	14,5	9,5
		Concentración	13,3 $\pm$ 1,7	11,1 $\pm$ 0,7	13,8 $\pm$ 2,3	14,0 $\pm$ 1,1
<i>C. albicans</i> ATCC 200955	0,5	Radio del halo	42	41	38,5	35
		Concentración	$\leq$ 4,2	$\leq$ 2,6	$\leq$ 7,5	$\leq$ 2,8
	1	Radio del halo	42	40,5	39	36
		Concentración	$\leq$ 4,2	$\leq$ 2,6	$\leq$ 7,5	$\leq$ 2,8
	2	Radio del halo	40,5	38	35,5	33,5
		Concentración	$\leq$ 4,2	$\leq$ 2,6	$\leq$ 7,5	$\leq$ 2,8
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0,5	Radio del halo	43,5	43,5	41	38,5
		Concentración	$\leq$ 4,2	$\leq$ 2,6	$\leq$ 7,5	$\leq$ 2,8
	1	Radio del halo	41,5	42	38	36,5
		Concentración	$\leq$ 4,2	$\leq$ 2,6	$\leq$ 7,5	$\leq$ 2,8
	2	Radio del halo	41	39,5	37,5	36
		Concentración	$\leq$ 4,2	$\leq$ 2,6	$\leq$ 7,5	$\leq$ 2,8

Radio: valor medio (en mm) del radio de los halos de inhibición del crecimiento para los 10 ensayos realizados con cada microorganismo, inóculo, concentración y compuesto (ver tabla 37)



## 5. DISCUSIÓN





---

### 5.1. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PTS Y PTSO

La preocupación por la transmisión de bacterias resistentes a través de la cadena alimentaria llevó a la Unión Europea a prohibir, desde el año 2006, el uso de antibióticos como promotores del crecimiento del ganado (European Commission, 2003). Por ese motivo, actualmente se emplean aditivos alternativos de origen natural, incluyendo probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos y extractos de plantas con esta finalidad. De esta forma, se evita el uso indiscriminado de antibióticos en animales, que ha sido uno de los factores más directamente implicados en el incremento de las infecciones por este tipo de bacterias, también en el ser humano (Dibner y Richards, 2005).

Entre los diferentes compuestos naturales, los derivados organosulfurados obtenidos a partir de plantas del género *Allium*, como PTS y PTSO, se han propuesto como una alternativa eficaz a los antibióticos para mejorar el rendimiento y prevenir infecciones en animales. Además, se ha comprobado que suplementar la alimentación animal con estos compuestos mejora la digestión y absorción de los nutrientes en el tracto gastrointestinal, por su capacidad de modificar la microbiota intestinal, de modificar el perfil de ácidos grasos presentes en el rumen, de mejorar la digestibilidad de los nutrientes, e incluso de estimular el sistema inmunológico de animales como pollos, pavos, cabras, cerdos o vacas (Kim y cols., 2013; Martínez-Fernández y cols., 2013; Peinado y cols., 2012; Peinado y cols., 2013; Ruiz y cols., 2010).

Por otro lado, estos compuestos están siendo utilizados como conservantes alimentarios, sustituyendo a otros aditivos que también inhiben el crecimiento microbiano, pero que exhiben mayor toxicidad, como el sorbato de potasio y el benzoato de sodio, entre otros (Abd-Elhakim y cols., 2020).

La recomendación del empleo de este tipo de compuestos, especialmente PTSO, se debe a varias razones. Por un lado, presentan mayor estabilidad química que otras sustancias de origen natural, incluso que algunas también derivadas de *Allium*, como alicina (Abad y cols., 2015). En segundo lugar, el empleo de PTS y PTSO como promotores del crecimiento y como conservantes alimentarios viene precedido de estudios de seguridad, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, que han indicado que no producen efectos tóxicos importantes a las concentraciones que se utilizan en la alimentación del ganado y en los procesos de envasado de alimentos (Lira y cols.,

2020; Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015; Mellado-García y cols., 2015; Mellado-García y cols., 2016a; Mellado-García y cols., 2016b). Por último, han demostrado actividad antimicrobiana frente a una amplia selección de bacterias como enterobacterias, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Vibrio* spp. o *Campylobacter* spp. (Llana-Ruiz-Cabello y cols., 2015; Peinado y cols., 2012; Ruiz y cols., 2010).

En relación a esta última propiedad, los estudios sobre la actividad antimicrobiana de estos compuestos se han centrado en microorganismos aislados a partir de muestras animales o alimentarias. Además de las aplicaciones actuales en el ámbito de la ganadería y la alimentación, es posible que estas moléculas puedan tener utilidad en la práctica clínica humana, puesto que las aliáceas se han empleado tradicionalmente por sus propiedades antibacterianas, antioxidantes y cardiovasculares, desde hace siglos (Harris y cols., 2001). Sin embargo, uno de los problemas que plantean los estudios realizados sobre la actividad antimicrobiana de PTS y PTSO, así como de otros compuestos derivados de *Allium* spp., es que, en la mayoría de los casos, no se ha seguido un procedimiento de estudio único y estandarizado que permita cuantificar esa actividad y comparar el efecto de estas sustancias entre sí y, lo que es más importante, con los antimicrobianos que se usan habitualmente en terapia humana.

Para dar respuesta a estas dos últimas cuestiones, en el presente trabajo se evaluó la actividad de PTS y PTSO frente a una selección de bacterias y levaduras aisladas a partir de muestras clínicas humanas, y se comparó con la actividad *in vitro* que, frente a estos mismos microorganismos, presentaron diferentes antibióticos y antifúngicos. Todos los ensayos se realizaron de acuerdo con el procedimiento de microdilución en caldo Mueller-Hinton recomendado por CLSI, puesto que, aunque no existen puntos de corte para definir la sensibilidad o resistencia de una bacteria frente a PTS o PTSO, realizar el ensayo en las mismas condiciones que el resto de antimicrobianos y cuantificar la actividad antibacteriana y antifúngica en términos de CMI, CMB y CMF, permite hacer comparaciones entre todos ellos.



### 5.1.1. Actividad antibacteriana

Partiendo de la premisa de que la selección de los aislados bacterianos del presente trabajo se realizó en base a la condición, previamente establecida, de la presencia de resistencia a, al menos, un grupo de antibióticos comúnmente utilizados en el tratamiento de las infecciones humanas, es evidente que los valores de CMI y CMB obtenidos para estos antibióticos, así como las tasas de resistencia de los aislados clínicos se encuentran sobredimensionados respecto a la realidad clínica de nuestro entorno sanitario.

Un porcentaje importante de las enterobacterias seleccionadas fueron resistentes a los antibióticos betalactámicos (a excepción de los carbapenémicos), a fluoroquinolonas y a cotrimoxazol y, en menor medida, a aminoglucósidos y nitrofurantoína. Hasta un 22,8% de las enterobacterias fueron resistentes, al mismo tiempo, a antibióticos pertenecientes a estas familias, lo que supone una disminución considerable de las opciones terapéuticas para hacer frente a las infecciones producidas por estos microorganismos.

Una de las causas que explica la elevada tasa de enterobacterias resistentes a betalactámicos fue la presencia de BLEEs en el 55,1% de los aislados de *E. coli* y *Klebsiella* spp., un mecanismo de resistencia muy prevalente en nuestro medio. Estudios recientes, realizados por nuestro grupo, sobre evolución de la resistencia bacteriana en el área sanitaria de Granada en la última década, han puesto de manifiesto que más del 10% de los aislados clínicos de estas especies, obtenidos a partir de muestras de orina en población adulta, tanto de origen comunitario como hospitalario, fueron productoras de estas betalactamasas (Jiménez-Guerra y cols., 2018a; Sánchez-García y cols., 2019; Sorlózano y cols., 2014), mientras que apenas se detectan algunos casos entre la población infantil (Sorlózano-Puerto y cols., 2017). La presencia de estas enzimas no solo explica la resistencia a determinados grupos de betalactámicos (penicilinas y cefalosporinas, fundamentalmente), cuya actividad se ve afectada directamente, sino que se asocia con gran frecuencia a la expresión de determinantes de resistencia a otros antibióticos (aminoglucósidos, fluoroquinolonas, cotrimoxazol, nitrofurantoína), configurando un fenotipo de multirresistencia que complica las opciones terapéuticas frente a las infecciones causadas por estos patógenos (Sorlózano y cols., 2007a). Aunque la presencia de BLEEs fue el fenotipo de

resistencia más frecuente frente a antibióticos betalactámicos, en consonancia con la realidad epidemiológica de nuestro entorno, en el grupo de enterobacterias diferentes a *E. coli*, *Klebsiella* spp., *S. enterica* y *Y. enterocolitica*, se observó una mayor tasa de resistencia a carbapenémicos, que estuvo en relación a la resistencia que habitualmente expresan bacterias como *Proteus* spp. y *Providencia* spp. Ninguna de las enterobacterias incluidas en el estudio expresó resistencia por producción de carbapenemasas, aunque esta posibilidad cabe contemplarla en un futuro próximo, debido al incremento de la prevalencia de estas bacterias, también en nuestra área sanitaria (Sorlózano-Puerto y cols., 2016).

Los resultados obtenidos revelan que PTS posee una actividad moderada frente a bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, con valores de CMI<sub>50</sub> (y CMB<sub>50</sub>) y CMI<sub>90</sub> (y CMB<sub>90</sub>) que oscilan en un rango entre 128 mg/L y 512 mg/L. Sin embargo, PTSO fue más activo, con valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> entre 64 mg/L y 128 mg/L frente a la mayoría de enterobacterias, y valores de CMB<sub>50</sub> y CMB<sub>90</sub> oscilando entre 128 mg/L y 512 mg/L. Estos resultados, con rangos estrechos entre los valores de CMI y CMB y valores homogéneos entre los diferentes grupos de enterobacterias, independientemente de la resistencia mostrada a los antibióticos comúnmente utilizados en la práctica clínica, ponen de manifiesto la actividad bactericida de estos compuestos. De igual forma, los resultados obtenidos en el trabajo de Ruiz y cols. (2010) también demostraron el efecto bactericida de PTS y PTSO frente a enterobacterias como *E. coli* y *S. enterica* serotipo Typhimurium.

Entre los cocos grampositivos, el 45,5% de los aislados clínicos de *S. aureus* resistentes a metilina también fueron resistentes a aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos y lincosamidas. Este fenotipo de multiresistencia supone un problema para el abordaje de las infecciones producidas por este patógeno, ya que reduce a unos cuantos antibióticos, de uso exclusivamente hospitalario (vancomicina, linezolid, daptomicina, tigeciclina) las posibilidades terapéuticas (Sorlózano y cols., 2009; Sorlózano y cols., 2007b). Aunque al contrario de lo que ocurre con *S. aureus*, la presencia de resistencias antibióticas en aislados clínicos de *E. faecalis* y *S. agalactiae* es un fenómeno menos frecuente, la prevalencia de resistencias a fluoroquinolonas entre los primeros, y a macrólidos y lincosamidas entre

los segundos, supone también una disminución de las opciones terapéuticas frente a estos patógenos (Sorlózano y cols., 2007b; Sorlózano y cols., 2014).

La actividad de PTS y PTSO frente a *S. aureus*, *E. faecalis* y *S. agalactiae* fue superior a la observada frente a enterobacterias, especialmente en el caso de PTSO (CMI<sub>50</sub> = 8 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 8 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 32 mg/L, CMB<sub>90</sub> = 64 mg/L, en *S. aureus*; CMI<sub>50</sub> = 4 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 8 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 8 mg/L, CMB<sub>90</sub> = 16 mg/L, en *E. faecalis* y *S. agalactiae*). Algunos autores señalan a las diferencias en la estructura de la pared celular como responsable de que las bacterias grampositivas sean más sensibles a los compuestos organosulfurados derivados de *Allium* spp. que las gramnegativas. Es posible que el acceso de estas sustancias al interior de la bacteria se vea favorecido en las primeras por la ausencia de una membrana externa (Chikwem y cols., 2008; Ismail y cols., 2013).

Además, los resultados obtenidos indican que estos compuestos podrían tener un efecto bacteriostático frente a bacterias grampositivas, al menos a bajas concentraciones, lo que abre la posibilidad de evaluar probables efectos sinérgicos de estos compuestos con otros antibióticos. Así, algunos trabajos con alicina han informado que este derivado posee un efecto bacteriostático frente a enterococos, e incluso un efecto sinérgico con vancomicina, hecho que es especialmente importante en el caso de aquellos aislados resistentes a este antibiótico (Jonkers y cols., 1999).

El 55,6% de los bacilos gramnegativos no fermentadores fueron resistentes, al mismo tiempo, a betalactámicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Si bien, como se ha comentado previamente para otras bacterias, estas tasas elevadas de resistencia son consecuencia del criterio de selección de los aislados clínicos, estudios recientes en nuestro entorno hospitalario establecen que más del 20% de los aislados clínicos de *P. aeruginosa* y hasta el 70% de *Acinetobacter* spp. son resistentes a estas familias de antibióticos (Sánchez-García y cols., 2019).

En contraste con los resultados obtenidos frente a los anteriores grupos, e incluso frente a otras bacterias no fermentadoras de la glucosa como *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp. y *Stenotrophomonas* spp., PTS y PTSO se mostraron poco activos frente a *P. aeruginosa*, con los valores de CMI y CMB más elevados de entre todas las bacterias ensayadas (CMI<sub>50</sub> = 1024 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 2048 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 2048 mg/L, CMB<sub>90</sub> = 2048 mg/L, para PTS; CMI<sub>50</sub> = 512 mg/L, CMI<sub>90</sub> = 1024 mg/L, CMB<sub>50</sub> = 512

mg/L, CMB<sub>90</sub> = 2048 mg/L, para PTSO). Estos valores de CMI son tan elevados que posiblemente serían necesarias grandes concentraciones de estos compuestos en el foco de infección, lo que seguramente no sería viable desde un punto de vista terapéutico (Abubakar, 2009; Muller y cols., 2016). Al igual que ocurre con numerosos antibióticos, es posible que PTS y PTSO puedan verse afectados por los mecanismos de expulsión activa característicos de esta especie bacteriana; sin embargo, para determinar con certeza los mecanismos involucrados en la mayor resistencia de este patógeno a estos compuestos son necesarios nuevos estudios.

Considerando todas las bacterias seleccionadas, en general, los valores de CMI obtenidos para los productos derivados de *Allium* spp. son más elevados que los observados entre los antibióticos de uso clínico convencional, lo que, a priori, reduciría considerablemente su utilidad en terapéutica humana. Sin embargo, debido a que los comités internacionales para el estudio de la sensibilidad antibiótica de los microorganismos como CLSI o EUCAST no poseen puntos de corte definidos para este tipo de sustancias, no se puede llegar aún a una conclusión definitiva al respecto.

En correspondencia con la necesidad de descubrir nuevos productos naturales potencialmente antibacterianos, la actividad de estos compuestos organosulfurados puede considerarse prometedora. Además, el uso de compuestos naturales y potencialmente inocuos, que pueden administrarse sin grandes restricciones, nos brinda la posibilidad de discutir la viabilidad de su aplicación para el tratamiento de patologías infecciosas específicas, siempre que se desarrollen formulaciones adecuadas. No obstante, se requieren más estudios sobre las características farmacocinéticas y toxicológicas antes de considerar un uso clínico seguro.

### **5.1.2. Actividad antifúngica**

Las enfermedades fúngicas invasivas de origen nosocomial o asociadas a cuidados de la salud, especialmente las producidas por *Candida* spp., se han convertido en un importante problema sanitario, ya que se asocian a elevadas tasas de morbi-mortalidad. Aunque las infecciones candidiásicas del tracto urinario y las infecciones vulvo-vaginales son procesos habitualmente leves, tienen una mayor incidencia entre la población y pueden ser el origen de infecciones más graves y diseminadas en pacientes con enfermedades de base (Miceli y cols., 2011). De igual

---

modo, la colonización de la piel y las mucosas por estas levaduras es un factor de riesgo para el desarrollo de candidiasis invasivas en pacientes ingresados, especialmente en UCI, como consecuencia de diversos factores de riesgo, como pueden ser, entre otros, la manipulación por personal sanitario colonizado, el cateterismo venoso, el sondaje urinario, el uso de antibióticos de amplio espectro, el tiempo prolongado de estancia, la ventilación mecánica o la nutrición parenteral (Kucukates y cols., 2016).

Junto al incremento de la prevalencia de infecciones por levaduras del género *Candida*, actualmente se describe un importante aumento de las tasas de resistencia a antifúngicos de uso habitual en clínica humana (polienos, azoles y equinocandinas, fundamentalmente), tanto en *C. albicans*, como en otras especies no-*albicans*, lo que dificulta el abordaje preventivo y terapéutico de estas infecciones y hace recomendable investigar nuevas terapias alternativas a los tratamientos convencionales, con mecanismos de acción fungicida diferentes y/o sinérgicos, y menos efectos secundarios (Alexander y cols., 2013; Castanheira y cols., 2014; Cretella y cols., 2016; Wang y cols., 2015).

En este contexto, los tiosulfatos derivados de *Allium* spp., como la alicina, han mostrado una amplia actividad antifúngica en numerosos estudios *in vitro* frente a levaduras del género *Candida* (An y cols., 2009; Khodavandi y cols., 2010; Khodavandi y cols., 2011b). En el presente trabajo, los valores de CMI de los antifúngicos ensayados frente a *Candida* spp. estuvieron en los valores esperados, similares a los obtenidos en otras publicaciones previas, tanto en nuestro entorno clínico (Heras-Cañas y cols., 2015; Jiménez-Guerra y cols., 2018b) como en zonas geográficas más alejadas (Aigner y cols., 2017; Alfouzan y cols., 2017; Cretella y cols., 2016; Oz y Gokbolat, 2018; Siqueira y cols., 2018). Las CMIs más bajas se observaron en *C. albicans* y *C. tropicalis*, mientras que los valores más elevados fueron para *C. glabrata* y *C. krusei*, especialmente en el caso de los azoles, lo que indica que, en nuestro medio, las especies de *Candida* permanecen sensibles a los antifúngicos de uso habitual en clínica humana (salvo por la resistencia habitual de *C. glabrata* y *C. krusei* a los azoles) y no representan un problema relevante para el abordaje terapéutico.

De igual modo, nuestros resultados demuestran que PTS y PTSO tienen una actividad antifúngica significativa frente a aislados clínicos de *Candida* spp., aunque su

actividad no sea comparable a antifúngicos como anfotericina B, equinocandinas o azoles, al menos en aquellas especies que se muestran claramente sensibles a estos. Se han propuesto diferentes mecanismos de acción para explicar el efecto antifúngico de estas moléculas. Los mecanismos más directamente asociados con el daño celular y la disminución de la capacidad de crecimiento del hongo son la capacidad de modificar enzimas esenciales en el metabolismo fúngico, inducir estrés oxidativo, alterar los lípidos dañando la integridad de las membranas celulares (incluidos los orgánulos citoplasmáticos, como las mitocondrias o las vacuolas) y modificar la expresión de algunos genes (Khodavandi y cols., 2011a; Khodavandi y cols., 2011b).

Aunque los resultados preliminares del presente trabajo proporcionan información básica y útil sobre el uso potencial de PTS y PTSO en el tratamiento de infecciones candidiásicas causadas por levaduras resistentes a múltiples fármacos (tales como infecciones del tracto urinario aplicadas por instilación intravesical o infecciones vulvovaginales utilizadas tópicamente) o en la prevención de las infecciones candidiásicas en pacientes ingresados (profilaxis en pacientes colonizados por *Candida* spp.) es necesario seguir trabajando para demostrar la efectividad de estos compuestos con un grupo más diverso y más grande de hongos y modelos *in vivo* (Ebrahimi y cols., 2015). Si bien estos resultados pueden avalar su uso terapéutico, al igual que se comentó sobre la actividad antibacteriana, la ausencia de puntos de corte definidos por los comités internacionales (CLSI, EUCAST) para este tipo de sustancias no permite extraer conclusiones definitivas. Además, se requiere un mayor conocimiento de sus características farmacocinéticas y toxicológicas antes de considerar un uso clínico seguro.

## **5.2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DE LA FASE GASEOSA DE PTS Y PTSO**

Una de las características principales de los compuestos organosulfurados obtenidos a partir de plantas del género *Allium* es su volatilidad, que les hace responsables del aroma que desprenden, especialmente cuando son machacadas o trituradas. Ante la escasez de antimicrobianos volátiles disponibles para uso clínico en humanos, estas moléculas podrían ser consideradas una alternativa (solas o combinadas con otros fármacos) para el tratamiento de infecciones pulmonares por

vía inhalatoria, en lugar de la administración oral o parenteral (Reiter y cols., 2017). Sin embargo, aún son escasos los trabajos que han evaluado la actividad de las mismas a través de su fase gaseosa y la aplicabilidad que ello podría tener (Curtis y cols., 2004; Leontiev y cols., 2018; Reiter y cols., 2017).

En el presente trabajo, PTS y PTSO mostraron una elevada actividad bactericida y fungicida a través de su fase gaseosa, inhibiendo el crecimiento de 6 de los 7 microorganismos seleccionados (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 200955 y *C. krusei* ATCC 6258, pero no a *P. aeruginosa* ATCC 27853), lo que, como ya se ha señalado previamente, sugiere que estas sustancias probablemente sean menos activas frente a *P. aeruginosa* que frente a otros patógenos y que habría que alcanzar concentraciones muy elevadas en el foco de la infección para ser efectivos frente a esta bacteria (Abubakar, 2009; Müller y cols., 2016).

Sin embargo, la actividad microbicida de estos compuestos no fue igual frente a ambos tipos de microorganismos. El efecto antifúngico fue superior al efecto antibacteriano (los halos de inhibición del crecimiento fueron significativamente mayores en *C. albicans* ATCC 200955 y *C. krusei* ATCC 6258 comparándolos con los obtenidos frente a las bacterias). La mayor actividad de estos compuestos sobre las levaduras también se observó, como hemos visto previamente, cuando comparamos los resultados sobre sensibilidad antifúngica en términos de CMI: los valores de CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de PTS y PTSO fueron inferiores en el caso de las levaduras en comparación con las bacterias. Según algunos estudios, es posible que la presencia de una pared celular fúngica más permeable a estos compuestos que la pared de peptidoglucano de la bacteria, permita este efecto citotóxico a dosis más bajas (Lemar y cols., 2002). Por otro lado, la fase gaseosa de PTSO se mostró más activa que la de PTS frente a todos los microorganismos evaluados (a excepción de *P. aeruginosa*), ya que los halos de inhibición del crecimiento fueron significativamente mayores para PTSO que para PTS en todos los casos. Esta mayor actividad antimicrobiana de PTSO respecto a PTS ya se había observado también en las técnicas de microdilución, como se ha comentado anteriormente.

Como indicaron Leontiev y cols. (2018), a pesar de la ausencia de contacto directo de los compuestos organosulfurados con el agar y con el microorganismo,

cuando se estudia el efecto antimicrobiano a través de la fase gaseosa o vapor que desprenden estos compuestos, sorprende que los halos de inhibición del crecimiento microbiano sean tan claros y los bordes estén tan definidos. Su interpretación, así como la nuestra, es que esto podría ser debido a la existencia de un gradiente de concentración desde la zona del agar que se encuentra más cercana a la gota, justamente en su cénit, hasta la periferia, más alejada. En nuestro estudio, la cuantificación de la concentración de PTS y PTSO en el agar permitió confirmar esta sospecha, mostrando que existe una relación lineal inversa entre la distancia al centro del medio de cultivo y la concentración alcanzada por la fase gaseosa en un punto determinado.

De los resultados obtenidos en el presente estudio, así como de otros trabajos (Leontiev y cols., 2018; Reiter y cols., 2017; Shadkchan y cols., 2004) se puede desprender que sería posible la utilización de compuestos organosulfurados derivados de *Allium spp.*, como PTS y, sobre todo, por su mayor actividad, PTSO, en el tratamiento de infecciones pulmonares, gracias a su elevada volatilidad, a través de la administración inhalada, ejerciendo su efecto directamente en el pulmón. Una ventaja que facilitaría su uso clínico es que estas sustancias son percibidos como inofensivas, ya que se encuentran de forma natural en alimentos como la cebolla, que se consume ampliamente en la mayoría de las culturas. Entre las desventajas estaría la necesidad de mejorar los procedimientos de extracción para preservar sus propiedades biológicas, evitando la pérdida de las mismas como consecuencia de fenómenos como el calentamiento o su conservación durante largo tiempo, y evitar el fuerte sabor y olor que desprenden.

Sin embargo, debido a que el efecto microbicida es directamente proporcional a la concentración de PTS y PTSO utilizada, no se puede obtener una conclusión definitiva sobre la eficacia de este tratamiento sin evaluar la posible toxicidad sobre las células pulmonares humanas. Es posible que la dosis necesaria para poder ejercer el efecto esperado *in vivo* sea tan elevada que genere consecuencias tóxicas indeseables. Como se indicaba en el trabajo de Reiter y cols. (2017), tal vez se podría plantear el uso de concentraciones más bajas y menos tóxicas concomitantemente con otros antibióticos o antifúngicos si se demostrase que existe efecto sinérgico. En este sentido, se ha comprobado que los tiosulfatos presentan efecto sinérgico con



antibióticos como ampicilina, piperacilina-tazobactam, levofloxacino, gentamicina, amikacina, azitromicina, vancomicina, doxiciclina o polimixina B (Abouelfetouh y Moussa, 2012; Jonkers y cols., 1999; Ogita y cols., 2007; Pillai y cols., 2013; Yalindag-Ozturk y cols., 2011) y con antifúngicos como azoles (Guo y cols., 2010; Khodavandi y cols., 2010) o anfotericina B (An y cols., 2009). La posible utilidad clínica de estas sustancias a concentraciones bajas, por vía inhalatoria y en combinación con otros antimicrobianos, requiere de más estudios *in vitro* y en modelos animales y/o humanos.

Por último, hay que considerar que la metodología empleada para el estudio del efecto antimicrobiano que pudiera ejercer la fase gaseosa de PTS y PTSO no está estandarizada, por lo que no se puede establecer una correlación directa entre los resultados obtenidos y la posible utilidad terapéutica en humanos. Además, en el presente trabajo no se ha evaluado la inestabilidad de los derivados organosulfurados ni, como consecuencia de esta, la posible pérdida de actividad de PTS y PTSO con el transcurso del tiempo o con el aumento de la temperatura, que otros autores han descrito previamente (Curtis y cols., 2004), y que serían factores que podrían reducir su utilidad clínica. Nuevamente, también en este caso se requieren más estudios para comprender los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, la estandarización de la dosis y las vías de administración, así como la posible toxicidad en modelos humanos antes de considerar un uso clínico seguro.



## **6. CONCLUSIONES**





1. Propilpropano tiosulfonato (PTS) y propilpropano tiosulfonato (PTSO) demostraron actividad *in vitro* frente a aislados clínicos de enterobacterias y bacilos gramnegativos no fermentadores resistentes a antibióticos betalactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, cotrimoxazol y/o nitrofurantoína, si bien, la actividad de ambos compuestos frente a *Pseudomonas aeruginosa* se vio significativamente reducida en comparación con el resto de bacterias.
2. PTS y PTSO también se mostraron activos frente a aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, macrólidos y/o lincosamidas, *Enterococcus faecalis* resistentes a levofloxacino y *Streptococcus agalactiae* resistentes a eritromicina y/o clindamicina. Esta actividad fue significativamente superior a la observada frente a las bacterias gramnegativas.
3. Ambos compuestos también demostraron actividad antifúngica significativa frente a aislados clínicos de *Candida* spp., incluidas las especies resistentes a azoles. En términos de concentración mínima inhibitoria, la actividad antifúngica fue superior a la actividad antibacteriana.
4. En todos los casos, la actividad antibacteriana y antifúngica de PTSO fue significativamente superior a la de PTS.
5. PTS y, especialmente PTSO, mostraron actividad antimicrobiana a través de su fase gaseosa. Sin embargo, para poder establecer la eficacia real del vapor desprendido de estas moléculas son necesarios nuevos ensayos *in vivo* que permitan determinar la concentración que alcanzan en el tejido pulmonar cuando se administran por vía inhalatoria.
6. Nuestros resultados proporcionan una información básica y preliminar sobre el potencial de estas sustancias en la prevención o el tratamiento de infecciones humanas, especialmente aquellas en las que las opciones terapéuticas actuales son escasas, siempre que se desarrollen formulaciones adecuadas a la vía de administración y se garantice un uso clínico seguro.



## 7. BIBLIOGRAFÍA







- Aala, F.;** Yusuf, U. K.; Khodavandi, A; Jamal, F. (2010). *In vitro* antifungal activity of allicin alone and in combination with two mediators against six dermatophytic fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 380-385.
- Aala, F.;** Yusuf, U. K.; Nulit, R; Rezaie, S. (2014). Inhibitory effect of allicin and garlic extracts on growth of cultured hyphae. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 17, 150-154.
- Abad, P.;** Arroyo-Manzanares, N.; Gil, L.; García-Campaña, A. M. (2017). Use of onion extract as a dairy cattle feed supplement: monitoring propyl propane thiosulfonate as a marker of its effect on milk attributes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 793–799.
- Abad, P.;** Arroyo-Manzanares, N.; Rivas-Montoya, E.; Ochando-Pulido, J. M.; Guillamón, E.; García-Campaña, A. M.; Martínez-Ferez, A. (2019). Effects of different vehiculization strategies for the allium derivative propyl propane thiosulfonate during dynamic simulation of the pig gastrointestinal tract. *Canadian Journal of Animal Science*, 99, 244-253.
- Abad, P.;** Lara, F.J.; Arroyo-Manzanares, N.; Baños, A.; Guillamón, E.; García-Campaña, A.M. (2015). High-performance liquid chromatography method for the monitoring of the *Allium* derivative propyl propane thiosulfonate used as natural additive in animal feed. *Food Analytical Methods*, 8, 916-921.
- Abd-Elhakim, Y. M.;** Hashem, M.; Abo-El-Sooud, K.; Ali, H. A.; Anwar, A.; El-Metwally, A. E.; Mahmoud, E. A.; Moustafa, G. G. (2020). Involvement of tumor necrosis factor- $\alpha$ , interferon gamma- $\gamma$ , and interleukins 1 $\beta$ , 6, and 10 in immunosuppression due to long-term exposure to five common food preservatives in rats. *Gene*, 742, 144590.
- Abouelfetouh, A. Y.;** Moussa, N. K. (2012). Enhancement of antimicrobial activity of four classes of antibiotics combined with garlic. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11, 148-152.
- Abouel-Nour, M. F.;** El-Shewehy, D. M.; Hamada, S. F.; Morsy, T. A. (2016). The efficacy of three medicinal plants; garlic, ginger and mirazid and a chemical drug metronidazole against *Cryptosporidium parvum*: ii-histological changes. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 46, 185-200.
- Abubakar, E-mM.** (2009). Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 179-185.
- Aigner, M.;** Erbeznik, T.; Gschwentner, M.; Lass-Flörl, C. (2017). Etest and Sensititre YeastOne susceptibility testing of echinocandins against *Candida* species from a single center in Austria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e00512-17.

- Alexander, B. D.;** Johnson, M. D.; Pfeiffer, C. D.; Jiménez-Ortigosa, C.; Catania, J.; Booker, R.; Castanheira, M.; Messer, S. A.; Perlin, D. S.; Pfaller, M. A. (2013). Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clinical Infectious Diseases*, 56, 1724-1732.
- Alfouzan, W.;** Al-Enezi, T.; AlRoomi, E.; Sandhya, V.; Chandy, R.; Khan, Z. U. (2017). Comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility system with Etest using clinical isolates of *Candida* species. *Revista Iberoamericana de Micología*, 34, 171-174.
- Alli, J. A.;** Boboye, B. E.; Okonko, I. O.; Kolade, A. F.; Nwanze, J. C. (2011). In-vitro assessments of the effects of garlic (*Allium sativum*) extract on clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Advances in Applied Science Research*, 2, 25-36.
- An, M.;** Shen, H.; Cao, Y.; Zhang, J.; Cai, Y.; Wang, R.; Jiang, Y. (2009). Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33, 258-263.
- Ankri, S.;** Mirelman, D. (1999). Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 1, 125-129.
- Ankri, S.;** Miron, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Mirelman, D. (1997). Allicin from garlic strongly inhibits cysteine proteinases and cytopathic effects of *Entamoeba histolytica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 2286-2288.
- Aparicio, P.;** Rodríguez, E.; Gárate, T.; Molina, R.; Soto, A.; Alvar, J. (2003). Antiparasite therapy. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21, 579-604.
- Appel, E.;** Vallon-Eberhard, A.; Rabinkov, A.; Brenner, O.; Shin, I.; Sasson, K.; Shadkchan, Y.; Osherov, N.; Jung, S.; Mirelman, D. (2010). Therapy of murine pulmonary aspergillosis with antibody-alliinase conjugates and alliin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 898-906.
- Argüello-García, R.;** de la Vega-Arnaud, M.; Loredó-Rodríguez, I. J.; Mejía-Corona, A. M.; Melgarejo-Trejo, E.; Espinoza-Contreras, E. A.; Fonseca-Liñán, R.; González-Robles, A.; Pérez-Hernández, N.; Ortega-Pierres, M. G. (2018). Activity of thioallyl compounds from garlic against *Giardia duodenalis* trophozoites and in experimental giardiasis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 353.
- Arzanlou, M.** (2016). Inhibition of streptococcal pyrogenic exotoxin B using allicin from garlic. *Microbial Pathogenesis*, 93, 166-171.
- Arzanlou, M.;** Bohlooli, S. (2010). Inhibition of streptolysin O by allicin - an active component of garlic. *Journal of Medical Microbiology*, 59, 1044-1049.
- Arzanlou, M.;** Bohlooli, S.; Jannati, E.; Mirzanejad-Asl, H. (2011). Allicin from garlic neutralizes the hemolytic activity of intra- and extra-cellular pneumolysin O *in vitro*. *Toxicon*, 57, 540-545.

- Ayala, G.;** Escobedo-Hinojosa, W. I.; de la Cruz-Herrera, C. F.; Romero, I. (2014). Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World Journal of Gastroenterology*, 20, 1450-1469.
- Azimi, H.;** Fallah-Tafti, M.; Karimi-Darimiyan, M.; Abdollahi, M. (2011). A comprehensive review of vaginitis phytotherapy. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14, 960-966.
- Bachrach, G.;** Jamil, A.; Naor, R.; Tal, G.; Ludmer, Z.; Steinberg, D. (2011). Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1338-1343.
- Baginski, M.;** Sternal, K.; Czub, J.; Borowski, E. (2005). Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic. *Acta Biochimica Polonica*, 52, 655-658.
- Bakri, I. M.;** Douglas, C. W. (2005). Inhibitory effect of garlic extract on oral bacteria. *Archives of Oral Biology*, 50, 645-651.
- Bany, J.;** Zdanowska, D.; Zdanowski, R.; Skopińska-Rózewska, E. (2003). The effect of herbal remedy on the development of *Trichinella spiralis* infection in mice. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 6, 6-8.
- Birring, O. J.;** Vilorio, I. L.; Nunez, P. (2015). Anti-microbial efficacy of *Allium sativum* extract against *Enterococcus faecalis* biofilm and its penetration into the root dentin: an *in vitro* study. *Indian Journal of Dental Research*, 26, 477-482.
- Bjarnsholt, T.;** Jensen, P. Ø.; Rasmussen, T. B.; Christophersen, L.; Calum, H.; Hentzer, M.; Hougen, H. P.; Rygaard, J.; Moser, C.; Eberl, L.; Høiby, N.; Givskov, M. (2005). Garlic blocks *quorum sensing* and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151, 3873-3880.
- Bokaeian, M.;** Nakhaee, A.; Moodi, B.; Farhangi, A.; Akbarzadeh, A. (2010). Effects of garlic extract treatment in normal and streptozotocin diabetic rats infected with *Candida albicans*. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 25, 182-187.
- Booyens, J.;** Labuschagne, M. C.; Thantsha, M. S. (2014). *In vitro* antibacterial mechanism of action of crude garlic (*Allium sativum*) clove extract on selected probiotic *Bifidobacterium* species as revealed by SEM, TEM, and SDS-PAGE analysis. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6, 82-87.
- Booyens, J.;** Thantsha, M. S. (2014). Fourier transform infra-red spectroscopy and flow cytometric assessment of the antibacterial mechanism of action of aqueous extract of garlic (*Allium sativum*) against selected probiotic *Bifidobacterium* strains. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14, 289.
- Borjihan, H.;** Ogita, A.; Fujita, K.; Hirasawa, E.; Tanaka, T. (2009). The vacuole-targeting fungicidal activity of amphotericin B against the pathogenic fungus *Candida albicans* and its enhancement by allicin. *The Journal of Antibiotics*, 62, 691-697.

- Borlinghaus, J.;** Albrecht, F.; Gruhlke, M. C.; Nwachukwu, I. D.; Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, 19, 12591-12618.
- Boucher, H. W.;** Talbot, G. H.; Benjamin, D. K. Jr.; Bradley, J.; Guidos, R. J.; Jones, R. N.; Murray, B. E.; Bonomo, R. A.; Gilbert, D.; Infectious Diseases Society of America. (2013). 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 56, 1685-1694.
- Buono, F.;** Pacifico, L.; Piantedosi, D.; Sgroi, G.; Neola, B.; Roncoroni, C.; Genovese, A.; Rufrano, D.; Veneziano, V. (2019). Preliminary observations of the effect of garlic on egg shedding in horses naturally infected by intestinal strongyles. *Journal of Equine Veterinary Science*, 72, 79-83.
- Burian, J. P.;** Sacramento, L. V. S.; Carlos, I. Z. (2017). Fungal infection control by garlic extracts (*Allium sativum* L.) and modulation of peritoneal macrophages activity in murine model of sporotrichosis. *Brazilian Journal of Biology*, 77, 848-855.
- Casella, S.;** Leonardi, M.; Melai, B.; Fratini, F.; Pistelli, L. (2013). The role of diallyl sulfides and dipropyl sulfides in the *in vitro* antimicrobial activity of the essential oil of garlic, *Allium sativum* L., and leek, *Allium porrum* L. *Phytotherapy Research*, 27, 380-383.
- Castanheira, M.;** Messer, S. A.; Jones, R. N.; Farrell, D. J.; Pfaller, M. A. (2014). Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44, 320–326.
- Cavallito, C.;** Bailey, J. (1944). Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *Journal of the American Chemical Society*, 66, 1950-1951.
- Chavan, R. D.;** Shinde, P.; Girkar, K.; Madage, R.; Chowdhary, A. (2016). Assessment of anti-influenza activity and hemagglutination inhibition of *Plumbago indica* and *Allium sativum* extracts. *Pharmacognosy Research*, 8, 105-111.
- Chikwem, A. J.;** Chikwem, J. O.; Swinton, D. J. (2008). Aqueous extraction of dried and fresh garlic, and comparative antimicrobial susceptibility testing of garlic extracts on selected bacteria. *BIOS*, 79, 56-60.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2012). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; fourth informational supplement. M27-S4. CLSI, Wayne, PA, Estados Unidos.
- Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2016). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, Pa, Estados Unidos.

- Clinical and Laboratory Standards Institute.** (2017). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts, 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA, Estados Unidos.
- Committee on Herbal Medicinal Products.** (2013). Assessment report on *Allium sativum* L., bulbus. European Medicines Agency, Londres, Reino Unido. Disponible en: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbalreport/draft-assessment-report-allium-sativum-l-bulbus\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbalreport/draft-assessment-report-allium-sativum-l-bulbus_en.pdf) (Acceso: 19 de diciembre de 2020).
- Cortés, A.;** García-Ferrús, M.; Sotillo, J.; Guillermo Esteban, J.; Toledo, R.; Muñoz-Antolí, C. (2017). Effects of dietary intake of garlic on intestinal trematodes. *Parasitology Research*, 116, 2119-2129.
- Corzo-Martinez, M.;** Corzo, N.; Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 609-625.
- Cretella, D.;** Barber, K. E.; King, S. T.; Stover, K. R. (2016). Comparison of susceptibility patterns using commercially available susceptibility testing methods performed on prevalent *Candida* spp. *Journal of Medical Microbiology*, 65, 1445-1451.
- Cuenca-Estrella, M.;** Rodríguez-Tudela, J. L. (2007). Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documento 7.1). En: Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología. Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo MC (Eds.) Revista Iberoamericana de Micología, Bilbao.
- Curtis, H.;** Noll, U.; Störmann, J.; Slusarenko, A. J. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, 79-89.
- Cutler, R. R.;** Wilson, P. (2004). Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*, 61, 71-74.
- Davis, L. E.;** Shen, J.; Royer, R. E. (1994). *In vitro* synergism of concentrated *Allium sativum* extract and amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Planta Medica*, 60, 546-549.
- De Brito, B. B.;** da Silva, F. A. F.; Soares, A. S.; Pereira, V. A.; Santos, M. L. C.; Sampaio, M. M.; Neves, P. H. M.; de Melo, F.F. (2019). Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World Journal of Gastroenterology*, 25, 5578-5589.
- De Wit, J. C.;** Notermans, S.; Gorin, N.; Kampelmacher, E. H. (1979). Effect of garlic oil or onion oil on toxin production by *Clostridium botulinum* in meat slurry. *Journal of Food Protection*, 42, 222-224.

- Delaha, E. C.;** Garagusi, V. F. (1985). Inhibition of mycobacteria by garlic extract *Allium sativum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, 485-486.
- Dhamija, P.;** Sethi, S.; Meharwal, S.; Kumar, S.; Malhotra, S.; Sharma, M.; Pandhi, P. (2010). Crude aqueous extract of garlic reduces MIC of isoniazid and rifampicin against *Mycobacterium tuberculosis* by broth microdilution method. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 7, article 47.
- Dibner J. J.;** Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84, 634–643.
- Dookie, N.;** Rambaran, S.; Padayatchi, N.; Mahomed, S.; Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73, 1138-1151.
- Ebrahimy, F.;** Dolatian, M.; Moatar, F.; Majd, H. A. (2015). Comparison of the therapeutic effects of Garcin<sup>®</sup> and fluconazole on *Candida* vaginitis. *Singapore Medical Journal*, 56, 567-572.
- Eja, M. E.;** Asikong, B. E.; Ariba, C.; Arikpo, G. E.; Anwan, E. E.; Enyi-Idoh, K. H. (2007). A comparative assessment of the antimicrobial effects of garlic (*Allium sativum*) and antibiotics on diarrheagenic organisms. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38, 343-348.
- El-Azzouny, M. M.;** El-Demerdash, A. S.; Seadawy, H. G.; Abou-Khadra, S. H. (2018). Antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum*) and thyme (*Zataria multiflora Boiss*) extracts on some food borne pathogens and their effect on virulence gene expression. *Cellular and Molecular Biology*, 64, 79-86.
- European Commision.** (2003). Regulation (EC) No. 1931/2003 of the european parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union*, L268/29–L268/43.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** (2017). Antifungal agents-breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.1. Disponible en: <http://www.eucast.org/>
- Fairlamb, A. H.** (2003). Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology*, 19, 488-494.
- Farag, M. A.;** Ali, S. E.; Hodaya, R. H.; El-Seedi, H. R.; Sultani, H. N.; Laub, A.; Eissa, T. F.; Abou-Zaid, F. O. F.; Wessjohann, L. A. (2017). Phytochemical profiles and antimicrobial activities of *Allium cepa* red cv. and *A. sativum* subjected to different drying methods: A comparative MS-based metabolomics. *Molecules*, 22, 761.
- Feldberg, R. S.;** Chang, S. C.; Kotik, A. N.; Nadler, M.; Neuwirth, Z.; Sundstrom, D. C.; Thompson, N. H. (1988). *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 1763-1768.

- Feng, Y.;** Zhu, X.; Wang, Q.; Jiang, Y.; Shang, H.; Cui, L.; Cao, Y. (2012). Allicin enhances host pro-inflammatory immune responses and protects against acute murine malaria infection. *Malaria Journal*, 11, 268.
- Focke, M.;** Feld, A.; Lichtenthaler, H. K. (1990). Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS Letters*, 261, 106-108.
- Foroutan-Rad, M.;** Tappeh, K. H.; Khademvatan, S. (2017). Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Allium sativum* (garlic): a review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 22, 141-155.
- Fратиани, F.;** Riccardi, R.; Spigno, P.; Ombra, M. N.; Cozzolino, A.; Tremonte, P.; Coppola, R.; Nazzaro, F. (2016). Biochemical characterization and antimicrobial and antifungal activity of two endemic varieties of garlic (*Allium sativum* L.) of the Campania Region, Southern Italy. *Journal of Medicinal Food*, 19, 686-691.
- Gallwitz, H.;** Bonse, S.; Martinez-Cruz, A.; Schlichting, I.; Schumacher, K.; Krauth-Siegel, R. L. (1999). Ajoene is an inhibitor and subversive substrate of human glutathione reductase and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase: crystallographic, kinetic, and spectroscopic studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 364-372.
- García-Rodríguez, J. A.;** Cantón, R.; Sánchez, J. E.; Martínez-Martínez, L.; Rodríguez-Avial, C.; Vila, J. (2000). Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En: Procedimientos en Microbiología Clínica. Picazo JJ (Ed.). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), Madrid.
- Ghahfarokhi, M. S.;** Goodarzi, M.; Abyaneh, M. R.; Al-Tiraihi, T.; Seyedipour, G. (2004). Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 75, 645-655.
- Ghazanfari, T.;** Hassan, Z. M.; Ebtekar, M.; Ahmadiani, A.; Naderi, G.; Azar, A. (2000). Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52, 491-495.
- Graham, D. Y.;** Anderson, S. Y.; Lang, T. (1999). Garlic or jalapeño peppers for treatment of *Helicobacter pylori* infection. *American Journal of Gastroenterology*, 94, 1200-1202.
- Gruhlke, M. C. H.;** Schlembach, I.; Leontiev, R.; Uebachs, A.; Gollwitzer, P. U. G.; Weiss, A.; Delaunay, A.; Toledano, M.; Slusarenko, A. J. (2017). Yap1p, the central regulator of the *S. cerevisiae* oxidative stress response, is activated by allicin, a natural oxidant and defence substance of garlic. *Free Radical Biology and Medicine*, 108: 793-802.
- Gruhlke, M. C.;** Hemmis, B.; Noll, U.; Wagner, R.; Luhring, H.; Slusarenko, A. J. (2015). The defense substance allicin from garlic permeabilizes membranes of *Beta vulgaris*, *Rhoeo discolor*, *Chara corallina* and artificial lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850, 602-611.

- Gruhlke, M. C.;** Portz, D.; Stitz, M.; Anwar, A.; Schneider, T.; Jacob, C.; Schlaich, N. L.; Slusarenko, A. J. (2010). Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1916-1924.
- Guillamón, E.** (2018). Effect of phytochemical compounds of the genus *Allium* on the immune system and the inflammatory response. *Ars Pharmaceutica*, 59, 185-196.
- Guo, N. L.;** Lu, D. P.; Woods, G. L.; Reed, E.; Zhou, G. Z.; Zhang, L. B.; Waldman, R. H. (1993). Demonstration of the anti-viral activity of garlic extract against human cytomegalovirus *in vitro*. *Chinese Medical Journal*, 106, 93-96.
- Guo, N.;** Wu, X.; Yu, L.; Liu, J.; Meng, R.; Jin, J.; Lu, H.; Wang, X.; Yan, S.; Deng, X. (2010). *In vitro* and *in vivo* interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 58, 193-201.
- Gupta, R. L.;** Jain, S.; Talwar, V.; Gupta, H. C.; Murthy, P. S. (1999). Antitubercular activity of garlic (*Allium sativum*) extract on combination with conventional antitubercular drugs in tubercular lymphadenitis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 14, 12-18.
- Gupta, R.;** Thakur, B.; Singh, P.; Singh, H. H.; Sharma, V. D.; Katoch, V. M.; Chauhan, S. V. S. (2010). Anti-tuberculosis activity of selected medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian Journal of Medical Research*, 131, 809-913.
- Hannan, A.;** Humayun, T.; Hussain, M. B.; Yasir, M.; Sikandar, S. (2010). *In vitro* antibacterial activity of onion (*Allium cepa*) against clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad*, 22, 160-163.
- Hannan, A.;** Ullah, M. I.; Usman, M.; Hussain, S.; Absar, M.; Javed, K. (2011). Anti-mycobacterial activity of garlic (*Allium sativum*) against multi-drug resistant and non-multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 24, 81-85.
- Harjai, K.;** Kumar, R.; Singh, S. (2010). Garlic blocks *quorum sensing* and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 58, 161-168.
- Harris, J. C.;** Cottrell, S. L.; Plummer, S.; Lloyd, D. (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 282-286.
- Heras-Cañas, V.;** Ros, L.; Sorlózano, A.; Gutiérrez-Soto, B.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez-Fernández, J. (2015). Isolated yeast species in urine samples in a Spanish regional hospital. *Revista Argentina de Microbiología*, 47, 331-334.
- Ismail, S.;** Jalilian, F. A.; Talebpour, A. H.; Zargar, M.; Shamel, K.; Sekawi, Z.; Jahanshiri, F. (2013). Chemical composition and antibacterial and cytotoxic activities of *Allium hirtifolium* Boiss. *BioMed Research International*, 2013, 696835.



- Iwalokun, B. A.;** Ogunledun, A.; Ogbolu, D. O.; Bamiro, S. B.; Jimi-Omojola, J. (2004). *In vitro* antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and *Candida* species from Nigeria. *Journal of Medicinal Food*, 7, 327-333.
- Jain, I.;** Jain, P.; Bisht, D.; Sharma, A.; Srivastava, B.; Gupta, N. (2015). Use of traditional Indian plants in the inhibition of caries-causing bacteria-*Streptococcus mutans*. *Brazilian Dental Journal*, 26, 110-115.
- Jiménez-Guerra, G.;** Casanovas Moreno-Torres, I.; Gutiérrez-Soto, M.; Vazquez-Alonso, F.; Sorlózano-Puerto, A.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez-Fernández, J. (2018b). Inpatient candiduria: etiology, susceptibility to antifungal drugs and risk factors. *Revista Española de Quimioterapia*, 31, 323-328.
- Jiménez-Guerra, G.;** Heras-Cañas, V.; Béjar Molina, L. D. C.; Sorlózano-Puerto, A.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez-Fernández, J. (2018a). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections: Evolution of antimicrobial resistance and treatment options. *Medicina Clinica*, 150, 262-265.
- Johnson, M. G.;** Vaughn, R. H. (1969). Death of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* in the presence of freshly reconstituted dehydrated garlic and onion. *Applied Microbiology*, 17, 903-905.
- Jonkers, D.;** Sluimer, J.; Stobberingh, E. (1999). Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 3045.
- Kandil, O. M.;** Abdullah, T. H.; Elkadi, A. (1987). Garlic and the immune system in humans: its affect on natural killer cells. *Federation Proceedings*, 46, 441.
- Keusgen, M.;** Schulz, H.; Glodek, J.; Krest, I.; Krüger, H.; Herchert, N.; Keller, J. (2002). Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2884-2890.
- Khan, Z. K.;** Katiyar, R. (2000). Potent antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) against experimental murine disseminated cryptococcosis. *Pharmaceutical Biology*, 38, 87-100.
- Khodavandi, A.;** Alizadeh, F.; Aala, F.; Sekawi, Z.; Chong, P. P. (2010). *In vitro* investigation of antifungal activity of allicin alone and in combination with azoles against *Candida* species. *Mycopathologia*, 169, 287-295.
- Khodavandi, A.;** Alizadeh, F.; Harmal, N. S.; Sidik, S. M.; Othman, F.; Sekawi, Z.; Chong, P. P. (2011a). Expression analysis of SIR2 and SAPs1-4 gene expression in *Candida albicans* treated with allicin compared to fluconazole. *Tropical Biomedicine*, 28, 589-598.
- Khodavandi, A.;** Alizadeh, F.; Harmal, N. S.; Sidik, S. M.; Othman, F.; Sekawi, Z.; Jahromi, M. A.; Ng, K. P.; Chong, P. P. (2011b). Comparison between efficacy of

- allicin and fluconazole against *Candida albicans* *in vitro* and in a systemic candidiasis mouse model. *FEMS Microbiology Letters*, 315, 87-93.
- Kim, D. K.;** Lillehoj, H. S.; Lee, S. H.; Lillehoj, E. P.; Bravo, D. (2013). Improved resistance to *Eimeria acervulina* infection in chickens due to dietary supplementation with garlic metabolites. *The British Journal of Nutrition*, 109, 76-88.
- Koch, H. P.;** Lawson, L. D. (1996). Garlic: The science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species. Williams & Wilkins. Baltimore, MD, USA.
- Kodera, Y.;** Ushijima, M.; Amano, H.; Suzuki, J. I.; Matsutomo, T. (2017). Chemical and biological properties of S-1-propenyl-L-cysteine in aged garlic extract. *Molecules*, 22, 570.
- Kshirsagar, M. M.;** Dodamani, A. S.; Karibasappa, G. N.; Vishwakarma, P. K.; Vathar, J. B.; Sonawane, K. R.; Jadhav, H. C.; Khobragade, V. R. (2018). Antibacterial activity of garlic extract on cariogenic bacteria: an *in vitro* study. *Ayu*, 39, 165-168.
- Kucukates, E.;** Gultekin, N. N.; Alisan, Z.; Hondur, N.; Ozturk, R. (2016). Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agents. *Saudi Medical Journal*, 37, 750-757.
- Lanzotti, V.;** Barile, E.; Antignani, V.; Bonanomi, G.; Scala, F. (2012). Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. *Voghiera*. *Phytochemistry*, 78, 126-134.
- Ledezma, E.;** Apitz-Castro, R. (2006). Ajoene the main active compound of garlic (*Allium sativum*): a new antifungal agent. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23, 75-80.
- Ledezma, E.;** Jorquera, A.; Bendezú, H.; Vivas, J.; Pérez, G. (2002). Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various *Leishmania* species: ultrastructural study. *Parasitology Research*, 88, 748-753.
- Ledezma, E.;** Maniscalchi, M. T.; Espinoza, D. L. (2008). Synergy between ajoene and ketoconazole in isolates of *Microsporium canis*. A preliminary study using fractional inhibitory concentration technique (FIC). *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 157-162.
- Lemar, K. M.;** Aon, M. A.; Cortassa, S.; O'Rourke, B.; Müller, C. T.; Lloyd, D. (2007). Diallyl disulphide depletes glutathione in *Candida albicans*: oxidative stress-mediated cell death studied by two-photon microscopy. *Yeast*, 24, 695-706.
- Lemar, K. M.;** Passa, O.; Aon, M. A.; Cortassa, S.; Müller, C. T.; Plummer, S.; O'Rourke, B.; Lloyd, D. (2005). Allyl alcohol and garlic (*Allium sativum*) extract produce oxidative stress in *Candida albicans*. *Microbiology*, 151, 3257-3265.

- Lemar, K. M.;** Turner, M. P.; Lloyd, D. (2002). Garlic (*Allium sativum*) as an anti-*Candida* agent: a comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 398-405.
- Leng, B. F.;** Qiu, J. Z.; Dai, X. H.; Dong, J.; Wang, J. F.; Luo, M. J.; Li, H. E.; Niu, X. D.; Zhang, Y.; Ai, Y. X.; Deng, X. M. (2011). Allicin reduces the production of  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 16, 7958-7968.
- Leontiev, R.;** Hohaus, N.; Jacob, C.; Gruhlke, M. C. H.; Slusarenko, A. J. (2018) A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of allicin. *Scientific Reports*, 8, 6763.
- Li, W. R.;** Shi, Q. S.; Dai, H. Q.; Liang, Q.; Xie, X. B.; Huang, X. M.; Zhao, G. Z.; Zhang, L. X. (2016). Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 6, 22805.
- Li, Z.;** Ying, X.; Shan, F.; Ji, J. (2018). The association of garlic with *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*, 23, e12532.
- Lihua, L.;** Jianhuit, W.; Jialini, Y.; Yayin, L.; Guanxin, L. (2013). Effects of allicin on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and the production of *quorum-sensing* controlled virulence factors. *Polish Journal of Microbiology*, 62, 243-251.
- Lima, C. M.;** Freitas, F. I.; Morais, L. C.; Cavalcanti, M. G.; Silva, L. F.; Padilha, R. J.; Barbosa, C. G.; Santos, F. A.; Alves, L. C.; Diniz M. F. (2011). Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44, 327-330.
- Lira, A. C.;** Prieto, A. I.; Baños, A.; Guillamón, E.; Moyano, R.; Jos, A.; Cameán, A. M. (2020). Safety assessment of propyl-propane-thiosulfonate (PTSO): 90-days oral subchronic toxicity study in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 144, 111612.
- Lissiman, E.;** Bhasale, A. L.; Cohen, M. (2014). Garlic for the common cold. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 11, CD006206
- Liu, C. T.;** Su, H. M.; Lii, C. K.; Sheen, L. Y. (2009). Effect of supplementation with garlic oil on activity of Th1 and Th2 lymphocytes from rats. *Planta Medica*, 75, 205-210.
- Llana-Ruiz-Cabello, M.;** Gutiérrez-Praena, D.; Puerto M.; Pichardo, S.; Moreno, F. J.; Baños, A.; Núñez, C.; Guillamón, E.; Cameán, A. M. (2015). Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging. *Food and Chemical Toxicology*, 82, 1-11.
- Low, C. F.;** Chong, P. P.; Yong, P. V.; Lim, C. S.; Ahmad, Z.; Othman, F. (2008). Inhibition of hyphae formation and SIR2 expression in *Candida albicans* treated with fresh *Allium sativum* (garlic) extract. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2169-2177.

- Lu, X.;** Rasco, B. A.; Jabal, J. M.; Aston, D. E.; Lin, M.; Konkell, M. E. (2011a). Investigating antibacterial effects of garlic (*Allium sativum*) concentrate and garlic-derived organosulfur compounds on *Campylobacter jejuni* by using Fourier transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, and electron microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5257-5269.
- Lu, X.;** Rasco, B. A.; Kang, D. H.; Jabal, J. M.; Aston, D. E.; Konkell, M. E. (2011b). Infrared and Raman spectroscopic studies of the antimicrobial effects of garlic concentrates and diallyl constituents on foodborne pathogens. *Analytical Chemistry*, 83, 4137-4146.
- Lun, Z. R.;** Burri, C.; Menzinger, M.; Kaminsky, R. (1994). Antiparasitic activity of diallyl trisulfide (Dasuansu) on human and animal pathogenic protozoa (*Trypanosoma* sp., *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*) *in vitro*. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 74, 51-59.
- Magiorakos, A. P.;** Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G.; Harbarth, S.; Hindler, J. F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; Paterson, D. L.; Rice, L. B.; Stelling, J.; Struelens, M. J.; Vatopoulos, A.; Weber, J. T.; Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 268-281.
- Mahboubi, M.;** Kazempour, N. (2015). The anti-dermatophyte activity of *Allium hirtifolium* Boiss aqueous extract. *Journal de Mycologie Médicale*, 25, e10-14.
- Mahmoudvand, H.;** Sepahvand, P.; Jahanbakhsh, S.; Azadpour, M. (2016). Evaluation of the antileishmanial and cytotoxic effects of various extracts of garlic (*Allium sativum*) on *Leishmania tropica*. *Journal of Parasitic Diseases*, 40, 423-426.
- Majewski, M.** (2014). *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65, 1-8.
- Martínez-Fernández, G.;** Abecia, L.; Martín-García, A. I.; Ramos-Morales, E.; Hervás, G.; Molina-Alcaide, E.; Yáñez-Ruiz, D. R. (2013). In vitro-in vivo study on the effects of plant compounds on rumen fermentation, microbial abundances and methane emissions in goats. *Animal*, 7, 1925-1934.
- Matsuura, H.;** Ushiroguchi, T.; Itakura, Y.; Hayashi, N.; Fuwa, T. (1988). A furostanol glycoside from garlic bulbs of *Allium sativum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 36, 3659-3663.
- McNulty, C. A.;** Wilson, M. P.; Havinga, W.; Johnston, B.; O'Gara, E. A.; Maslin, D. J. (2001). A pilot study to determine the effectiveness of garlic oil capsules in the treatment of dyspeptic patients with *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 6, 249-253.
- Meis, J. F.;** Chowdhary, A.; Rhodes, J. L.; Fisher, M. C.; Verweij, P. E. (2016). Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371, 20150460.

- Mellado-García, P.;** Maisanaba, S.; Puerto, M.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Prieto, A. I.; Marcos, R.; Pichardo, S.; Cameán, A. M. (2015). Genotoxicity assessment of propyl thiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 365-373.
- Mellado-García, P.;** Puerto, M.; Pichardo, S.; Llana-Ruiz-Cabello, M.; Moyano, R.; Blanco, A.; Jos, A.; Cameán, A. M. (2016a). Toxicological evaluation of an *Allium*-based commercial product in a 90-day feeding study in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology*, 90, 18-29.
- Mellado-García, P.;** Puerto, M.; Prieto, A. I.; Pichardo, S.; Martín-Cameán, A.; Moyano, R.; Blanco, A.; Cameán, A. M. (2016b). Genotoxicity of a thiosulfonate compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging: In vivo comet assay and micronucleus test. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 800-801, 1-11.
- Meriga, B.;** Mopuri, R.; MuraliKrishna, T. (2012). Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, 391-395.
- Miceli, M. H.;** Díaz, J. A.; Lee, S. A. (2011). Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 142-151.
- Mikaili, P.;** Maadirad, S.; Moloudizargari, M.; Aghajanshakeri, S.; Sarahroodi, S. (2013). Therapeutic uses and pharmacological properties of garlic, shallot, and their biologically active compounds. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16, 1031-1048.
- Mirelman, D.;** Monheit, D.; Varon, S. (1987). Inhibition of growth of *Entamoeba histolytica* by allicin, the active principle of garlic extract (*Allium sativum*). *The Journal of Infectious Diseases*, 156, 243-244.
- Miron, T.;** Bercovici, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Mirelman, D. (2004). [3H] Allicin: preparation and applications. *Analytical Biochemistry*, 331, 364-369.
- Miron, T.;** Rabinkov, A.; Mirelman, D.; Wilchek, M.; Weiner, L. (2000). The mode of action of allicin: its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1463, 20-30.
- Miron, T.;** Wilchek, M.; Sharp, A.; Nakagawa, Y.; Naoi, M.; Nozawa, Y.; Akao, Y. (2008). Allicin inhibits cell growth and induces apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 and U937 cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 524-535.
- Mnayer, D.;** Fabiano-Tixier, A. S.; Petitcolas, E.; Hamieh, T.; Nehme, N.; Ferrant, C.; Fernandez, X.; Chemat, F. (2014). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the *Alliaceae* family. *Molecules*, 19, 20034-20053.

- Mohamoud, L. H.;** El Alfy, N.M. (2003). Effect of some chemical agents on the viability of *Cysticercus bovis*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 33, 391-396.
- Molina de Diego, A.** (2011). Clinical, diagnostic and therapeutic aspects of dermatophytosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29, 33-39.
- Muller, A.;** Eller, J.; Albrecht, F.; Prochnow, P.; Kuhlmann, K.; Bandow, J. E.; Slusarenko, A. J.; Leichert, L. I. (2016). Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein cysteines. *Journal of Biological Chemistry*, 291, 11477-11490.
- Myлона, K.;** Garcia-Cela, E.; Sulyok, M.; Medina, A.; Magan, N. (2019). Influence of two garlic-derived compounds, propyl propane thiosulfonate (PTS) and propyl propane thiosulfinate (PTSO), on growth and mycotoxin production by *Fusarium* species *in vitro* and in stored cereals. *Toxins*, 11, 495.
- Nair, S. S.;** Gaikwad, S. S.; Kulkarni, S. P.; Mukne, A. P. (2017). *Allium sativum* constituents exhibit anti-tubercular activity *in vitro* and in RAW 264.7 mouse macrophage cells infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Pharmacognosy Magazine*, 13, S209-S215.
- Nantz, M. P.;** Rowe, C. A.; Muller, C. E.; Creasy, R. A.; Stanilka, J. M.; Percival, S. S. (2012). Supplementation with aged garlic extract improves both NK and  $\gamma\delta$ -T cell function and reduces the severity of cold and flu symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled nutrition intervention. *Clinical Nutrition*, 31, 337-344.
- O'Gara, E. A.;** Hill, D. J.; Maslin, D. J. (2000). Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2269-2273.
- O'Gara, E. A.;** Maslin, D. J.; Nevill, A. M.; Hill, D. J. (2008). The effect of simulated gastric environments on the anti-*Helicobacter* activity of garlic oil. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1324-1331.
- Ogita, A.;** Fujita, K.; Taniguchi, M.; Tanaka, T. (2006). Enhancement of the fungicidal activity of amphotericin B by allicin, an allyl-sulfur compound from garlic, against the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model system. *Planta Medica*, 72, 1247-1250.
- Ogita, A.;** Hirooka, K.; Yamamoto, Y.; Tsutsui, N.; Fujita, K.; Taniguchi, M.; Tanaka, T. (2005). Synergistic fungicidal activity of Cu(2+) and allicin, an allyl sulfur compound from garlic, and its relation to the role of alkyl hydroperoxide reductase 1 as a cell surface defense in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology*, 215, 205-213.
- Ogita, A.;** Nagao, Y.; Fujita, K.; Tanaka, T. (2007). Amplification of vacuole-targeting fungicidal activity of antibacterial antibiotic polymyxin B by allicin, an allyl sulfur compound from garlic. *The Journal of Antibiotics*, 60, 511-518.

- Okamoto, Y.;** Aoki, S.; Mataga, I. (2004). Enhancement of amphotericin B activity against *Candida albicans* by superoxide radical. *Mycopathologia*, 158, 9-15.
- O'Mahony, R.;** Al-Khtheeri, H.; Weerasekera, D.; Fernando, N.; Vaira, D.; Holton, J.; Basset, C. (2005). Bactericidal and anti-adhesive properties of culinary and medicinal plants against *Helicobacter pylori*. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 7499-7507.
- Oz, Y.;** Gokbolat, E. (2018). Evaluation of direct antifungal susceptibility testing methods of *Candida* spp. from positive blood culture bottles. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32, e22297.
- Peinado, M. J.;** Ruiz, R.; Echávarri, A.; Aranda-Olmedo, I.; Rubio, L. A. (2013). Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 181, 87-92.
- Peinado, M. J.;** Ruiz, R.; Echávarri, A.; Rubio, L. A. (2012). Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens in vivo. *Poultry Science*, 91, 2148-2157.
- Pemán, J.;** Salavert, M. (2012). General epidemiology of invasive fungal disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30, 90-98.
- Pérez-Giraldo, C.;** Cruz-Villalón, G.; Sánchez-Silos, R.; Martínez-Rubio, R.; Blanco, M. T.; Gómez-García, A. C. (2003). *In vitro* activity of allicin against *Staphylococcus epidermidis* and influence of subinhibitory concentrations on biofilm formation. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 709-711.
- Petropoulos, S.;** Fernandes, Â.; Barros, L.; Ciric, A.; Sokovic, M.; Ferreira, I. C. F. R. (2018) Antimicrobial and antioxidant properties of various Greek garlic genotypes. *Food Chemistry*, 245, 7-12.
- Pfaller, M. A.;** Diekema, D. J. (2010). Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Critical Reviews in Microbiology*, 36, 1-53.
- Pillai, R.;** Trivedi, N. A.; Bhatt, J. D. (2013). Studies on *in vitro* interaction of ampicillin and fresh garlic extract against *Staphylococcus aureus* by checkerboard method. *Ancient Science of Life*, 33, 114-118.
- Pundir, R. K.;** Jain, P.; Sharma, C. (2010). Antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* against food associated bacteria and fungi. *Ethnobotanical Leaflets*, 14, 344-360.
- Pyun, M.;** Shin, S. (2006). Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. *Phytomedicine*, 13, 394-400.

- Rabinkov, A.;** Miron, T.; Konstantinovski, L.; Wilchek, M.; Mirelman, D.; Weiner, L. (1998). The mode of action of allicin: Trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1379, 233-244.
- Rabinkov, A.;** Miron, T.; Mirelman, D.; Wilchek, M.; Glozman, S.; Yavin, E.; Weiner, L. (2000). S-allylmercaptogluthione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1499, 144-153.
- Ranjbar-Omid, M.;** Arzanlou, M.; Amani, M.; Shokri Al-Hashem, S. K.; Amir Mozafari, N.; Peeri Doghaheh, H. (2015). Allicin from garlic inhibits the biofilm formation and urease activity of *Proteus mirabilis* *in vitro*. *FEMS Microbiology Letters*, 362, fnv049.
- Rao, R. R.;** Rao, S. S.; Natarajan, S.; Venkataraman, P. R. (1946). Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by garlic extract. *Nature*, 157, 441.
- Rees, L. P.;** Minney, S. F.; Plummer, N. T.; Slater, J. H.; Skyrme, D. A. (1993). A quantitative assessment of the antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 303-307.
- Reiter, J.;** Levina, N.; van der Linden, M.; Gruhlke, M.; Martin, C.; Slusarenko, A. J. (2017). Diallylthiosulfinate (allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. *Molecules*, 22, 1711.
- Robles-Martínez, M.;** González, J. F. C.; Pérez-Vázquez, F. J.; Montejano-Carrizales, J. M.; Pérez, E.; Patiño-Herrera, R. (2019). Antimycotic activity potentiation of *Allium sativum* extract and silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *Chemistry & Biodiversity*, 16, e1800525.
- Rodríguez-Baño, J.;** López-Prieto, M. D.; Portillo, M. M.; Retamar, P.; Natera, C.; Nuño, E.; Herrero, M.; del Arco, A.; Muñoz, A.; Téllez, F.; Torres-Tortosa, M.; Martín-Aspas, A.; Arroyo, A.; Ruiz, A.; Moya, R.; Corzo, J. E.; León, L.; Pérez-López, J. A.; SAEI/SAMPAC Bacteraemia Group. (2010). Epidemiology and clinical features of community-acquired, healthcare-associated and nosocomial bloodstream infections in tertiary-care and community hospitals. *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 1408-1413.
- Ross, F. S.;** Chang, S. C.; Kotik, A. N.; Nadler, M.; Neuwirth, Z.; Sundstrom, D. C.; Thompson, N. H. (1988). *In vitro* mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 1763-1768.
- Roth, P. J.;** Theato, P. (2013). Thiol-thiosulfonate chemistry in polymer science: simple functionalization of polymers via disulfide linkages. In: *Thiol-X chemistries in polymer and materials science*, edited by Lowe, A. and Bowman, C. 76-94. Abingdon (United Kingdom): Royal Society of Chemistry.



- Ruiz, R.;** García, M. P.; Lara A.; Rubio, L. A. (2010). Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro. *Veterinary Microbiology*, 144, 110-117.
- Sadjjadi, S. M.;** Zoharizadeh, M. R.; Panjeshahin, M. R. (2008). *In vitro* screening of different *Allium sativum* extracts on hydatid cysts protoscoleces. *Journal of Investigative Surgery*, 21, 318-322.
- Sadri, A.;** Khodavandi, A.; Alizadeh, F. (2016). *Allium sativum*, *Allium hirtifolium* and *Allium cepa*: The probable quorum-sensing quenching compounds against *Candida albicans*. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 13, 1457-1468.
- Salama, A. A.;** AbouLaila, M.; Terkawi, M. A.; Mousa, A.; El-Sify, A.; Allaam, M.; Zaghawa, A.; Yokoyama, N.; Igarashi, I. (2014). Inhibitory effect of allicin on the growth of *Babesia* and *Theileria equi* parasites. *Parasitology Research*, 113, 275-283.
- Saleheen, D.;** Ali, S. A.; Yasinzai, M. M. (2004). Antileishmanial activity of aqueous onion extract *in vitro*. *Fitoterapia*, 75, 9-13.
- San-Blas, G.;** San-Blas, F.; Gil, F.; Mariño, L.; Apitz-Castro, R. (1989). Inhibition of growth of the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33, 1641-1644.
- San-Blas, G.;** Urbina, J. A.; Marchán, E.; Contreras, L. M.; Sorais, F.; San-Blas, F. (1997). Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by ajoene is associated with blockade of phosphatidylcholine biosynthesis. *Microbiology*, 143, 1583-1586.
- Sánchez-García, J. M.;** Sorlózano-Puerto, A.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez Fernández, J. (2019). Evolution of the antibiotic-resistance of microorganisms causing urinary tract infections: A 4-year epidemiological surveillance study in a hospital population. *Revista Clínica Española*, 219, 116-123.
- Sanchez-Mirt, A.;** Gil, F.; Apitz-Castro, R. (1993). *In vitro* inhibitory effect and ultrastructural alterations caused by ajoene on the growth of dematiaceous fungi: *Cladosporium carrionii* and *Fonsecaea pedrosoi*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 10, 74-78.
- Shadkchan, Y.;** Shemesh, E.; Mirelman, D.; Miron, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Osherov, N. (2004). Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. *in vitro*, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 832-836.
- Shetty, S.;** Thomas, B.; Shetty, V.; Bhandary, R.; Shetty, R. M. (2013). An *in vitro* evaluation of the efficacy of garlic extract as an antimicrobial agent on periodontal pathogens: a microbiological study. *Ayu*, 34, 445-451.
- Siqueira, R. A.;** Doi, A. M.; de Petrus Crossara, P. P.; Koga, P.; Marques, A. G.; Nunes, F. G.; Pasternak, J.; Martino, M. (2018). Evaluation of two commercial methods for

the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek 2® and Sensititre YeastOne®. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35, 83-87.

**Sivam, G. P.** (2001). Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic. *Journal of Nutrition*, 131, 1106S-1108S.

**Smyth, A. R.;** Cifelli, P. M.; Ortori, C. A.; Righetti, K.; Lewis, S.; Erskine, P.; Holland, E. D.; Givskov, M.; Williams, P.; Cámara, M.; Barrett, D. A.; Knox, A. (2010). Garlic as an inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing* in cystic fibrosis: a pilot randomized controlled trial. *Pediatric Pulmonology*, 45, 356-362.

**Soffar, S. A.;** Mokhtar, G. M. (1991). Evaluation of the antiparasitic effect of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract in hymenolepiasis nana and giardiasis. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 21, 497-502.

**Sorlozano, A.;** Gutierrez, J.; Jimenez, A.; de Dios Luna, J.; Martínez, J. L. (2007a). Contribution of a new mutation in parE to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 2740-2742.

**Sorlozano, A.;** Gutierrez, J.; Roman, E.; de Dios Luna, J.; Roman, J.; Liebana, J.; Piedrola, G. (2007b). A comparison of the activity of tigecycline against multiresistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 58, 487-489.

**Sorlozano, A.;** Gutiérrez, J.; Roman, J.; Liebana, J.; Piedrola, G. (2009). Activity of daptomycin against multiresistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*. *Microbial Drug Resistance*, 15, 125-127.

**Sorlózano, A.;** Jimenez-Pacheco, A.; de Dios Luna del Castillo, J.; Sampedro, A.; Martinez-Brocal, A.; Miranda-Casas, C.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez-Fernández, J. (2014). Evolution of the resistance to antibiotics of bacteria involved in urinary tract infections: a 7-year surveillance study. *American Journal of Infection Control*, 42, 1033-1038.

**Sorlózano-Puerto, A.;** Esteva-Fernández, D.; Oteo-Iglesias, J.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez-Fernández, J. (2016). A new case report of urinary tract infection due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) in Spain. *Archivos Españoles de Urología*, 69, 437-440.

**Sorlózano-Puerto, A.;** Gómez-Luque, J. M.; Luna-Del-Castillo, J. D.; Navarro-Marí, J. M.; Gutiérrez-Fernández, J. (2017). Etiological and resistance profile of bacteria involved in urinary tract infections in young children. *BioMed Research International*, 2017, 4909452.

**Sutton, G. A.;** Haik, R. (1999). Efficacy of garlic as an anthelmintic in donkeys. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 54, 66-78.

- Tagboto, S.;** Townson, S. (2001). Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Advances in Parasitology*, 50, 199-295.
- Tatarintsev, A. V.;** Vrzhets, P. V.; Ershov, D. E.; Shchegolev, A. A.; Turgiev, A. S.; Karamov, E. V.; Kornilaeva, G. V.; Makarova, T. V.; Fedorov, N. A.; Varfolomeev, S. D. (1992). The ajoene blockade of integrin-dependent processes in an HIV-infected cell system. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*, 11-12, 6-10.
- Thomaz, L.;** Apitz-Castro, R.; Marques, A. F.; Travassos, L. R.; Taborda, C. P. (2008). Experimental paracoccidioidomycosis: alternative therapy with ajoene, compound from *Allium sativum*, associated with sulfamethoxazole/trimethoprim. *Medical Mycology*, 46, 113-118.
- Tomšik, A.;** Šarić, L.; Bertoni, S.; Protti, M.; Albertini, B.; Mercolini, L.; Passerini, N. (2019). Encapsulations of wild garlic (*Allium ursinum* L.) extract using spray congealing technology. *Food Research International*, 119, 941-950.
- Touihri, I.;** Boukhris, M.; Marrakchi, N.; Luis, J.; Hanchi, B.; Kallech-Ziri, O. (2015). Chemical composition and biological activities of *Allium roseum* L. var. *grandiflorum* Briq. essential oil. *Journal of Oleo Science*, 64, 869-879.
- Tsai, Y.;** Cole, L. L.; Davis, L. E.; Lockwood, S. J.; Simmons, V.; Wild, G. C. (1985). Antiviral properties of garlic: *In vitro* effects on influenza B, herpes simplex and coxsackie viruses. *Planta Medica*, 51, 460-461.
- Tsao, S.;** Yin, M. (2001). *In vitro* activity of garlic oil and four diallyl sulphides against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47, 665-670.
- Urbina, J. A.;** Marchan, E.; Lazard, K.; Visbal, G.; Apitz-Castro, R.; Gil, F.; Aguirre, T.; Piras, M. M.; Piras, R. (1993). Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochemical Pharmacology*, 45, 2381-2387.
- Ushimaru, P. I.;** Barbosa, L. N.; Fernandes, A. A.; Di Stasi, L. C.; Fernandes, A. Jr. (2012). *In vitro* antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. *Natural Product Research*, 26, 1553-1557.
- Viswanathan, V.;** Phadatare, A. G.; Mukne, A. (2014). Antimycobacterial and antibacterial activity of *Allium sativum* bulbs. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76, 256-261.
- Waag, T.;** Gelhaus, C.; Rath, J.; Stich, A.; Leippe, M.; Schirmeister, T. (2010). Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20, 5541-5543.

- Wallock-Richards, D.;** Doherty, C. J.; Doherty, L.; Clarke, D. J.; Place, M.; Govan, J. R.; Campopiano, D. J. (2014). Garlic revisited: antimicrobial activity of allicin-containing garlic extracts against *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS One*, 9, e112726.
- Wang, E.;** Farmakiotis, D.; Yang, D.; McCue, D. A.; Kantarjian, H. M.; Kontoyiannis, D. P.; Mathisen, M. S. (2015). The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 2362-2368.
- Wang, H. X.;** Ng, T. B. (2001). Purification of allivin, a novel antifungal protein from bulbs of the round-cloved garlic. *Life Sciences*, 70, 357-365.
- Wang, H. X.;** Ng, T. B. (2004). Isolation of allicepin, a novel antifungal peptide from onion (*Allium cepa*) bulbs. *Journal of Peptide Science*, 10, 173-177.
- Watson, C. J.;** Grando, D.; Fairley, C. K.; Chondros, P.; Garland, S. M.; Myers, S. P.; Pirota, M. (2014). The effects of oral garlic on vaginal candida colony counts: a randomised placebo controlled double-blind trial. *BJOG-An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 121, 498-506.
- Weber, N. D.;** Andersen, D. O.; North, J. A.; Murray, B. K.; Lawson, L. D.; Hughes, B. G. (1992). *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Medica*, 58, 417-423.
- Wolstenholme, A. J.;** Fairweather, I.; Prichard, R.; von Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N. C. (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20, 469-476.
- World Health Organization.** (1987). Prevention and control of intestinal parasitic infections. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO. (Technical Report Series No. 749)
- World Health Organization.** (2001). Anti-infective drug resistance surveillance and containment team. WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance: executive summary. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/66872>
- Yakoob, J.;** Abbas, Z.; Beg, M. A.; Naz, S.; Awan, S.; Hamid, S.; Jafri, W. (2011). *In vitro* sensitivity of *Blastocystis hominis* to garlic, ginger, white cumin, and black pepper used in diet. *Parasitology Research*, 109, 379-385.
- Yalindag-Ozturk, N.;** Ozdamar, M.; Cengiz, P. (2011). Trial of garlic as an adjunct therapy for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a critically ill infant. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17, 379-380.
- Yassibaş, E.;** Arslan, P.; Yalçın, S. (2012). Evaluation of dietary and life-style habits of patients with gastric cancer: a case-control study in Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13, 2291-2297.

- Yin, M. C.;** Cheng, W. S. (2003). Antioxidant and antimicrobial effects of four garlic-derived organosulfur compounds in ground beef. *Meat Science*, 63, 23-28.
- You, W. C.;** Brown, L. M.; Zhang, L.; Li, J. Y.; Jin, M. L.; Chang, Y. S.; Ma, J. L.; Pan, K. F.; Liu, W. D.; Hu, Y.; Crystal-Mansour, S.; Pee, D.; Blot, W. J.; Fraumeni, J. F. Jr.; Xu, G. W.; Gail, M. H. (2006). Randomized double-blind factorial trial of three treatments to reduce the prevalence of precancerous gastric lesions. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 974-983.
- Yousuf, S.;** Ahmad, A.; Khan, A.; Manzoor, N.; Khan, L. A. (2010). Effect of diallyldisulphide on an antioxidant enzyme system in *Candida* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 56, 816-821.
- Zardast, M.;** Namakin, K.; Esmaelian Kaho, J.; Hashemi, S. S. (2016). Assessment of antibacterial effect of garlic in patients infected with *Helicobacter pylori* using urease breath test. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 6, 495-501.
- Zhang, A. L.;** Story, D. F.; Lin, V.; Vitetta, L.; Xue, C. C. (2008). A population survey on the use of 24 common medicinal herbs in Australia. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 17, 1006-1013.
- Zhen, H.;** Fang, F.; Ye, D. Y.; Shu, S. N.; Zhou, Y. F.; Dong, Y. S.; Nie, X. C.; Li, G. (2006). Experimental study on the action of allitridin against human cytomegalovirus *in vitro*: inhibitory effects on immediate-early genes. *Antiviral Research*, 72, 68-74.



## **8. PUBLICACIONES**







## Research Article

# **In Vitro Antibacterial Activity of Propyl-Propane-Thiosulfinate and Propyl-Propane-Thiosulfonate Derived from *Allium* spp. against Gram-Negative and Gram-Positive Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Human Samples**

**Antonio Sorlozano-Puerto** <sup>1</sup>, **Maria Albertuz-Crespo**<sup>1</sup>,  
**Isaac Lopez-Machado**<sup>1</sup>, **Juan Jose Ariza-Romero**<sup>2</sup>, **Alberto Baños-Arjona**<sup>2</sup>,  
**Manuela Exposito-Ruiz**<sup>3</sup>, and **Jose Gutierrez-Fernandez** <sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada-ibs, Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Biotechnology, DMC Research Center, Granada, Spain

<sup>3</sup>Unit of Methodology of Research and Biostatistics, Virgen de las Nieves University Hospital-ibs, Granada, Spain

<sup>4</sup>Laboratory of Microbiology, Virgen de las Nieves University Hospital-ibs, Granada, Spain

Correspondence should be addressed to Antonio Sorlozano-Puerto; [asp@ugr.es](mailto:asp@ugr.es)

Received 30 April 2018; Accepted 1 August 2018; Published 17 September 2018

Academic Editor: Taoufik Ghairi

Copyright © 2018 Antonio Sorlozano-Puerto et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** The aim of this study was to compare the *in vitro* antibacterial activity of two compounds derived from *Alliaceae*, PTS (propyl-propane-thiosulfinate), and PTSO (propyl-propane-thiosulfonate), with that of other antibiotics commonly used against bacteria isolated from humans. **Materials and Methods.** A total of 212 gram-negative bacilli and 267 gram-positive cocci isolated from human clinical samples and resistant to at least one group of antibiotics were selected. In order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) to various antibiotics as well as PTS and PTSO, all isolates underwent broth microdilution assay. **Results.** PTS showed moderate activity against *Enterobacteriaceae* with MIC<sub>50</sub> (and MBC<sub>50</sub>) and MIC<sub>90</sub> (and MBC<sub>90</sub>) values of 256-512 mg/L, while PTSO showed greater activity with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of 64-128 mg/L and MBC<sub>50</sub> and MBC<sub>90</sub> values of 128-512 mg/L. These data show the bactericidal activity of both compounds and indicate that PTSO was more active than PTS against this group of bacteria. Both compounds showed lower activity against *P. aeruginosa* (MIC<sub>50</sub> = 1024 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 2048 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 2048 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 2048 mg/L, for PTS; MIC<sub>50</sub> = 512 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 1024 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 512 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 2048 mg/L, for PTSO) compared to those obtained in others nonfermenting gram-negative bacilli (MIC<sub>50</sub> = 128 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 512 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 128 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 512 mg/L, for PTS; MIC<sub>50</sub> = 64 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 256 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 64 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 256 mg/L, for PTSO) and also indicate the bactericidal activity of both compounds against these groups of bacteria. Finally, the activity against *S. aureus*, *E. faecalis*, and *S. agalactiae* was higher than that observed against enterobacteria, especially in the case of PTSO (MIC<sub>50</sub> = 8 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 8 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 32 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 64 mg/L, in *S. aureus*; MIC<sub>50</sub> = 4 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 8 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 8 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 16 mg/L, in *E. faecalis* and *S. agalactiae*). **Conclusion.** PTS and PTSO have a significant broad spectrum antibacterial activity against multiresistant bacteria isolated from human clinical samples. Preliminary results in present work provide basic and useful information for development and potential use of these compounds in the treatment of human infections.

## 1. Introduction

The use of conventional antibiotics for the prevention of infectious diseases and as growth promoters in animal

production has fostered the appearance of resistant bacteria and the transmission of these pathogens to humans [1]. In addition, the use and sometimes misuse of antibiotics in humans has increased the occurrence of infections (urinary

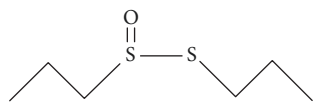


FIGURE 1: Chemical structure of propyl-propane-thiosulfinate (PTS).

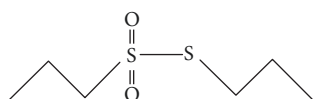


FIGURE 2: Chemical structure of propyl-propane-thiosulfonate (PTSO).

tract infections, respiratory tract infections, skin and soft tissue infections, etc.) caused by multiresistant bacteria, which has reduced the therapeutic options and has made necessary the selection of new molecules with antibacterial properties [2]. Natural compounds obtained from vegetables with antibacterial properties could be considered an alternative to conventional antibiotics [3].

In recent years, the antibacterial properties of some compounds obtained from *Allium* plants such as garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*) have been described. These can inhibit the growth of a range of gram-positive and gram-negative bacteria, including both pathogenic and commensal bacteria in humans and animals [4, 5]. *Allium*-derived products have been reported to be effective even against those strains that have become resistant to antibiotics [6].

Two of these *Allium*-derived compounds, propyl-propane-thiosulfinate (PTS) (Figure 1) and propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) (Figure 2), are organosulphurate products obtained by decomposition of initial compounds naturally present in garlic bulbs as alliin and allicin. In several *in vitro* and *in vivo* studies against pathogenic bacteria from animals, both compounds have showed an antibiotic activity [3, 7, 8]. While the precise mechanism of action is not yet known, the main antibacterial effect of thiosulfonates (as allicin) has been reported to be due to (i) its accessibility resulting from high permeability through phospholipid membranes [9]; (ii) its chemical reaction with thiol groups of various enzymes such as the bacterial acetyl-CoA-forming system, consisting of acetate kinase and phosphotransacetyl-CoA synthetase, blocking acetate incorporation into fatty acids and inhibiting the formation of lipids [10]; and (iii) the inhibition of RNA polymerase and RNA synthesis [11].

Therefore, the aim of this study was to compare the *in vitro* antibacterial activity of the compounds derived from garlic PTS and PTSO with that of other antibiotics commonly used against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human clinical samples.

## 2. Material and Methods

**2.1. Antibiotics, PTS and PTSO.** All antibiotics were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) and each

antibiotic was dissolved according to the manufacturer's recommendations.

PTS and PTSO (95% purity) were supplied by DMC Research (Alhendín, Granada, Spain) and dissolved in polysorbate-80 to a final concentration of 50%. The biosynthesis of propyl-propane-thiosulfinate (PTS) and propyl-propane-thiosulfonate (PTSO) is made from propiin, an amino acid derived from L-cysteine found in *Allium* species. The first step of the biosynthesis is the formation of a sulfenic acid, which is highly reactive and immediately produces PTS by a condensation reaction. In the last step, oxidation of PTS induces its dismutation in PTSO and propyl disulfide that can be oxidized and transformed to PTSO and that way the oxidation of PTS to PTSO is completed.

**2.2. Bacterial Isolates.** A total of 212 gram-negative bacilli and 267 gram-positive cocci isolated from clinical samples obtained from 479 different patients were selected. Identification and susceptibility studies were performed using WIDER system (Francisco Soria Melguizo, Madrid, Spain) or MicroScan system (Siemens Healthcare Diagnostics, Madrid, Spain). The susceptibility results obtained through these systems allowed the selection of isolates, based on the resistance presence to at least one group of antibiotics commonly used in the treatment of infections caused by these bacteria.

The presence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* (ESBL) was confirmed by the diffusion method with disks containing cefotaxime (30 µg), cefotaxime/clavulanic acid (30/10 µg), ceftazidime (30µg), and ceftazidime/clavulanic acid (30/10µg). The resistance to methicillin was confirmed using the Mueller-Hinton agar diffusion procedure with 30 µg cefoxitin disks. Both procedures were performed as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute [12].

A total of 151 clinical isolates of *Enterobacteriaceae* (68 *Escherichia coli*, 33 *Klebsiella pneumoniae*, 6 *Klebsiella oxytoca*, 15 *Salmonella* spp., 17 *Yersinia enterocolitica*, 7 *Enterobacter cloacae*, 2 *Providencia stuartii*, 1 *Citrobacter amalonaticus*, 1 *Kluyvera cryocrescens*, and 1 *Proteus vulgaris*), 61 of non-fermenting gram-negative bacilli (40 *Pseudomonas aeruginosa*, 9 *Acinetobacter baumannii*, 7 *Aeromonas hydrophila*, 3 *Stenotrophomonas maltophilia*, 1 *Achromobacter xylosoxidans*, and 1 *Comamonas acidovorans*), 112 *Staphylococcus aureus* (all of them methicillin-resistant), 54 *Enterococcus faecalis* (all of them fluoroquinolone-resistant), and 101 *Streptococcus agalactiae* were selected. All isolates were stored at -40°C until the susceptibility study by microdilution.

**2.3. In Vitro Antibacterial Assay.** In order to determine the antibacterial susceptibilities, all 479 isolates underwent broth microdilution assay in Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB) following the guidelines of the CLSI [12]. Broth microdilution testing was performed with 96-well, round-bottom microtiter plates with a final concentration of the bacterial cell suspension equal to  $1 \times 10^5$  colony forming units per milliliter (CFU/ml) in each well.

Each plate included negative controls (medium only) and 11 serial twofold dilutions of each antibiotic, PTS, or PTSO. The positive controls (only bacterial suspension without

antibiotics) were added per well in a separate round-bottom plate.

The concentration ranges (in mg/L) assayed for *Enterobacteriaceae* for each antibiotic were the following: amoxicillin/clavulanate (0.25/0.125-256/128), piperacillin/tazobactam (0.5/4-512/4), cefuroxime (0.5-512), cefoxitin (0.5-512), cefotaxime (0.125-128), ceftazidime (0.5-512), cefepime (0.25-256), imipenem (0.016-16), meropenem (0.016-16), gentamicin (0.125-128), tobramycin (0.125-128), amikacin (0.5-512), ciprofloxacin (0.125-128), trimethoprim/sulfamethoxazole (0.06/1.1875-64/1216), and nitrofurantoin (1-1024). The concentration ranges assayed for nonfermenting gram-negative bacilli for each antibiotic were piperacillin/tazobactam (0.5/4-512/4), ceftazidime (0.5-512), cefepime (0.25-256), imipenem (0.125-128), meropenem (0.125-128), gentamicin (0.125-128), tobramycin (0.125-128), amikacin (0.5-512), and ciprofloxacin (0.125-128). The concentration ranges for staphylococci were gentamicin (0.25-256), tobramycin (0.25-256), erythromycin (0.06-64), clindamycin (0.06-64), levofloxacin (0.06-64), linezolid (0.03-32), vancomycin (0.015-16), teicoplanin (0.03-32), daptomycin (0.008-8), rifampicin (0.03-32), and trimethoprim/sulfamethoxazole (0.06/1.1875-64/1216). The concentration ranges for enterococci were ampicillin (0.03-32), levofloxacin (0.06-64), linezolid (0.008-8), vancomycin (0.06-64), teicoplanin (0.03-32), and daptomycin (0.008-8). Finally, the concentration ranges assayed for *S. agalactiae* for each antibiotic were ampicillin (0.004-4), erythromycin (0.06-64), clindamycin (0.06-64), levofloxacin (0.06-64), linezolid (0.008-8), vancomycin (0.008-8), and daptomycin (0.008-8).

The concentration ranges of PTS were 2-2048 mg/L in *Enterobacteriaceae*, nonfermenting gram-negative bacilli and *S. aureus*, and 4-4096 mg/L in *E. faecalis* and *S. agalactiae*. For PTSO, they were 2-2048 mg/L in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting gram-negative bacilli and 0.125-128 mg/L in gram-positive cocci. Thus, the final concentration of polysorbate-80 in the wells was less than 1%.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was defined as the lowest antibiotic concentration to completely inhibit the visible growth of a microorganism after overnight incubation and the isolates were considered to be susceptible, intermediate, or resistant, according to the recommendations of the CLSI [12]. A "susceptible" result indicates that the patient's organism should respond to therapy with that antibiotic using the dosage recommended normally for that type of infection and species. Conversely, a microorganism with a MIC interpreted as "resistant" should not be inhibited by the concentrations of the antibiotic achieved with the dosages normally used with that drug. An "intermediate" result indicates that a microorganism falls into a range of susceptibility in which the MIC approaches or exceeds the level of antibiotic that can ordinarily be achieved and for which clinical response is likely to be less than with a susceptible strain. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were defined as the lowest concentration of the antibiotic at which 50 and 90% of the isolates were inhibited, respectively.

For minimum bactericidal concentration (MBC) testing, 100 µl of broth from 1 to 5 wells containing no growth (which

showed no visible turbidity) was plated onto antibiotic-free Columbia agar and incubated overnight at 37°C. The highest dilution that yielded no single bacterial colony on the agar plates was taken as MBC. Allium extracts were then considered as bacteriostatic or bactericidal depending on the MBC/MIC ratio which were, respectively, greater than 2 or between 2 and 1. MBC<sub>50</sub> and MBC<sub>90</sub> values were defined as the concentration of the antibiotic which kills 50 and 90% of the isolates, respectively.

Following the CLSI guidelines, we used the following strains as quality control in the procedures: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 29213, and *E. faecalis* ATCC 29212.

**2.4. Statistical Analysis.** Data analysis was performed using the software IBM SPSS Statistics v19. The Mann-Whitney U test was used to compare the distribution of MIC and MBC values of PTS and PTSO in the different groups of bacteria studied. A level of significance was considered with a  $p < 0.05$ .

### 3. Results

Tables 1 and 2 show the values (in mg/L) of the MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub>, MBC<sub>50</sub>, and MBC<sub>90</sub> and percentages of resistance to the antibacterial agents tested of the 479 clinical isolates.

There was 59 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* (42 *E. coli*, 12 *K. pneumoniae*, and 5 *K. oxytoca*). The presence of this resistance phenotype in 39.1% of *Enterobacteriaceae* was the main determinant of the high rates of resistance to beta-lactam antibiotics, whose range oscillated from 1.3% to meropenem (MIC<sub>50</sub> = 0.125 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 1 mg/L) to 81.5% to cefuroxime (MIC<sub>50</sub> > 512 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 512 mg/L).

ESBL-producing strains were more resistant to second to fourth-generation cephalosporins, such as cefuroxime (MIC<sub>50</sub> > 512 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 512 mg/L, 100% resistant), cefotaxime (MIC<sub>50</sub> = 128 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 128 mg/L, and 100% resistant), ceftazidime (MIC<sub>50</sub> = 64 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 256 mg/L, and 78.0% resistant), and cefepime (MIC<sub>50</sub> = 32 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 128 mg/L, and 93.2% resistant) that combinations of beta-lactams with beta-lactamase inhibitors such as piperacillin-tazobactam (MIC<sub>50</sub> = 8/4 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 256/4 mg/L, and 30.5% resistant) and amoxicillin/clavulanate (MIC<sub>50</sub> = 16/8 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 256/128 mg/L, and 52.5% resistant) or to carbapenems such as imipenem (MIC<sub>50</sub> = 0.5 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 1 mg/L, and 100% susceptible) or meropenem (MIC<sub>50</sub> = 0.125 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 1 mg/L, and 100% susceptible). Nevertheless, the absence of ESBL in *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp. explains the lower number of isolates resistant to beta-lactam antibiotics in this group of enterobacteria (range 0-28.1%). Finally, in case of bacteria such as *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., or *Providencia* spp., among others (remaining enterobacteria group in Table 1), high rates of resistance to beta-lactams were observed: 16.7% to meropenem (MIC<sub>50</sub> = 0.06 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 1 mg/L) and 100% to cefuroxime (MIC<sub>50</sub> > 512 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 512 mg/L).

Among the aminoglycosides, amikacin was the antibiotic with a higher rate of activity against enterobacteria (MIC<sub>50</sub> = 16 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 512 mg/L, and 29.1% resistant), against 35.8% resistant to gentamicin (MIC<sub>50</sub> = 4 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 128

TABLE 1: Activity *in vitro* of PTS, PTSO, and others antibacterial agents against gram-negative organisms.

Organisms (number of isolates)	MIC <sub>50</sub> (in mg/L)	MIC <sub>90</sub> (in mg/L)	MBC <sub>50</sub> (in mg/L)	MBC <sub>90</sub> (in mg/L)	% of resistant isolates
<b>Enterobacteriaceae (n=151)</b>					
Amoxicillin/clavulanate	32/16	256/128	64/32	256/128	59.6
Piperacillin/tazobactam	8/4	256/4	32/4	512/4	31.8
Cefuroxime	>512	>512	>512	>512	81.5
Cefoxitin	8	256	64	512	37.1
Cefotaxime	64	>128	128	>128	77.5
Ceftazidime	16	256	64	512	58.3
Cefepime	8	128	32	256	65.6
Imipenem	1	1	2	16	2.0
Meropenem	0.125	1	0.25	4	1.3
Gentamicin	4	128	32	>128	35.8
Tobramycin	4	128	32	>128	42.4
Amikacin	16	>512	64	>512	29.1
Ciprofloxacin	64	>128	128	>128	67.6
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2/38	>64/1216	64/1216	>64/1216	53.0
Nitrofurantoin	32	256	128	512	43.0
PTS	256	512	256	512	-
PTSO	64	128	128	512	-
<b>Escherichia coli (n=68)</b>					
Amoxicillin/clavulanate	16/8	256/128	64/32	>256/128	55.9
Piperacillin/tazobactam	8/4	128/4	32/4	256/4	26.5
Cefuroxime	>512	>512	>512	>512	95.6
Cefoxitin	8	128	32	256	33.8
Cefotaxime	128	>128	>128	>128	94.1
Ceftazidime	32	256	64	>512	75.0
Cefepime	16	128	64	256	80.9
Imipenem	0.5	1	2	4	0.0
Meropenem	0.06	1	0.125	4	0.0
Gentamicin	4	64	16	128	30.9
Tobramycin	4	64	16	128	33.8
Amikacin	8	32	32	128	14.7
Ciprofloxacin	64	128	128	>128	73.5
Trimethoprim/sulfamethoxazole	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	61.8
Nitrofurantoin	32	64	64	256	14.7
PTS	128	256	256	512	-
PTSO	64	128	128	512	-
<b>Klebsiella spp. (n=39)</b>					
Amoxicillin/clavulanate	32/16	64/32	64/32	256/128	82.1
Piperacillin/tazobactam	32/4	512/4	64/4	>512/4	59.0
Cefuroxime	>512	>512	>512	>512	97.4
Cefoxitin	32	512	64	>512	53.8
Cefotaxime	64	>128	128	>128	97.4
Ceftazidime	64	256	128	512	76.9
Cefepime	16	64	32	256	79.5
Imipenem	1	1	2	4	0.0
Meropenem	0.06	0.25	0.125	1	0.0
Gentamicin	64	>128	64	>128	66.7
Tobramycin	32	>128	32	>128	76.9

TABLE 1: Continued.

Organisms (number of isolates)	MIC <sub>50</sub> (in mg/L)	MIC <sub>90</sub> (in mg/L)	MBC <sub>50</sub> (in mg/L)	MBC <sub>90</sub> (in mg/L)	% of resistant isolates
Amikacin	64	>512	128	>512	53.8
Ciprofloxacin	128	>128	>128	>128	87.2
Trimethoprim/sulfamethoxazole	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	79.5
Nitrofurantoin	64	128	128	256	61.5
PTS	256	512	256	512	-
PTSO	128	256	128	512	-
<b>ESBL-producers (n=59)</b>					
Amoxicillin/clavulanate	16/8	>256/128	64/32	>256/128	52.5
Piperacillin/tazobactam	8/4	256/4	32/4	512/4	30.5
Cefuroxime	>512	>512	>512	>512	100
Cefoxitin	8	64	32	128	25.4
Cefotaxime	128	>128	>128	>128	100
Ceftazidime	64	256	256	>512	78.0
Cefepime	32	128	64	>256	93.2
Imipenem	0.5	1	2	4	0.0
Meropenem	0.125	1	0.25	4	0.0
Gentamicin	4	128	16	>128	37.3
Tobramycin	4	128	32	>128	47.5
Amikacin	16	128	64	128	25.4
Ciprofloxacin	64	>128	128	>128	74.6
Trimethoprim/sulfamethoxazole	>64/1216	>64/1216	>64/1216	>64/1216	62.7
Nitrofurantoin	32	128	64	256	32.2
PTS	128	256	256	512	-
PTSO	64	128	128	512	-
<b>Salmonella spp. and Yersinia spp. (n=32)</b>					
Amoxicillin/clavulanate	8/4	256/128	64/32	256/128	28.1
Piperacillin/tazobactam	2/4	128/4	16/4	128/4	12.5
Cefuroxime	4	>512	32	>512	25.0
Cefoxitin	8	64	64	128	12.5
Cefotaxime	1	1	8	64	12.5
Ceftazidime	4	4	16	64	0.0
Cefepime	2	32	16	64	0.0
Imipenem	1	1	16	16	0.0
Meropenem	1	1	4	8	0.0
Gentamicin	4	4	32	32	3.1
Tobramycin	4	4	32	32	6.3
Amikacin	16	128	128	256	34.4
Ciprofloxacin	1	128	8	128	37.5
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2/38	2/38	16/304	>64/1216	3.1
Nitrofurantoin	256	512	512	1024	65.6
PTS	256	256	256	512	-
PTSO	64	128	64	128	-
<b>Remaining enterobacteria (n=12)</b>					
Amoxicillin/clavulanate	64/32	128/64	256/128	256/128	91.7
Piperacillin/tazobactam	4/4	64/4	8/4	256/4	25.0
Cefuroxime	>512	>512	>512	>512	100
Cefoxitin	256	>512	256	>512	66.7
Cefotaxime	64	>128	128	>128	91.7
Ceftazidime	8	128	32	512	58.3

TABLE 1: Continued.

Organisms (number of isolates)	MIC <sub>50</sub> (in mg/L)	MIC <sub>90</sub> (in mg/L)	MBC <sub>50</sub> (in mg/L)	MBC <sub>90</sub> (in mg/L)	% of resistant isolates
Cefepime	8	64	8	256	66.7
Imipenem	1	4	2	16	25.0
Meropenem	0.06	1	0.125	4	16.7
Gentamicin	4	32	32	>128	50.0
Tobramycin	8	32	16	>128	58.3
Amikacin	4	256	8	>512	16.7
Ciprofloxacin	1	>128	8	>128	50.0
Trimethoprim/sulfamethoxazole	2/38	>64/1216	16/304	>64/1216	50.0
Nitrofurantoin	64	>1024	128	>1024	83.3
PTS	128	256	256	256	-
PTSO	64	128	128	256	-
<b>Nonfermenting gram-negative bacilli (n=61)</b>					
Piperacillin/tazobactam	16/4	512/4	128/4	512/4	34.4
Ceftazidime	8	128	64	512	32.8
Cefepime	8	32	64	256	42.6
Imipenem	16	128	32	>128	52.5
Meropenem	4	64	16	128	52.5
Gentamicin	4	>128	32	>128	39.3
Tobramycin	4	>128	32	>128	27.9
Amikacin	8	128	32	256	19.7
Ciprofloxacin	32	>128	64	>128	59.0
PTS	1024	2048	1024	2048	-
PTSO	256	1024	512	2048	-
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=40)</b>					
Piperacillin/tazobactam	16/4	256/4	128/4	256/4	25.0
Ceftazidime	8	64	64	256	27.5
Cefepime	8	32	64	128	32.5
Imipenem	16	128	32	128	57.5
Meropenem	4	64	32	128	57.5
Gentamicin	4	>128	16	>128	37.5
Tobramycin	4	128	16	>128	17.5
Amikacin	8	32	32	128	12.5
Ciprofloxacin	32	>128	64	>128	62.5
PTS	1024	2048	2048	2048	-
PTSO	512	1024	512	2048	-
<b>Remaining nonfermenting gram-negative bacilli (n=21)</b>					
Piperacillin/tazobactam	128/4	512/4	512/4	>512/4	52.4
Ceftazidime	8	128	64	512	42.9
Cefepime	16	64	128	256	61.9
Imipenem	2	>128	16	>128	42.9
Meropenem	2	16	8	>128	42.9
Gentamicin	4	>128	32	>128	42.9
Tobramycin	4	>128	32	>128	47.6
Amikacin	16	256	64	256	33.3
Ciprofloxacin	4	>128	32	>128	52.4
PTS	128	512	128	512	-
PTSO	64	256	64	256	-

MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration; % of resistant isolates: percentages of isolates intermediate or resistant according to the criteria published by the CLSI (2016).

TABLE 2: Activity *in vitro* of PTS, PTSO, and others antibacterial agents against gram-positive organisms.

Organisms (number of isolates)	MIC <sub>50</sub> (in mg/L)	MIC <sub>90</sub> (in mg/L)	MBC <sub>50</sub> (in mg/L)	MBC <sub>90</sub> (in mg/L)	% of resistant isolates
<b><i>Staphylococcus aureus</i> methicillin-resistant (n=112)</b>					
Gentamicin	4	256	16	>256	48.2
Tobramycin	64	>256	>256	>256	79.5
Erythromycin	>64	>64	>64	>64	69.6
Clindamycin	>64	>64	>64	>64	49.1
Levofloxacin	8	32	32	>64	89.3
Linezolid	2	4	4	8	0.0
Vancomycin	0.5	1	1	4	0.0
Teicoplanin	0.25	1	0.5	4	0.0
Daptomycin	0.25	0.5	0.5	2	0.0
Rifampicin	≤0.03	0.5	0.125	1	3.6
Trimethoprim/sulfamethoxazole	≤0.06	0.5	0.5	2	3.6
PTS	64	128	512	1024	-
PTSO	8	8	32	64	-
<b><i>Enterococcus faecalis</i> (n=54)</b>					
Ampicillin	1	2	2	8	0.0
Levofloxacin	32	64	>64	>64	100
Linezolid	2	2	4	8	0.0
Vancomycin	0.5	1	2	4	0.0
Teicoplanin	≤0.03	0.125	0.25	1	0.0
Daptomycin	2	4	4	8	0.0
PTS	128	128	2048	4096	-
PTSO	4	8	8	16	-
<b><i>Streptococcus agalactiae</i> (n=101)</b>					
Ampicillin	0.06	0.125	0.125	0.5	0.0
Erythromycin	>64	>64	>64	>64	94.1
Clindamycin	>64	>64	>64	>64	85.1
Levofloxacin	0.5	1	2	8	6.9
Linezolid	1	2	2	4	0.0
Vancomycin	1	1	2	4	0.0
Daptomycin	0.125	0.5	0.5	2	0.0
PTS	64	128	512	2048	-
PTSO	4	8	8	16	-

MIC: minimum inhibitory concentration; MBC: minimum bactericidal concentration; % of resistant isolates: percentages of isolates intermediate or resistant according to the criteria published by the CLSI (2016).

mg/L) or 42.4% to tobramycin (MIC<sub>50</sub> = 4 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 128 mg/L). The resistance to aminoglycosides was higher among *Klebsiella* spp. and the group “remaining enterobacteria” than *E. coli*, *Salmonella* spp., or *Yersinia* spp. In general, enterobacteria showed high resistance to fluoroquinolones (MIC<sub>50</sub> = 64 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 128 mg/L, and 67.6% of resistant isolates to ciprofloxacin) and to trimethoprim-sulfamethoxazole (MIC<sub>50</sub> = 2/38 mg/L, MIC<sub>90</sub> > 64/1216 mg/L, and 53.0% resistant), except for *Salmonella* spp. and *Yersinia* spp., which showed the lowest rates (37.5% and 3.1% of resistant isolates to ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole, respectively). *E. coli* was the bacteria with a lower resistance to nitrofurantoin (MIC<sub>50</sub> = 32 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 64 mg/L, and 14.7% resistant).

As previously mentioned, bacteria were selected for their detection of resistance to, at least, a group of antibiotics. However, a relevant characteristic of the 151 enterobacteria included in the study was the high frequency to coresistance to two or more of these groups (multidrug-resistant bacteria), as described in Table 3. Therefore, 74.0% of the isolates resistant to some beta-lactams antibiotics were also resistant to ciprofloxacin, 61.8% to trimethoprim-sulfamethoxazole, and 48.8% to some aminoglycoside. It should be noted that 22.8% of that resistant to beta-lactams was also resistant to all the other groups of antibiotics assayed.

The behaviour of PTS and PTSO against multidrug-resistant enterobacteria was quite homogeneous, regardless the group analyzed (Table 1). The values of MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>

TABLE 3: Analysis of coreistance to different groups of antibiotics.

	Enterobacteria resistant to some beta-lactams antibiotics (n=123; 81.5%)	ESBL-producers enterobacteria (n=59; 39.1%)	Non ESBL-producers enterobacteria resistant to some beta-lactams antibiotics (n=64; 42.4%)	Non-fermenting gram-negative bacilli resistant to fluoroquinolones (n=36; 59.0%)	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (n=112)
Resistance to beta-lactams	-	-	-	75.0%	-
Resistance to aminoglycosides	48.8%	47.5%	50%	63.9%	79.5%
Resistance to fluoroquinolones	74.0%	74.6%	73.4%	-	89.3%
Resistance to TMX	61.8%	62.7%	60.9%	-	3.6%
Resistance to nitrofurantoin	41.5%	32.2%	50.0%	-	-
Resistance to macrolides (erythromycin)	-	-	-	-	69.6%
Resistance to lincosamides (clindamycin)	-	-	-	-	49.1%
Resistance to rifampicin	-	-	-	-	3.6%
Resistance to aminoglycosides & fluoroquinolones	46.3%	44.1%	50.0%	-	75.9%
Resistance to aminoglycosides & fluoroquinolones & TMX	41.5%	39.0%	45.3%	-	2.7%
Resistance to aminoglycosides & fluoroquinolones & TMX & nitrofurantoin	22.8%	22.0%	23.4%	-	-
Resistance to beta-lactams & aminoglycosides	-	-	-	55.6%	-
Resistance to aminoglycosides & fluoroquinolones & macrolides	-	-	-	-	60.7%
Resistance to aminoglycosides & fluoroquinolones & macrolides & lincosamides	-	-	-	-	45.5%

TMX: Trimethoprim/sulfamethoxazole.



of PTS ranged from 128 to 256 mg/L and from 256 to 512 mg/L, while the  $MBC_{50}$  and  $MBC_{90}$  ranged from 256 mg/L and 256 to 512 mg/L, respectively. On the other hand, the values of  $MIC_{50}$  and  $MIC_{90}$  of PTSO ranged from 64 to 128 mg/L and 128 to 256 mg/L, while  $MBC_{50}$  and  $MBC_{90}$  ranged from 64 to 128 mg/L and from 128 to 512 mg/L, respectively. These data show the bactericidal activity of both compounds (MIC and MBC values were equal or differed in only one dilution) and indicate that PTSO was significantly more active than PTS against this group of bacteria ( $p < 0.001$ ).

Among the 61 nonfermenting gram-negative bacilli, the resistance to beta-lactams antibiotics ranged from 32.8% to ceftazidime ( $MIC_{50} = 8$  mg/L,  $MIC_{90} = 128$  mg/L) and 52.5% to imipenem ( $MIC_{50} = 16$  mg/L,  $MIC_{90} = 128$  mg/L) and meropenem ( $MIC_{50} = 4$  mg/L,  $MIC_{90} = 64$  mg/L). Carbapenems showed more activity against bacteria such as *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., and *Stenotrophomonas* spp. ( $MIC_{50} = 2$  mg/L,  $MIC_{90} > 128$  mg/L, and 42.9% of isolates resistant to imipenem and  $MIC_{50} = 2$  mg/L,  $MIC_{90} = 16$  mg/L, and 42.9% of isolates resistant to meropenem), than against *Pseudomonas* spp. ( $MIC_{50} = 16$  mg/L,  $MIC_{90} = 128$  mg/L, and 57.5% of isolates resistant to imipenem and  $MIC_{50} = 4$  mg/L,  $MIC_{90} = 64$  mg/L, and 57.5% of isolates resistant to meropenem). Among the aminoglycosides assayed, amikacin was the most active against both groups ( $MIC_{50} = 8$  mg/L,  $MIC_{90} = 128$  mg/L, and 19.7% resistant). Finally, 59.0% of isolates were resistant to ciprofloxacin ( $MIC_{50} = 32$  mg/L,  $MIC_{90} > 128$  mg/L), which resulted in less active against *P. aeruginosa* isolates than against other bacteria of this group. As shown in Table 3, 75.0% of the isolates resistant to fluoroquinolones (ciprofloxacin) were also resistant to some beta-lactam antibiotic; 63.9% to some aminoglycoside and 55.6% showed resistance to these three groups of antibiotics.

Just as with the rest of antibiotics, when comparing the results obtained in *P. aeruginosa* with those obtained in others nonfermenting gram-negative bacilli, the behaviour, both of PTS and PTSO, was significantly different (Table 1). In the case of PTS, the results shown in *P. aeruginosa* were  $MIC_{50} = 1024$  mg/L,  $MIC_{90} = 2048$  mg/L,  $MBC_{50} = 2048$  mg/L, and  $MBC_{90} = 2048$  mg/L, while in the rest of bacteria they showed more activity ( $MIC_{50} = 128$  mg/L,  $MIC_{90} = 512$  mg/L,  $MBC_{50} = 128$  mg/L, and  $MBC_{90} = 512$  mg/L) ( $p < 0.001$ ). Likewise, the results for PTSO indicated less activity against *Pseudomonas* spp. ( $MIC_{50} = 512$  mg/L,  $MIC_{90} = 1024$  mg/L,  $MBC_{50} = 512$  mg/L, and  $MBC_{90} = 2048$  mg/L) than against the rest of isolates ( $MIC_{50} = 64$  mg/L,  $MIC_{90} = 256$  mg/L,  $MBC_{50} = 64$  mg/L, and  $MBC_{90} = 256$  mg/L) ( $p < 0.001$ ). In any case, these data also indicate the bactericidal activity of both compounds, especially PTSO that showed significantly more activity than PTS ( $p < 0.001$ ).

Concerning the gram-positive cocci, all the isolates were susceptible to vancomycin, teicoplanin (*S. agalactiae* was not tested), daptomycin, and linezolid. Besides, all the isolates of *E. faecalis* and *S. agalactiae* were also susceptible to ampicillin (Table 2).

All the isolates of *S. aureus* were resistant to methicillin (this was the selection criteria in this bacteria) and therefore to all beta-lactams antibiotics. High rates of resistance to fluoroquinolones ( $MIC_{50} = 8$  mg/L,  $MIC_{90} = 32$  mg/L, 89.3%

resistant to levofloxacin), to aminoglycosides ( $MIC_{50} = 64$  mg/L,  $MIC_{90} > 256$  mg/L, 79.5% resistant to tobramycin), to macrolides ( $MIC_{50} > 64$  mg/L,  $MIC_{90} > 64$  mg/L, 69.6% resistant to erythromycin), or to lincosamides ( $MIC_{50} > 64$  mg/L,  $MIC_{90} > 64$  mg/L, 49.1% resistant to clindamycin) were observed. In contrast, trimethoprim-sulfamethoxazole ( $MIC_{50} < 0.06$  mg/L,  $MIC_{90} = 0.5$  mg/L, 3.6% resistant) and rifampicin ( $MIC_{50} < 0.03$  mg/L,  $MIC_{90} = 0.5$  mg/L, and 3.6% resistant) showed the lowest rates of resistance. The 75.9% of these bacteria were resistant, both to aminoglycosides and fluoroquinolones, and 60.7% also showed resistance to macrolides and 45.5% also to clindamycin (Table 3). Finally, 100% of isolates of *E. faecalis* were resistant to levofloxacin ( $MIC_{50} = 32$  mg/L,  $MIC_{90} = 64$  mg/L) and resistance to any other antibiotic was not associated, whereas 86 out of 101 isolates of *S. agalactiae* were resistant to erythromycin and clindamycin.

PTSO showed significantly more activity than PTS in the three groups of gram-positive bacteria tested ( $p < 0.001$ , in all cases) and the values for  $MIC_{50}$ ,  $MIC_{90}$ ,  $MBC_{50}$ , and  $MBC_{90}$  were, for both compounds, lower than those obtained against gram-negative bacteria (Table 2). However, MIC and MBC values in gram-positive bacteria differed significantly, especially for PTS (more than 2 dilutions), which indicates that these compounds could have a bacteriostatic but not a bactericidal effect against these bacteria at least at low concentrations.

#### 4. Discussion

Organosulfur compounds obtained from *Allium* spp. such as PTS and PTSO have been proposed as an effective alternative to antibiotics to improve animal performance and prevent gastrointestinal disorders. This is due on the one hand to their greater stability in comparison to other natural compounds [13] and on the other hand to their activity against bacterial groups, such as *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., or *Campylobacter* spp., among others [3, 4, 7]. Furthermore, it has been shown that feed supplementation with these compounds improves the digestion and absorption of nutrients in the gastrointestinal tract by modulating the intestinal microbiota and increases the villus height and mucosal thickness [7, 8]. Beyond its use in animals, it is possible that these molecules may as well be useful in the human clinical practice, due to the fact that alliaceous plants have been traditionally used for their antibacterial, antioxidant, and cardiovascular properties, as has been known for centuries [6].

To our knowledge, this is the first study to evaluate the activity of PTS and PTSO against a selection of gram-negative and gram-positive multiresistant bacteria isolated from human clinical samples. Antibiotic susceptibility tests were performed in accordance with the procedure outlined by CLSI in order to determine if a bacterium is susceptible or resistant to each of the antibiotic assayed. Although the cut-off points for PTS or PTSO are unknown, perform the assay under the same conditions as the other antibiotics allow us to make comparisons with them.

Our results revealed that PTS showed moderate activity against *Enterobacteriaceae* with MIC<sub>50</sub> (and MBC<sub>50</sub>) and MIC<sub>90</sub> (and MBC<sub>90</sub>) values of 256-512 mg/L, while PTSO showed greater activity with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of 64-128 mg/L and MBC<sub>50</sub> and MBC<sub>90</sub> values of 128-512 mg/L. These homogeneous results among the different groups of enterobacteria selected, regardless of the resistance shown to different antibiotics commonly used in clinical practice, reveal the bactericidal action of these compounds. According to these results, Ruiz et al. also proved a bactericidal effect against enterobacteria, such as *E. coli* and *Salmonella typhimurium* [3].

The activity against methicillin-resistant *S. aureus*, *E. faecalis*, and *S. agalactiae* was higher than that observed against enterobacteria, especially in the case of PTSO (MIC<sub>50</sub> = 8 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 8 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 32 mg/L, MBC<sub>90</sub> = 64 mg/L, in *S. aureus*; MIC<sub>50</sub> = 4 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 8 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 8 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 16 mg/L, in *E. faecalis* and *S. agalactiae*). The PTS activity against this group of bacteria was significantly lower, especially in the case of enterococci. Some authors have evaluated the potential of garlic allicin, a molecule structurally similar to PTS, to control oral pathogens, reporting inhibitory concentrations of 600 mg/L against *Streptococcus* spp. [14]. Other studies have reported a bacteriostatic effect of allicin against vancomycin resistant enterococci [15].

However, in contrast to the relatively good results obtained previously, both compounds showed lower activity against *P. aeruginosa* (MIC<sub>50</sub> = 1024 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 2048 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 2048 mg/L, MBC<sub>90</sub> = 2048 mg/L, for PTS; MIC<sub>50</sub> = 512 mg/L, MIC<sub>90</sub> = 1024 mg/L, MBC<sub>50</sub> = 512 mg/L, and MBC<sub>90</sub> = 2048 mg/L, for PTSO). It is possible that PTS and PTSO may be affected by active removal mechanisms when they come in contact with these bacteria. Further research is needed to determine with certainty the mechanisms involved in this increased resistance.

All these results are in agreement with the antibacterial effects of garlic previously described in the literature against bacterial isolates from animals and reference strains [3-6]. However, MBC determined in our experiment were much higher compared to Llana-Ruiz-Cabello et al. who demonstrated MBC lower than 5 mg/L in all cases [16]. The differences may be caused by different methodology.

In the present study, the values obtained for MIC and MBC in PTS and PTSO were very similar to those obtained in antibiotics such as nitrofurantoin, aminoglycosides, fluoroquinolones, and some beta-lactams. Based on the data obtained from MIC, the CLSI determines that a very large percentage of enterobacteria should be resistant to these antibiotics (as shown in Tables 1 and 2). It should therefore not be considered for clinical use. Likewise, we may think that the activity shown by PTS and PTSO should also not be considered for clinical use in humans considering the results obtained. However, due to the lack of susceptibility cut-off points for the compounds derived from garlic, no final conclusion can be drawn.

In correspondence with the need of discovering new potentially antibacterial natural products, the activity of these organosulfur compounds described in this study may be

considered as promising. Furthermore, the use of naturally and potentially innocuous compounds that can be administered without high restrictions provided us with the possibility to discuss the viability of their application for the treatment of specific infectious pathologies, provided that adequate formulations are developed.

In our opinion, several therapeutic possibilities may be considered, i.e., superficial skin infections, such as acne, folliculitis or impetigo by topical use, the treatment of oral and gastrointestinal infections by oral administration, or even the treatment of urinary tract infections caused by multidrug-resistant bacteria applied by intravesical instillation (in the same way that colistin is used). The concentration of the substance in the source of the infection should always be high enough to guarantee that it exceeds the values of MIC against the bacteria causing these processes.

It is clear that, in order to evaluate the real effectiveness of these substances, either in this or another situation, further testing would be necessary with a more diverse and larger group of bacteria. Furthermore, it would be necessary to establish suitable administration routes for the compounds and its efficacy *in vivo*. Finally, the concentrations that they achieve in the different tissues and fluids would also need to be known.

Lastly, PTS and PTSO are perceived as harmless since these compounds occur naturally in foods such as garlic or onion. Nevertheless, further studies on pharmacokinetic and toxicological characteristics are required before safe clinical use is considered. Some recent studies on cell lines and experimental animals reported low acute and subchronic oral toxicity in PTSO and a lack of genotoxicity, both *in vitro* and *in vivo* models [16-19].

## 5. Conclusion

Our results demonstrate that PTS, but mainly PTSO, have a significant broad spectrum antibacterial activity against a selection of gram-negative and gram-positive multiresistant bacteria isolated from human clinical samples. Further work is needed to demonstrate the effectiveness of these compounds *in vivo* models, although preliminary results in present work provide basic and useful information for development and its potential use in the treatment of human infections.

## Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

## Conflicts of Interest

The authors wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

## References

- [1] J. J. Dibner and J. D. Richards, "Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action," *Poultry Science*, vol. 84, no. 4, pp. 634-643, 2005.

- [2] M. F. Chellat, L. Raguž, and R. Riedl, "Targeting antibiotic resistance," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 55, no. 23, pp. 6600–6626, 2016.
- [3] R. Ruiz, M. P. García, A. Lara, and L. A. Rubio, "Garlic derivatives (PTS and PTS-O) differently affect the ecology of swine faecal microbiota in vitro," *Veterinary Microbiology*, vol. 144, no. 1-2, pp. 110–117, 2010.
- [4] P. S. Ruddock, M. Liao, B. C. Foster, L. Lawson, J. T. Arnason, and J.-A. R. Dillon, "Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*," *Phytotherapy Research*, vol. 19, no. 4, pp. 327–334, 2005.
- [5] Z. M. Ross, E. A. O'Gara, D. J. Hill, H. V. Sleightholme, and D. J. Maslin, "Antimicrobial properties of garlic oil against human enteric bacteria: Evaluation of methodologies and comparisons with garlic oil sulfides and garlic powder," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 1, pp. 475–480, 2001.
- [6] J. C. Harris, S. L. Cottrell, S. Plummer, and D. Lloyd, "Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic)," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 57, no. 3, pp. 282–286, 2001.
- [7] M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, and L. A. Rubio, "Garlic derivative propyl propane thiosulfonate is effective against broiler enteropathogens in vivo," *Poultry Science*, vol. 91, no. 9, pp. 2148–2157, 2012.
- [8] M. J. Peinado, R. Ruiz, A. Echávarri, I. Aranda-Olmedo, and L. A. Rubio, "Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens," *Animal Feed Science and Technology*, vol. 181, no. 1-4, pp. 87–92, 2013.
- [9] T. Miron, A. Rabinkov, D. Mirelman, M. Wilchek, and L. Weiner, "The mode of action of allicin: Its ready permeability through phospholipid membranes may contribute to its biological activity," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1463, no. 1, pp. 20–30, 2000.
- [10] M. Focke, A. Feld, and H. K. Lichtenthaler, "Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase," *FEBS Letters*, vol. 261, no. 1, pp. 106–108, 1990.
- [11] R. S. Feldberg, S. C. Chang, A. N. Kotik et al., "In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 32, no. 12, pp. 1763–1768, 1988.
- [12] CLSI, *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 26th edition, 2016, CLSI supplement M100S.
- [13] P. Abad, F. J. Lara, N. Arroyo-Manzanares, A. Baños, E. Guilamón, and A. M. García-Campaña, "High-performance liquid chromatography method for the monitoring of the *Allium* derivative propyl propane thiosulfonate used as natural additive in animal feed," *Food Analytical Methods*, vol. 8, no. 4, pp. 916–921, 2015.
- [14] G. Bachrach, A. Jamil, R. Naor, G. Tal, Z. Ludmer, and D. Steinberg, "Garlic allicin as a potential agent for controlling oral pathogens," *Journal of Medicinal Food*, vol. 14, no. 11, pp. 1338–1343, 2011.
- [15] D. Jonkers, J. Sluimer, and E. Stobberingh, "Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, article 3045, 1999.
- [16] M. Llana-Ruiz-Cabello, D. Gutiérrez-Praena, M. Puerto et al., "Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 82, pp. 1–11, 2015.
- [17] P. Mellado-García, S. Maisanaba, M. Puerto et al., "Genotoxicity assessment of propyl thiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 86, pp. 365–373, 2015.
- [18] P. Mellado-García, M. Puerto, S. Pichardo et al., "Toxicological evaluation of an *Allium*-based commercial product in a 90-day feeding study in Sprague-Dawley rats," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 90, pp. 18–29, 2016.
- [19] P. Mellado-García, M. Puerto, A. I. Prieto et al., "Genotoxicity of a thiosulfonate compound derived from *Allium* sp. intended to be used in active food packaging: In vivo comet assay and micronucleus test," *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, vol. 800-801, pp. 1–11, 2016.





## Article

# Antibacterial and Antifungal Activity of Propyl-Propane-Thiosulfinate and Propyl-Propane-Thiosulfonate, Two Organosulfur Compounds from *Allium cepa*: In Vitro Antimicrobial Effect via the Gas Phase

Antonio Sorlozano-Puerto <sup>1</sup>, Maria Albertuz-Crespo <sup>1</sup>, Isaac Lopez-Machado <sup>1</sup>, Lidia Gil-Martinez <sup>2</sup>, Juan Jose Ariza-Romero <sup>2</sup>, Alba Maroto-Tello <sup>2</sup>, Alberto Baños-Arjona <sup>2</sup> and Jose Gutierrez-Fernandez <sup>1,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Department of Microbiology, School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public Health, University of Granada-ibs, Avda. de la Investigación, 11, 18016 Granada, Spain; asp@ugr.es (A.S.-P.); albertuzmaria@correo.ugr.es (M.A.-C.); isloma@correo.ugr.es (I.L.-M.)
- <sup>2</sup> DMC Research Center, Camino de Jayena, 82, 18620 Alhendin, Spain; lidiagm@domca.com (L.G.-M.); jariza@dmrc.com (J.J.A.-R.); albamaroto@dmrc.com (A.M.-T.); abarjona@domca.com (A.B.-A.)
- <sup>3</sup> Laboratory of Microbiology, Virgen de las Nieves University Hospital-ibs, Avda. de las Fuerzas Armadas, 2, 18012 Granada, Spain
- \* Correspondence: josegf@ugr.es



**Citation:** Sorlozano-Puerto, A.; Albertuz-Crespo, M.; Lopez-Machado, I.; Gil-Martinez, L.; Ariza-Romero, J.J.; Maroto-Tello, A.; Baños-Arjona, A.; Gutierrez-Fernandez, J. Antibacterial and Antifungal Activity of Propyl-Propane-Thiosulfinate and Propyl-Propane-Thiosulfonate, Two Organosulfur Compounds from *Allium cepa*: In Vitro Antimicrobial Effect via the Gas Phase. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 21. <https://doi.org/10.3390/ph14010021>

Received: 12 November 2020  
Accepted: 23 December 2020  
Published: 29 December 2020

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Propyl-propane thiosulfinate (PTS) and propyl-propane thiosulfonate (PTSO) are two volatile compounds derived from *Allium cepa* with a widely documented antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate their anti-candidiasis activity and the ability of its gaseous phase to inhibit bacterial and yeast growth in vitro. The minimum inhibitory concentration of various antifungal products (including PTS and PTSO) was determined versus 203 clinical isolates of *Candida* spp. through broth microdilution assay. Additionally, the antimicrobial activity through aerial diffusion of PTS and PTSO was evaluated over the growth of a collection of bacteria and yeasts cultivated in agar plates. All yeasts were susceptible to the antifungals tested, except *C. glabrata* and *C. krusei*, that showed azole resistance. PTSO (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> ranged from 4 to 16 mg/L and 8 to 32 mg/L, respectively) was significantly more active against yeasts than PTS (MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> ranged from 16 to 64 mg/L and 32 to 64 mg/L). Values were higher than those obtained for antifungal drugs. Gaseous phases of PTS and PTSO generated growth inhibition zones whose diameters were directly related to the substances concentration and inversely related to the microbial inoculum. The quantification of PTS and PTSO levels reached in the growth media through aerial diffusion displayed a concentration gradient from the central zone to the periphery. Only *P. aeruginosa* ATCC 27853 showed resistance, while yeasts (*C. albicans* ATCC 200955 and *C. krusei* ATCC 6258) presented the higher susceptibility to both compounds. These results suggest that PTS and PTSO display antibacterial and anti-candidiasis activity in vitro through aerial diffusion, having potential use in human therapy.

**Keywords:** propyl-propane-thiosulfinate; propyl-propane-thiosulfonate; antibacterial activity; antifungal activity; vapor

## 1. Introduction

In recent years, the antioxidative, hypolipidemic, hypocholesterolemia, antihypertensive, heart-protective, antithrombotic, anticancer, anti-inflammatory, immunomodulatory, and antimicrobial activities of different organosulfur products, such as thiosulfates and thiosulfonates obtained from garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*), especially alliin (diallyl thiosulfinate), have been thoroughly studied [1–3].

While the precise mechanism of action has not yet been discovered, the main antimicrobial effect of these *Allium*-derived compounds has been reported to be due to its chemical reaction with thiol groups present in the main enzymes of the microbial metabolism, such as succinate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, thioredoxin reductase and ureases among others, via thiol-disulfide exchange reaction [4–6]. Additionally, they can react with thiols, such as glutathione, increasing the oxidized glutathione rate into a range that induces oxidative stress and cellular apoptosis [7]; they can interact with enzymes taking part of the microbial system of acetyl-CoA blocking the incorporation of acetate into fatty acids and inhibiting the development of a phospholipid bilayer of the membranes [5]; and they can inhibit RNA polymerase and, therefore, block the total synthesis of microbial RNA [8].

In onion, the most common sulfur compounds are isoalliin (*S*-propenyl-*L*-cysteine sulfoxide), methiin (*S*-methyl-*L*-cysteine sulfoxide) and propiin (*S*-propyl-*L*-cysteine sulfoxide). Propiin changes into propyl-propane thiosulfinate (PTS) due to the action of aliinase [9]. Although it is more stable than allicin, PTS is also a labile compound that, through dismutation or disproportionation reactions, changes into dipropyl disulfide and propyl-propane thiosulfonate (PTSO) [10].

In a previous study we compared the *in vitro* antibacterial activity of PTS and PTSO with other antibiotics. Both molecules showed broad spectrum antibacterial activity against multiresistant bacteria isolated from human clinical samples. These results contribute to the development and potential use of these compounds against human infections, such as oral, gastrointestinal, or skin infections, as well as for the treatment of urinary tract infections [11].

Candiduria is a common finding in immunosuppressed and hospitalized patients, which determines the clinical relevance of its detection and treatment. In recent decades, a remarkable increase of opportunistic candidiasis infections has been described, especially those affecting urinary tract produced by *C. albicans*, the most common among them. Nevertheless, an increase in the incidence of other different species of *Candida* has been described, some of them characterized by a higher resistance to the most common antifungals used in humans [12,13]. Therefore, in the same way as with bacteria, it would be interesting to compare the *in vitro* anticandidal activity of PTS and PTSO with that of other existing antifungals for potential application in medical therapy.

Both substances are volatile. Therefore, the study of their antimicrobial capacity through their gaseous phase would have great interest for the valorization of their possible use in the treatment of susceptible respiratory pathogens if PTS and PTSO reach appropriate concentrations in pulmonary epithelium administered by inhalation [3,14].

For all these reasons, the aim of this study was to evaluate anti-candidiasis activity of PTS and PTSO *in vitro* and the capacity of its gaseous phase to inhibit the growth of different bacteria and yeasts.

## 2. Results

### 2.1. Antifungal Susceptibility

The identification of the 203 clinical isolates of *Candida* spp. was as follows: *C. albicans* ( $n = 83$ ), *C. glabrata* ( $n = 73$ ), *C. krusei* ( $n = 12$ ) and *C. tropicalis* ( $n = 35$ ). A summary of the antifungal susceptibility data is presented in Table 1. All the isolates of *C. glabrata* and *C. krusei* were resistant to fluconazole. *C. glabrata* was also resistant to voriconazole. In the other cases, the isolates were susceptible to the assayed antifungals. Amphotericin B significantly showed more activity against *C. albicans* and *C. tropicalis* than against the two other species ( $p < 0.001$ ), while *C. glabrata* was the species with the lowest MIC values ( $p < 0.001$ ) to echinocandins (anidulafungin, micafungin, and caspofungin).

The behavior of PTS and PTSO was quite homogeneous, regardless of the analyzed species (Table 1). MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of PTS ranged from 16 to 64 mg/L for the first and from 32 to 64 mg/L for the second. The MFC<sub>50</sub> and MFC<sub>90</sub> ranged from 32 to 128 mg/L and 128 mg/L, respectively. On the other hand, the values of MIC<sub>50</sub> and

MIC<sub>90</sub> of PTSO ranged from 4 to 16 mg/L and 8 to 32 mg/L, while MFC<sub>50</sub> y MFC<sub>90</sub> ranged from 32 to 128 mg/L and from 64 to 128 mg/L, respectively. Considering all of the clinical isolates of *Candida* spp., the data indicated that PTSO was significantly more active than PTS ( $p < 0.001$ ) and showed the fungicidal activity of these compounds since MIC and MFC values differed in only one dilution for both PTS (MIC<sub>50</sub> = 32 mg/L and MFC<sub>50</sub> = 64 mg/L; MIC<sub>90</sub> = 64 mg/L and MFC<sub>90</sub> = 128 mg/L) and PTSO (MIC<sub>50</sub> = 16 mg/L and MFC<sub>50</sub> = 32 mg/L; MIC<sub>90</sub> = 32 mg/L and MFC<sub>90</sub> = 64 mg/L).

**Table 1.** In vitro activity of different antifungal drugs, PTS, and PTSO against *Candida* spp.

Species of Yeasts (Number of Isolates)	Range of MIC (in mg/L)	MIC <sub>50</sub> (in mg/L)	MIC <sub>90</sub> (in mg/L)	Range of MFC (in mg/L)	MFC <sub>50</sub> (in mg/L)	MFC <sub>90</sub> (in mg/L)	Number of Resistant Isolates
<i>Candida albicans</i> (n = 83)							
Amphotericin B	0.125–0.25	0.25	0.25	1–16	4	8	0
Anidulafungin	≤0.008–0.25	0.015	0.06	0.015–>4	0.25	1	0
Micafungin	≤0.008–0.25	0.03	0.125	0.03–4	0.5	2	0
Caspofungin	≤0.008–0.25	0.06	0.06	0.06–4	0.5	2	0
Fluconazole	≤0.125–2	0.25	2	8–>64	>64	>64	0
Voriconazole	≤0.008–0.06	≤0.008	≤0.008	0.03–0.5	0.5	0.5	0
PTS	16–64	32	32	16–>128	32	128	-
PTSO	8–64	16	32	8–128	32	64	-
<i>Candida glabrata</i> (n = 73)							
Amphotericin B	0.06–1	0.25	0.5	1–>16	4	8	0
Anidulafungin	≤0.008–0.125	0.015	0.03	0.06–>4	0.25	0.5	0
Micafungin	≤0.008–0.06	≤0.008	0.03	0.008–4	0.06	0.25	0
Caspofungin	≤0.008–0.125	0.03	0.03	0.06–4	1	2	0
Fluconazole	0.25–>64	4	≥64	16–>64	>64	>64	73
Voriconazole	0.03–>4	0.5	≥4	2–>4	>4	>4	73
PTS	8–64	32	32	16–>128	64	128	-
PTSO	16–32	16	32	8–>128	32	64	-
<i>Candida krusei</i> (n = 12)							
Amphotericin B	0.25–1	0.5	1	4–16	8	16	0
Anidulafungin	≤0.008–0.06	0.015	0.03	0.125–0.5	0.25	0.5	0
Micafungin	0.06–0.25	0.125	0.125	0.5–4	0.5	1	0
Caspofungin	0.06–0.25	0.125	0.25	1–4	1	2	0
Fluconazole	8–>64	16	≥64	>64	>64	>64	12
Voriconazole	0.03–0.5	0.125	0.5	2–>4	>4	>4	0
PTS	4–32	16	32	32–>128	32	128	-
PTSO	4–16	4	8	64–>128	128	128	-
<i>Candida tropicalis</i> (n = 35)							
Amphotericin B	≤0.03–1	0.125	0.25	2–16	2	8	0
Anidulafungin	≤0.008–0.25	0.06	0.25	0.015–2	1	2	0
Micafungin	≤0.008–0.25	0.06	0.25	0.008–2	0.5	2	0
Caspofungin	≤0.008–0.25	0.06	0.25	0.06–4	1	4	0
Fluconazole	≤0.125–2	≤0.125	1	8–>64	>64	>64	0
Voriconazole	≤0.008–0.06	≤0.008	0.015	0.03–0.5	0.5	0.5	0
PTS	32–64	64	64	64–>128	128	128	-
PTSO	4–32	16	32	4–128	32	64	-

MIC: minimum inhibitory concentration. MFC: minimum fungicidal concentration.

## 2.2. Antimicrobial Activity of Vapor

PTS and PTSO inhibited growth in six of the seven microorganisms tested in the present study through its gaseous phase without coming into contact with the medium and thus, with the microorganism, except for its aerial diffusion. The vapor produced by both substances reaches the agar medium, inhibiting microbial growth in a circular area above the drop placed in the lid of the Petri dish (Figure 1). The absence of any microbial growth in the inhibition area suggests a predominant biocidal effect of these substances. Only *P. aeruginosa* ATCC 27853 showed resistance to both compounds, showing absence of inhibition halo in the majority of the concentrations and bacterial inocula used. In the case of this bacterium, halos with a diameter below 10 mm were observed only when PTSO was used at a concentration of 50 mg/mL and 25 mg/mL against a bacterial inoculum at 0.5 of McFarland scale.

As it is shown in Figure 2 and Table 2, diameters from the inhibition of growth zones were directly related to the concentration of PTS or PTSO used, and inversely related to the microbial inoculum used: the higher the concentration of PTS or PTSO were and the lower

the inoculum of microorganisms were, the larger the diameter of the halo was ( $p < 0.001$ ). Greater halos and, consequently an increased susceptibility to these compounds were observed in the case of yeasts (*C. albicans* ATCC 200955 and *C. krusei* ATCC 6258).

Considering the set of microorganisms used in this study (with the exception of *P. aeruginosa* ATCC 27853 due to the demonstrated resistance to both compounds), the antimicrobial activity of PTSO was significantly higher than that of PTS, since, for the same microbial inoculum and substance concentration, the diameters of the growth inhibition halos produced by the gas phase of PTSO were significantly larger than those obtained from PTS ( $p < 0.01$ , in all cases).

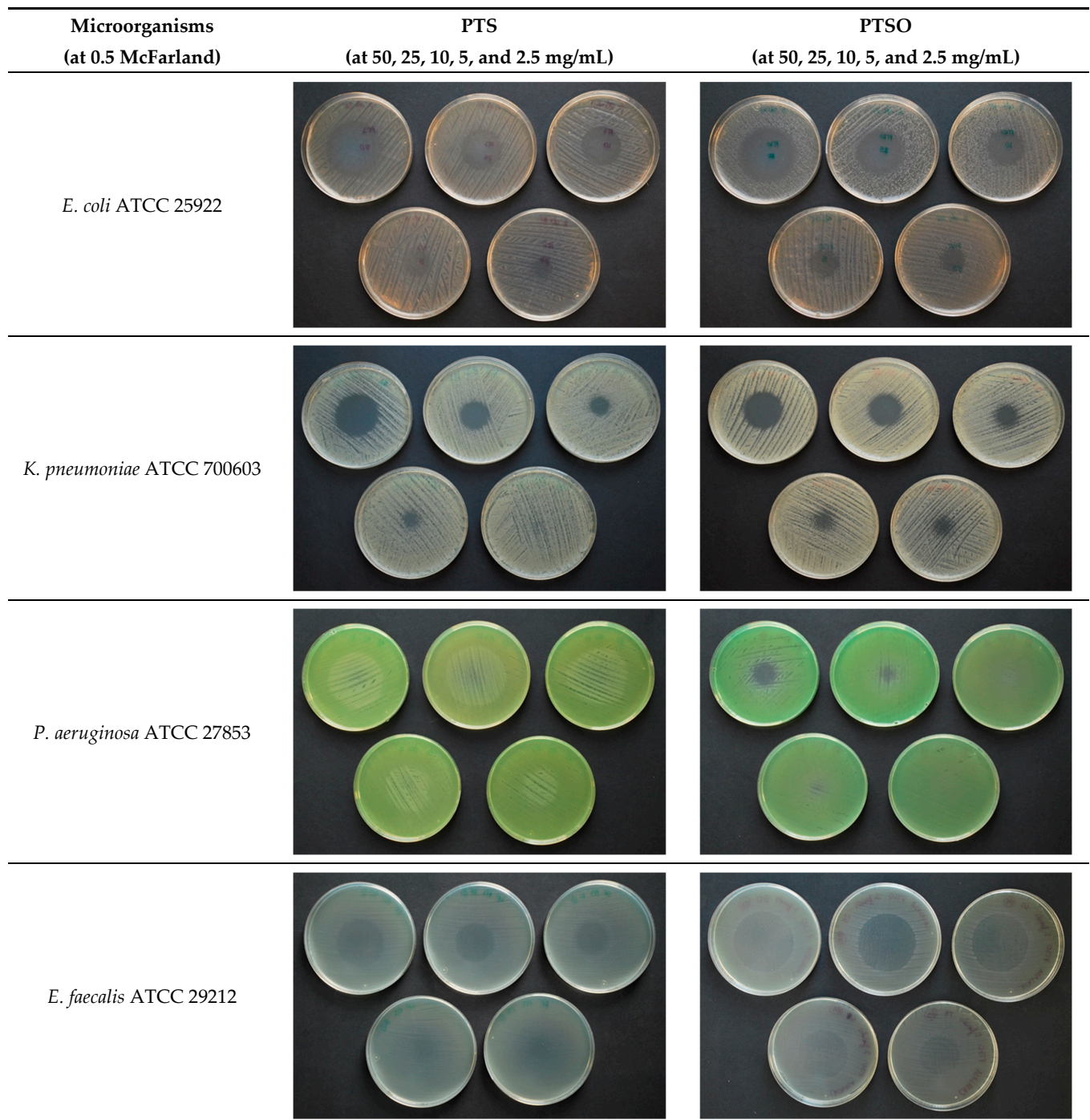
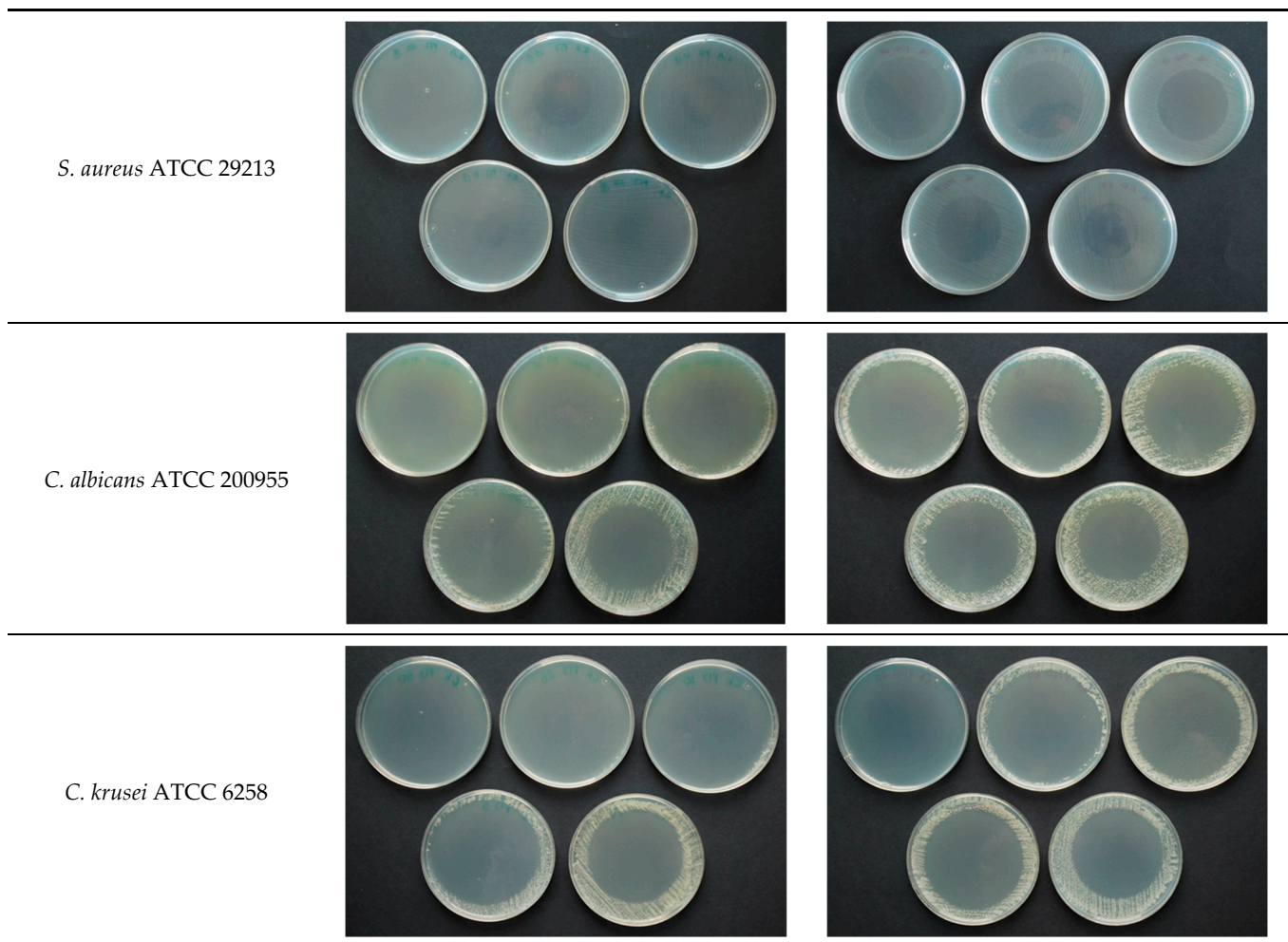


Figure 1. Cont.





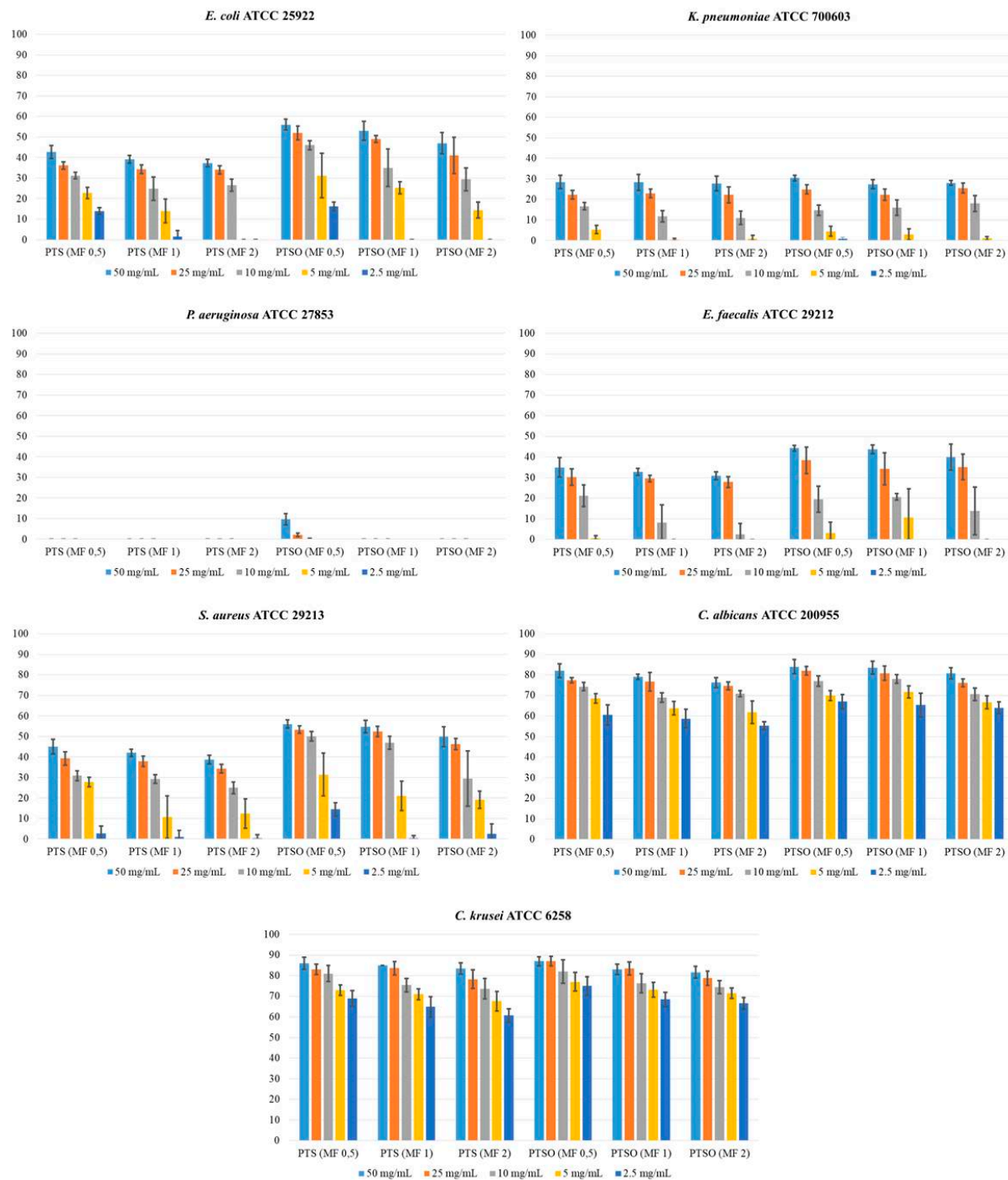
**Figure 1.** Antimicrobial activity of PTS and PTSO via the gas phase. Photograph showing halos of inhibition at doses of 50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, and 2.5 mg/mL (from left to right and from top to bottom). Although assays were carried out at 0.5, 1, and 2 McFarland turbidity, only the results at 0.5 McFarland are shown.

Table 3 shows the concentration of PTS and PTSO detected in the Mueller-Hinton medium by HPLC-UV. The gas phase of both compounds, deposited on the lid of the Petri dish, reached the culture medium being able to be detected and quantified. The highest concentration in all cases was reached in sample 1, which coincided with the center of the plate, located in the most vertical position just above the drop deposited on the lid. As the sample moved away from the center (samples from 2 to 6), the concentration decreased, creating a gradient from the central area of the plate (highest concentration) towards its periphery (lowest concentration). In some cases, either because the concentration of the drop was small (2.5 mg/mL) and/or because the distance to the center was higher (sample 6), the concentration reached in the medium could not be quantified because it was below the limit of detection of the HPLC-UV technique.

From the results shown in Table 3, the linear regression lines were drawn (Figure 3), relating the distance to the center of the plate (measured in mm) to the concentration that PTS or PTSO reached at a given point (in mg/L) according to each of the concentrations of the drop deposited on the lid. As it can be seen, there was a high correlation in all cases, which determined the quality of the fit.

Theoretical concentration of PTS and PTSO reached at the limit of the microbial growth inhibition zone for each microorganism and inoculum concentration is shown in Table 4. This concentration was determined by measuring the radius (in mm) of the inhibition areas obtained for each microorganism and inoculum concentration and extrapolating the results in

the linear regression line for the corresponding concentrations of PTS and PTSO showed in Figure 3. The concentrations of PTSO at which microbial growth was inhibited were lower than those of PTS ( $p < 0.01$ ), showing a greater antimicrobial activity. Furthermore, the inhibition of yeast growth compared to that of the bacteria occurred with lower concentrations, with either of the two compounds.



**Figure 2.** Average value  $\pm$  standard deviation (in mm) of the growth inhibition halos for each concentration of PTS and PTSO, in the different inocula (0.5, 1, and 2 of McFarland) and for the different microorganisms. Diameters from the inhibition of growth zones were directly related to the concentration of PTS or PTSO used, and inversely related to the microbial inoculum used. Greater halos were observed in the case of yeasts. The diameters of the growth inhibition halos produced via the gas phase of PTSO were significantly larger than those obtained from PTS.

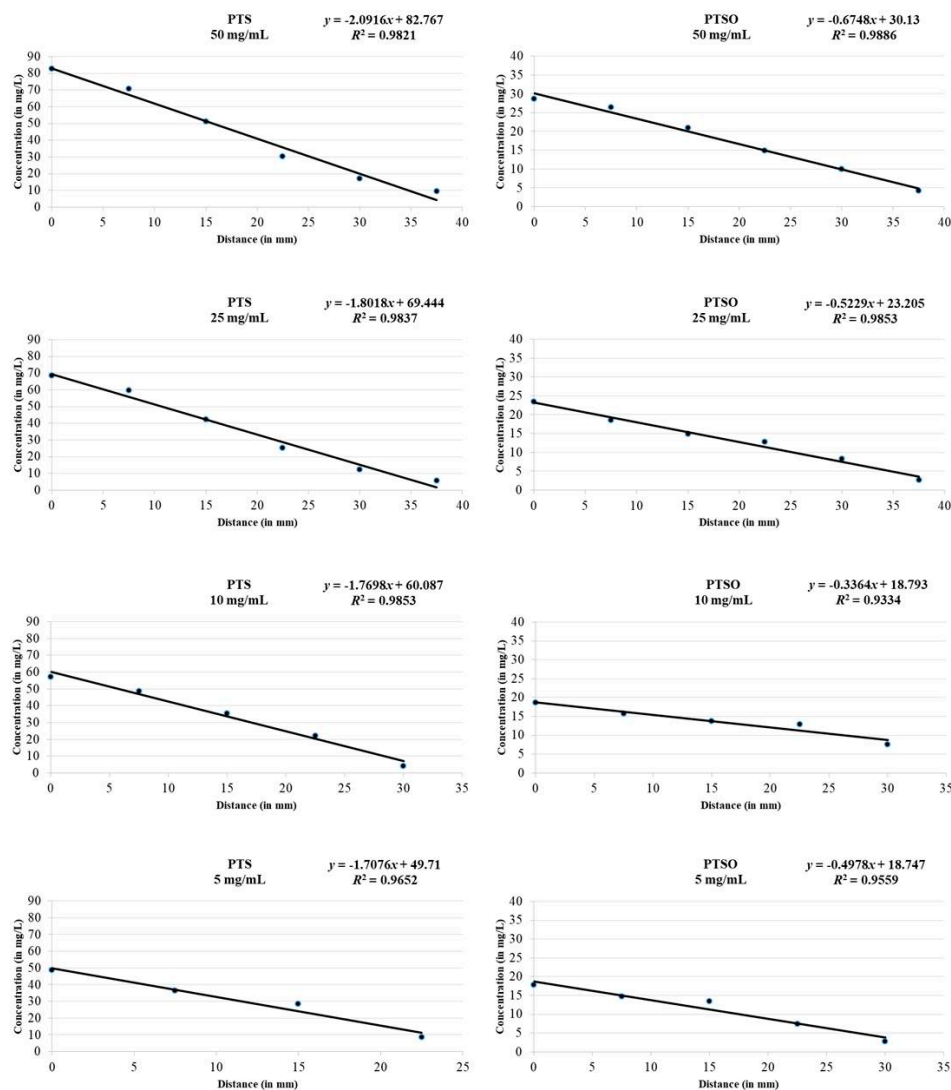
**Table 2.** Average diameter  $\pm$  standard deviation (in mm) of the growth inhibition halos for the different PTS and PTSO concentrations, and for the different microorganisms.

Microorganisms	McFarland	PTS Concentration (Growth Inhibition in mm)						
		50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL	2.5 mg/mL	50 mg/mL	25
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5	43 $\pm$ 3.2	36 $\pm$ 1.9	31 $\pm$ 1.6	23 $\pm$ 2.7	14 $\pm$ 1.6	56 $\pm$ 2.7	5
	1	39 $\pm$ 2.0	34 $\pm$ 2.1	25 $\pm$ 5.6	14 $\pm$ 5.7	1 $\pm$ 3.0	53 $\pm$ 4.5	4
	2	37 $\pm$ 1.8	34 $\pm$ 2.0	27 $\pm$ 3.0	0	0	47 $\pm$ 5.1	4
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0.5	28 $\pm$ 3.3	22 $\pm$ 2.2	17 $\pm$ 1.8	5 $\pm$ 2.0	0	30 $\pm$ 1.3	2
	1	28 $\pm$ 3.9	23 $\pm$ 2.2	12 $\pm$ 2.8	0	0	27 $\pm$ 2.3	2
	2	28 $\pm$ 3.6	22 $\pm$ 3.8	11 $\pm$ 3.3	1 $\pm$ 1.8	0	28 $\pm$ 1.2	2
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.5	0	0	0	0	0	10 $\pm$ 2.7	2
	1	0	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	0	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.5	35 $\pm$ 4.6	30 $\pm$ 4.0	21 $\pm$ 5.2	1 $\pm$ 1.2	0	44 $\pm$ 1.3	3
	1	33 $\pm$ 1.8	30 $\pm$ 1.6	8 $\pm$ 8.7	0	0	44 $\pm$ 2.1	3
	2	31 $\pm$ 1.9	28 $\pm$ 2.7	3 $\pm$ 5.3	0	0	40 $\pm$ 6.3	3
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.5	45 $\pm$ 3.6	39 $\pm$ 3.3	31 $\pm$ 2.4	28 $\pm$ 2.4	3 $\pm$ 3.5	56 $\pm$ 2.0	5
	1	42 $\pm$ 1.8	38 $\pm$ 2.5	29 $\pm$ 2.0	11 $\pm$ 10.3	1 $\pm$ 3.2	55 $\pm$ 3.1	5
	2	39 $\pm$ 2.1	34 $\pm$ 2.1	25 $\pm$ 2.8	12 $\pm$ 7.1	1 $\pm$ 1.6	50 $\pm$ 4.9	4
<i>C. albicans</i> ATCC 200955	0.5	82 $\pm$ 3.4	77 $\pm$ 1.2	74 $\pm$ 1.9	69 $\pm$ 2.3	61 $\pm$ 4.9	84 $\pm$ 3.4	8
	1	79 $\pm$ 1.3	77 $\pm$ 4.5	69 $\pm$ 2.3	64 $\pm$ 3.3	59 $\pm$ 4.5	84 $\pm$ 3.2	8
	2	76 $\pm$ 2.5	75 $\pm$ 1.9	71 $\pm$ 1.5	62 $\pm$ 5.5	55 $\pm$ 1.9	81 $\pm$ 2.8	7
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.5	86 $\pm$ 3.0	83 $\pm$ 2.5	81 $\pm$ 3.9	73 $\pm$ 2.5	69 $\pm$ 3.9	87 $\pm$ 2.1	8
	1	85 $\pm$ 0.0	84 $\pm$ 3.3	75 $\pm$ 3.2	71 $\pm$ 2.6	65 $\pm$ 5.0	83 $\pm$ 2.5	8
	2	84 $\pm$ 2.7	78 $\pm$ 4.5	74 $\pm$ 4.9	68 $\pm$ 4.7	61 $\pm$ 3.2	82 $\pm$ 2.8	7

**Table 3.** Concentration  $\pm$  standard deviation (in mg/L) of PTS and PTSO reached in Mueller–Hinton agar for each of the samples, in relation to the initial concentration of each substance in the drop deposited on the lid of the Petri dish.

Organosulfur Compound	Initial Concentration	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	Sample 6
PTS	50 mg/mL	82.7 $\pm$ 0.1	70.8 $\pm$ 0.3	51.2 $\pm$ 0.1	30.2 $\pm$ 0.2	17.0 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.1
	25 mg/mL	68.6 $\pm$ 0.2	59.6 $\pm$ 0.1	42.4 $\pm$ 0.3	25.1 $\pm$ 0.2	12.4 $\pm$ 0.1	5.8 $\pm$ 0.2
	10 mg/mL	57.3 $\pm$ 0.2	48.6 $\pm$ 0.1	35.5 $\pm$ 0.1	22.1 $\pm$ 0.2	4.2 $\pm$ 0.1	<LD
	5 mg/mL	48.5 $\pm$ 0.2	36.4 $\pm$ 0.2	28.6 $\pm$ 0.3	8.5 $\pm$ 0.2	<LD	<LD
	2.5 mg/mL	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
PTSO	50 mg/mL	28.6 $\pm$ 0.2	26.3 $\pm$ 0.2	20.9 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 0.1	9.9 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.2
	25 mg/mL	23.4 $\pm$ 0.2	18.6 $\pm$ 0.2	14.8 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.2	8.2 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.1
	10 mg/mL	18.7 $\pm$ 0.1	15.8 $\pm$ 0.1	13.8 $\pm$ 0.1	12.9 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.1	<LD
	5 mg/mL	17.9 $\pm$ 0.1	14.8 $\pm$ 0.3	13.4 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.3	<LD
	2.5 mg/mL	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

LD: Limit of detection of the HPLC-UV technique.

**Figure 3.** Relationship between the distance from the center of the Petri dish and the concentration reached via the gas phase at a defined point of the Mueller–Hinton medium for each concentration of PTS and PTSO deposited on the lid of the Petri dish. There is an inverse linear relationship between the distance to the center of the culture medium and the concentration reached via the gas phase at a given point.

**Table 4.** Average value  $\pm$  standard deviation (in mg/L) of the concentration of PTS and PTSO reached at the limit of the r

Microorganism	McFarland	Limit of the Microbial Growth	PTS Concentration			
			50 mg/mL	25 mg/mL	10 mg/mL	5 mg/mL
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0.5	Radius	21.5	18	15.5	11.5
		Concentration	38.1 $\pm$ 3.3	36.9 $\pm$ 1.7	32.5 $\pm$ 1.4	30.3 $\pm$ 2.3
	1	Radius	19.5	17	12.5	7
		Concentration	41.9 $\pm$ 2.1	38.5 $\pm$ 1.9	38.1 $\pm$ 5.0	37.8 $\pm$ 4.9
	2	Radius	18.5	17	13.5	0
		Concentration	43.8 $\pm$ 1.8	38.8 $\pm$ 1.8	36.5 $\pm$ 2.6	$\geq$ 48.5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0.5	Radius	14	11	8.5	2.5
		Concentration	53.1 $\pm$ 3.4	49.4 $\pm$ 1.9	45.3 $\pm$ 1.6	45.2 $\pm$ 1.7
	1	Radius	14	11.5	6	0
		Concentration	53.2 $\pm$ 4.0	48.8 $\pm$ 2.0	49.6 $\pm$ 2.5	$\geq$ 48.5
	2	Radius	14	11	5.5	0.5
		Concentration	53.7 $\pm$ 3.7	49.4 $\pm$ 3.4	50.4 $\pm$ 2.9	$\geq$ 48.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.5	Radius	17.5	15	10.5	0.5
		Concentration	46.2 $\pm$ 4.9	42.2 $\pm$ 3.6	41.3 $\pm$ 4.6	$\geq$ 48.5
	1	Radius	16.5	15	4	0
		Concentration	48.5 $\pm$ 1.8	42.8 $\pm$ 1.4	52.9 $\pm$ 7.7	$\geq$ 48.5
	2	Radius	15.5	14	1.5	0
		Concentration	50.5 $\pm$ 2.0	44.3 $\pm$ 2.4	57.9 $\pm$ 4.7	$\geq$ 48.5
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.5	Radius	22.5	19.5	15.5	14
		Concentration	36.1 $\pm$ 3.7	34.0 $\pm$ 2.9	32.8 $\pm$ 2.1	26.1 $\pm$ 2.0
	1	Radius	21	19	14.5	5.5
		Concentration	39.4 $\pm$ 1.9	35.4 $\pm$ 2.2	34.2 $\pm$ 1.8	40.6 $\pm$ 8.8
	2	Radius	19.5	17	12.5	6
		Concentration	42.3 $\pm$ 2.2	38.6 $\pm$ 1.9	38.0 $\pm$ 2.5	39.1 $\pm$ 6.1
<i>C. albicans</i> ATCC 200955	0.5	Radius	41	38.5	37	34.5
		Concentration	$\leq$ 9.4	$\leq$ 5.8	$\leq$ 4.2	$\leq$ 8.5
	1	Radius	39.5	38.5	34.5	32
		Concentration	$\leq$ 9.4	$\leq$ 5.8	$\leq$ 4.2	$\leq$ 8.5
	2	Radius	38	37.5	35.5	31
		Concentration	$\leq$ 9.4	$\leq$ 5.8	$\leq$ 4.2	$\leq$ 8.5
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	0.5	Radius	43	41.5	40.5	36.5
		Concentration	$\leq$ 9.4	$\leq$ 5.8	$\leq$ 4.2	$\leq$ 8.5
	1	Radius	42.5	42	37.5	35.5
		Concentration	$\leq$ 9.4	$\leq$ 5.8	$\leq$ 4.2	$\leq$ 8.5
	2	Radius	42	36	37	34
		Concentration	$\leq$ 9.4	$\leq$ 5.8	$\leq$ 4.2	$\leq$ 8.5

Radius: average value (in mm) of the radius of the growth inhibition halos for the 10 assays carried out with each microorganism, inoculum, concentration

### 3. Discussion

#### 3.1. Antifungal Susceptibility

Invasive fungal diseases of nosocomial origin or associated to health care, especially those caused by *Candida* spp., have become a major health problem as they are associated with high rates of morbidity and mortality. Although candida urinary tract infections and vulvovaginal infections are, a priori, milder processes, they have a higher incidence among the population and can be the origin of more serious and disseminated infections in patients with underlying diseases [15]. Similarly, yeast colonization of the skin and mucosal surfaces is also a risk factor for the development of invasive candidiasis in patients, especially those admitted in the intensive care unit as a consequence of risk factors such as handling by colonized healthcare personnel, central venous and urinary catheters, use of broad-spectrum antibiotics, prolonged lengths of stay, mechanical ventilation, parenteral feeding, etc. [16].

On the other hand, alongside the increase of the prevalence of yeast infections by genus *Candida*, a significant increase in the rates of resistance to antifungals commonly used in human clinics (mainly polyenes, azoles, and echinocandins) is currently described both for *C. albicans* as in other non-*albicans* species. Therefore, it is difficult to establish a preventive and therapeutic approach to these infections, which makes advisable to research new alternative therapies to conventional treatments with different and/or synergistic mechanisms of fungicide action and fewer side effects [17–20].

In this context, the thiosulfates derived from *Allium* spp., such as allicin, have demonstrated broad antifungal activity in numerous in vitro studies against yeasts of the genus *Candida* [21–23]. In the present work, the MICs obtained for antifungals were similar to those obtained in previous research, both in our geographical area [24,25] and in more remote areas [19,26–29]. The lowest MICs were obtained for *C. albicans* and *C. tropicalis*; the highest for *C. glabrata* and *C. krusei*, especially in the case of azoles, which indicates that *Candida* species remain susceptible to commonly used antifungals and do not represent a problem for the therapeutic approach. The usual resistance of *C. glabrata* and *C. krusei* to azoles would be an exception.

Similarly, our results demonstrate that PTS and PTSO have a significant antifungal activity against different isolates of *Candida* spp. from human clinical samples, although their activity is not as strong as that of some antifungals, such as amphotericin B, echinocandins or azoles, especially if we consider the most susceptible species to them. In addition, our findings related to the antifungal effects of other organosulfur compounds against yeast isolates are in compliance with those already described in the literature [21,30,31].

In order to explain the antifungal effect of these molecules, different mechanisms of action have been proposed. The most directly associated to cell damage and decreased growth capacity of the fungus are the ability to modify essential enzymes in fungal metabolism [32], induce oxidative stress [7], alter lipids by damaging the integrity of cell membranes (including cytoplasmatic organelles, such as mitochondria or vacuoles) [33] and modify the expression of some genes [34].

Even if our preliminary results provide useful information about the potential use of PTS and PTSO for the prevention or treatment of candidiasis infections caused by multidrug resistant yeasts, further research is needed to demonstrate the effectiveness of these compounds with a wider group of fungi and in vivo models [35]. Even though these results may support their therapeutic use, the absence of cut-off points defined by international committees for this kind of substances does not allow relevant conclusions to be drawn. Further investigation regarding their pharmacokinetic and toxicological characteristics is required before considering safe clinical use.

#### 3.2. Antimicrobial Activity of Vapor

One of the main characteristics of the organosulfur compounds obtained from plants of the genus *Allium* is their volatility, which is the main reason of the characteristic aroma that these plants exude, especially when they are mashed or crushed. Given the scarcity

of volatile antimicrobials available for clinical use in humans, these molecules could be considered an alternative (alone or in combination with other antimicrobials) for the treatment of lung infections via inhalation, instead of oral or parenteral administration [3]. However, there are still few studies evaluating their antimicrobial capacity through their gas phase and their potential applicability for the treatment of infectious diseases [3,14,36].

In the present work, PTS and PTSO showed high bactericidal and fungicidal activity through their gas phase, inhibiting the growth of six of the seven microorganisms assayed (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213, *C. albicans* ATCC 200955 and *C. krusei* ATCC 6258, but not *P. aeruginosa* ATCC 27853), which might suggest that these substances are likely to be less active against *P. aeruginosa* than against other pathogens. Various studies have demonstrated that, against these bacteria and other related ones, very high concentrations of these compounds should be used to inhibit bacterial growth, which may not be feasible from a therapeutic point of view [11,37,38].

However, the microbicidal activity of these compounds was not the same against both types of microorganisms. The antifungal effect was higher than the antibacterial effect (the growth inhibition halos were significantly higher in *C. albicans* ATCC 200955 and *C. krusei* ATCC 6258 in comparison to those obtained against bacteria). The higher activity of these compounds on yeasts is also observed if we compare the results obtained in the present work on antifungal susceptibility, in terms of MIC, with a previous work of our group with clinical bacterial isolates from human origin: MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of PTS and PTSO are lower against yeasts than against bacteria [11]. According to some studies, it is possible that the presence of a fungal cell wall, more permeable to these compounds than the peptidoglycan wall of the bacteria, allows this cytotoxic effect at lower doses [39]. On the other hand, the gas phase of PTSO was more active than that of PTS against all the microorganisms evaluated (with the exception of *P. aeruginosa*), since the growth inhibition halos were significantly higher for PTSO than for PTS in all cases. In fact, the higher antimicrobial activity of PTSO in comparison to PTS has already been described previously by our group [11].

As shown by Leontiev et al. [14], despite of the lack of direct contact of the organosulfur compounds with the agar and with the microorganism itself, when the antimicrobial effect via the gas phase is studied, it is worth noting how clear are the microbial growth inhibition halos and how well defined are the edges. His interpretation, as well as ours, is that this could be due to the existence of a concentration gradient from the closest area of the agar to the drop, precisely at its zenith, to the periphery. In our study, the quantification of the concentration of PTS and PTSO in the agar allowed to confirm this suspicion, showing that there is an inverse linear relationship between the distance to the center of the culture medium and the concentration reached via the gas phase at a given point.

From the results obtained in the present study, as well as from previous works [3,14,40] it can be deduced that organosulfur compounds derived from *Allium* spp., such as PTS and especially PTSO could be used for the treatment of lung infections, due to its high volatility by inhalation, producing an effect directly on the lung. An advantage that would facilitate their clinical use is that these substances are perceived as innocuous as they are present naturally in food such as onion, widely consumed and included in the diet in most cultures. Among the disadvantages, we could highlight the need to improve the extraction procedures in order to preserve the biological properties of these substances avoiding their loss as a consequence of events such as heating, long-term preservation, etc. In addition, there is a need to diminish the strong impact of their smell and aroma.

However, since the microbicidal effect is directly proportional to the concentration of PTS and PTSO used, a definitive conclusion on the efficacy of this treatment cannot be drawn without evaluating the potential toxicity on human lung cells. It may be possible that the dose required to exert the expected effect in vivo is so high that it produces undesirable toxic consequences. As indicated by Reiter et al. [3], the use of lower and less toxic concentrations concomitantly with other antibiotics or antifungals could be

considered if a synergistic effect is demonstrated. In this sense, it has been proven that thiosulfates have a synergistic effect with antibiotics, such as ampicillin, piperacillin-tazobactam, levofloxacin, gentamicin, amikacin, azithromycin, vancomycin, doxycycline, or polymyxin B [41–45] and with antifungals such as azoles [22,46] or amphotericin B [21]. The potential clinical usefulness of these substances at low concentrations, via inhalation and in combination with other antimicrobials, requires further studies in vitro and with animal and/or human models.

Among the main limitations of our study, was that the methodologies used, both for the study of the antifungal effect of PTS and PTSO, as well as for the antimicrobial effect that their gas phase could exert, are not standardized. Therefore, it is not possible to establish a direct correlation between the results obtained and the potential human therapeutic use. Although their antimicrobial activity seems obvious as numerous studies have shown, international committees for the study of antimicrobial susceptibility have not yet defined cut-off points for these compounds. Thus, no final conclusion can be drawn. Furthermore, the present work has not evaluated the volatility of the organosulfur derivatives and, therefore, the possible loss of activity of PTS and PTSO over time or with increasing temperature, which other authors have described previously [36]. These factors could reduce their clinical usefulness. Finally, further studies should be focused on standardizing the methods to evaluate the antimicrobial activity, understanding how these substances are distributed or removed from the organism, determining the administration routes, and evaluating their effect in different dosages, organs and systems and evaluating the safety of their administration in humans, before safe clinical use is considered.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Antifungal Susceptibility Testing

###### 4.1.1. Antifungals, PTS, and PTSO

Amphotericin B, anidulafungin, micafungin, caspofungin, fluconazole and voriconazole were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). PTS and PTSO are organosulfur compounds present in onion extracts (AlioCare™) which were supplied with high purity (97%) by Enzim-Orbita Agroalimentares LDA (Tavira, Portugal) and dissolved in polysorbate-80 to a final concentration of 500,000 mg/L.

###### 4.1.2. Candida Isolates and Identification

Two hundred and three clinical isolates of *Candida* spp. obtained from urine samples processed in the Laboratory of Microbiology of the Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain) were selected. CHROMagar Orientation medium (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) was used for the growth of isolates. All colonies with yeast compatible morphology were subcultured using a CHROMagar Candida medium (Becton Dickinson). Species were identified using filamentation test and ASM Vitek system (bioMérieux, Madrid, Spain) or MALDI Biotyper system (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). All isolates were stored at  $-40^{\circ}\text{C}$  until the susceptibility study.

###### 4.1.3. In Vitro Antifungal Assay

Standard broth microdilution method was carried out according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [47]. A series of two-fold final dilutions of each drug, PTS, and PTSO were prepared in RPMI-1640 medium with L-glutamine but without bicarbonate. Glucose was added to a final concentration of 0.2% and pH was adjusted to 7.0 with acid morpholine propane sulfonic (0.165 M) buffer.

First, all isolates were subcultured onto Sabouraud dextrose agar. Twenty-four hours after the incubation, standard 0.5 McFarland fungal suspensions were prepared with saline solution. Microdilution testing was carried out in 96-well, flat-bottom microtiter plates with a final concentration of the yeast cell suspension equal to  $1-5 \times 10^3$  cells/mL in each well. Each plate contained 10 serial two-fold dilutions of each antifungal compound, PTS or PTSO. The range of concentrations (in mg/L) assayed for each compound were as follows:



amphotericin B (0.03–16), anidulafungin (0.008–4), micafungin (0.008–4), caspofungin (0.008–4), fluconazole (0.125–64) and voriconazole (0.008–4). The concentration ranges of both PTS and PTSO were 0.25–128 mg/L. The positive controls (yeast suspension without antifungal) and negative control (RPMI medium) were added in the last two wells of the plate.

Microtiter plates were incubated at 35 °C and the minimum inhibitory concentration (MIC) values were assessed visually after 24 h (48 h in case of azoles). For amphotericin B, the MIC was determined as the lowest concentration of drug which produced a total inhibition of visual growth. For azoles and echinocandins, the MICs were defined as the lowest concentration of drug that produced  $\geq 50\%$  reduction of visual growth in comparison with the growth of control wells.

The clinical isolates were considered to be susceptible (S), intermediate (I) or susceptible dose-dependent (SDD, only for fluconazole), or resistant (R) to anidulafungin, micafungin, caspofungin, fluconazole and voriconazole according to the recommendations of the CLSI [48]. For amphotericin B, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines were followed [49]. CLSI clinical breakpoints for the susceptibility patterns of *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. krusei* to anidulafungin, micafungin, and caspofungin were  $S \leq 0.25$  mg/L,  $I = 0.5$  mg/L, and  $R \geq 1$  mg/L. Breakpoints for the susceptibility patterns of *C. glabrata* to anidulafungin and caspofungin were  $S \leq 0.12$  mg/L,  $I = 0.25$  mg/L, and  $R \geq 0.5$  mg/L; and to micafungin were  $S \leq 0.06$  mg/L,  $I = 0.12$  mg/L, and  $R \geq 0.25$  mg/L. CLSI clinical breakpoints for the susceptibility patterns of *C. albicans* and *C. tropicalis* to fluconazole were  $S \leq 2$  mg/L,  $SDD = 4$  mg/L, and  $R \geq 8$  mg/L; and for *C. glabrata*  $SDD \leq 32$  mg/L, and  $R \geq 64$  mg/L. For voriconazole, S, I, and R breakpoints for *C. albicans* and *C. tropicalis* were  $\leq 0.12$  mg/L, 0.25–0.5 mg/L, and  $\geq 1$  mg/L, respectively, and for *C. krusei*  $\leq 0.5$  mg/L, 1 mg/L, and  $\geq 2$  mg/L, respectively. With regard to amphotericin B, the following cutoff values were used for all yeasts:  $S < 1$  mg/L and  $R \geq 1$  mg/L. There are no cut-off points defined in CLSI or EUCAST for *C. krusei* to fluconazole neither *C. glabrata* to voriconazole. All isolates of *C. krusei* and *C. glabrata* were then considered resistant to fluconazole or voriconazole, respectively, regardless of the MICs. The values of MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were determined as the lowest concentration of the antifungal at which 50% and 90% of the isolates were inhibited, respectively.

To determine the minimal fungicidal concentration (MFC), after mixing the contents of each well, 100  $\mu$ L were inoculated onto a plate with Sabouraud dextrose agar and incubated at 35 °C for 48 h. The lowest concentrations that showed no growth after incubation gave the MFC value. MFC<sub>50</sub> and MFC<sub>90</sub> values were defined as the concentration of antifungal that kills 50% and 90% of the isolates, respectively.

Following the CLSI and EUCAST guidelines, *C. krusei* ATCC 6258 was used as quality control in the procedures.

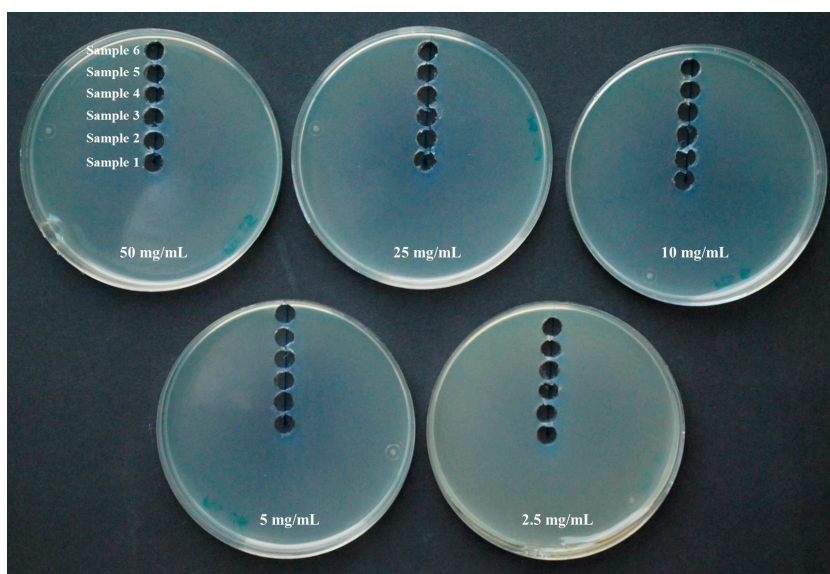
#### 4.2. Antimicrobial Activity of Gaseous PTS and PTSO

Seven microorganisms from the ATCC collection (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) were used. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as representative Gram-negative bacteria. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as representative Gram-positive bacteria. Finally, *Candida albicans* ATCC 200955 and *Candida krusei* ATCC 6258 were used as representative yeast.

Bacteria and yeasts were grown over night at  $36 \pm 1$  °C on sheep blood agar and Sabouraud dextrose agar plates, respectively. Colonies were suspended in 5 mL saline solution at 0.5, 1, and 2 McFarland turbidity. Bacteria were spread on Mueller-Hinton agar and yeast on Mueller-Hinton agar supplemented with 2% glucose. Drops of 20  $\mu$ L of different concentrated PTS and PTSO solutions (50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, and 2.5 mg/mL) were placed in the center of a 9-cm diameter Petri dish lid and the solidified agar plates with bacteria or yeasts were placed inverted over the lid according to a previously described procedure [3,14]. Thus, the test solution and the agar

itself did not come into contact except by diffusion through the air. After incubation for 24 h at  $36 \pm 1$  °C the diameter of the inhibition zone was measured. Each trial was repeated 10 times.

In the same way as in the previous procedure but without the use of any microorganism, drops of 20  $\mu$ L of different concentrations of PTS and PTSO solutions (50 mg/mL, 25 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL and 2.5 mg/mL) were placed in the center of the Petri dishes lid and the solidified Mueller–Hinton agar plates were placed inverted over the lid. After incubation for 24 h at  $36 \pm 1$  °C samples of the growth media with a diameter of 7.5 mm were extracted from the center of the plate to the periphery in order to determine the concentration of PTS and PTSO reached on the agar as a consequence of its evaporation (Figure 4). Each trial was repeated three times. The PTS and PTSO concentration achieved in each of the Mueller-Hinton agar samples was determined by high-performance liquid chromatography using a UV detector (HPLC-UV).



**Figure 4.** Procedure for obtaining samples from the Mueller–Hinton agar growth medium to establish the concentration of PTS and PTSO reached on it via the gas phase of both compounds by HPLC-UV. For each organosulfur compound and concentration, after incubation for 24 h at  $36 \pm 1$  °C, samples with a diameter of 7.5 mm were extracted from the center of the plate to the periphery in order to determine the concentration of PTS and PTSO reached on the agar as a consequence of its evaporation.

#### 4.3. HPLC-UV Analysis

For the analysis of PTS and PTSO in agar samples, an Agilent 1260 Infinity HPLC (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Germany) system was used. The system is equipped with an online degasser, an autosampler, a column thermostat, a diode array detector, and a quaternary pump. The technology used to determine PTS and PTSO was previously described by our group [50,51]. The analysis was carried out in a C18 column (Zorbax Eclipse Plus 50 mm  $\times$  4.6 mm, 1.8  $\mu$ m). Solvents used were 30 mM perchloric acid and MeCN (solvent A and B, respectively) dissolved in water at a flow rate of 0.85 mL min<sup>-1</sup>. The injection volume was 10  $\mu$ L and the gradient elution program was: 0 min, 50% B; 2.2 min, 50% B; 4.5 min, 100% B; 6.8 min, 100% B; 8 min, 50% B; 10.5 min, 50% B. The wavelength of detection was set at 200 nm. Agar samples were individually weighed and extracted in 500  $\mu$ L of methanol through 5 min in vortex. The extract was filtered and directly injected into the HPLC-UV.

#### 4.4. Statistical Analysis

In order to compare the distribution of MIC values of antifungals, PTS and PTSO in the different groups of yeasts studied, the Wilcoxon rank-sum test was used. The differences in the diameters of the growth inhibition halos and in the concentrations reached in the limits of the zone of microbial growth inhibition of the microorganisms after exposure to the gaseous phase of PTS and PTSO were compared using the Wilcoxon signed-rank test. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant. Data analysis was performed using the software IBM SPSS Statistics, version 25.0. (IBM Corporation, Armonk, NY, USA).

#### 5. Conclusions

PTS, and especially PTSO, showed antibacterial and anti-candida activity, even during their gaseous phase, which makes them potentially useful molecules for human therapy. However, it would be necessary to establish its efficacy in human trials, and to know the concentrations that they achieve in the lung tissue when they are administered by inhalation.

**Author Contributions:** Conceptualization: A.S.-P., J.G.-F., and A.B.-A.; methodology: A.S.-P., M.A.-C., I.L.-M., and L.G.-M.; validation: J.J.A.-R. and A.B.-A.; formal analysis: M.A.-C., I.L.-M., and L.G.-M.; investigation: A.S.-P. and M.A.-C.; resources: A.M.-T. and J.G.-F.; writing—original draft preparation: A.S.-P. and M.A.-C.; writing—review and editing: A.B.-A. and J.G.-F.; visualization: A.S.-P.; supervision: A.S.-P. and J.G.-F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in the main text.

**Acknowledgments:** We would like to acknowledge the Laboratory of Microbiology, Virgen de las Nieves University Hospital and the work of Jose Manuel Garcia-Madero in editing the text.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Borlinghaus, J.; Albrecht, F.; Gruhlke, M.C.; Nwachukwu, I.D.; Slusarenko, A.J. Allicin: Chemistry and biological properties. *Molecules* **2014**, *19*, 12591–12618. [[CrossRef](#)]
2. Chan, J.Y.; Yuen, A.C.; Chan, R.Y.; Chan, S.W. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytother. Res.* **2013**, *27*, 637–646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Reiter, J.; Levina, N.; van der Linden, M.; Gruhlke, M.; Martin, C.; Slusarenko, A.J. Diallylthiosulfinate (Allicin), a volatile antimicrobial from garlic (*Allium sativum*), kills human lung pathogenic bacteria, including MDR strains, as a vapor. *Molecules* **2017**, *22*, 1711. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Ankri, S.; Mirelman, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* **1999**, *1*, 125–129. [[CrossRef](#)]
5. Focke, M.; Feld, A.; Lichtenthaler, K. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. *FEBS Lett.* **1990**, *261*, 106–108. [[CrossRef](#)]
6. Rabinkov, A.; Miron, T.; Konstantinovski, L.; Wilchek, M.; Mirelman, D.; Weiner, L. The mode of action of allicin: Trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1379*, 233–244. [[CrossRef](#)]
7. Gruhlke, M.C.; Portz, D.; Stitz, M.; Anwar, A.; Schneider, T.; Jacob, C.; Schlaich, N.L.; Slusarenko, A.J. Allicin disrupts the cell's electrochemical potential and induces apoptosis in yeast. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, *49*, 1916–1924. [[CrossRef](#)]
8. Feldberg, R.S.; Chang, S.C.; Kotik, A.N.; Nadler, M.; Neuwirth, Z.; Sundstrom, D.C.; Thompson, N.H. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1988**, *32*, 1763–1768. [[CrossRef](#)]
9. Keusgen, M.; Schulz, H.; Glodek, J.; Krest, I.; Krüger, H.; Herchert, N.; Keller, J. Characterization of some *Allium* hybrids by aroma precursors, aroma profiles, and alliinase activity. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2884–2890. [[CrossRef](#)]
10. Guillamón, E. Effect of phytochemical compounds of the genus *Allium* on the immune system and the inflammatory response. *Ars Pharm.* **2018**, *59*, 185–196. [[CrossRef](#)]
11. Sorlozano-Puerto, A.; Albertuz-Crespo, M.; Lopez-Machado, I.; Ariza-Romero, J.J.; Baños-Arjona, A.; Exposito-Ruiz, M.; Gutierrez-Fernandez, J. In vitro antibacterial activity of propyl-propane-thiosulfinate and propyl-propane-thiosulfonate derived from *Allium* spp. against gram-negative and gram-positive multidrug-resistant bacteria isolated from human samples. *Biomed Res. Int.* **2018**, *2018*, 7861207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

12. Singla, N.; Gulati, N.; Kaistha, N.; Chander, J. Candida colonization in urine samples of ICU patients: Determination of etiology, antifungal susceptibility testing and evaluation of associated risk factors. *Mycopathologia* **2012**, *174*, 149–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sobel, J.D.; Fisher, J.F.; Kauffman, C.A.; Newman, C.A. Candida urinary tract infections—Epidemiology. *Clin. Infect. Dis.* **2011**, *52*, S433–S436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Leontiev, R.; Hohaus, N.; Jacob, C.; Gruhlke, M.; Slusarenko, A.J. A comparison of the antibacterial and antifungal activities of thiosulfinate analogues of Allicin. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6763. [[CrossRef](#)]
15. Miceli, M.H.; Diaz, J.A.; Lee, S.A. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect. Dis.* **2011**, *11*, 142–151. [[CrossRef](#)]
16. Kucukates, E.; Gultekin, N.; Alisan, Z.; Hondur, N.; Ozturk, R. Identification of *Candida* species and susceptibility testing with Sensititre YeastOne microdilution panel to 9 antifungal agents. *Saudi Med. J.* **2016**, *37*, 750–757. [[CrossRef](#)]
17. Alexander, B.D.; Johnson, M.D.; Pfeiffer, C.D.; Jiménez-Ortigosa, C.; Catania, J.; Booker, R.; Castanheira, M.; Messer, S.A.; Perlin, D.S.; Pfaller, M.A. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: Clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *56*, 1724–1732. [[CrossRef](#)]
18. Castanheira, M.; Messer, S.A.; Jones, R.N.; Farrell, D.J.; Pfaller, M.A. Activity of echinocandins and triazoles against a contemporary (2012) worldwide collection of yeast and moulds collected from invasive infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *44*, 320–326. [[CrossRef](#)]
19. Cretella, D.; Barber, K.E.; King, S.T.; Stover, K.R. Comparison of susceptibility patterns using commercially available susceptibility testing methods performed on prevalent *Candida* spp. *J. Med. Microbiol.* **2016**, *65*, 1445–1451. [[CrossRef](#)]
20. Wang, E.; Farmakiotis, D.; Yang, D.; McCue, D.A.; Kantarjian, H.M.; Kontoyiannis, D.P.; Mathisen, M.S. The ever-evolving landscape of candidaemia in patients with acute leukaemia: Non-susceptibility to caspofungin and multidrug resistance are associated with increased mortality. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 2362–2368. [[CrossRef](#)]
21. An, M.; Shen, H.; Cao, Y.; Zhang, J.; Cai, Y.; Wang, R.; Jiang, Y. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2009**, *33*, 258–263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Khodavandi, A.; Alizadeh, F.; Aala, F.; Sekawi, Z.; Chong, P.P. In vitro investigation of antifungal activity of allicin alone and in combination with azoles against *Candida* species. *Mycopathologia* **2010**, *169*, 287–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Khodavandi, A.; Alizadeh, F.; Harmal, N.S.; Sidik, S.M.; Othman, F.; Sekawi, Z.; Jahromi, M.A.; Ng, K.P.; Chong, P.P. Comparison between efficacy of allicin and fluconazole against *Candida albicans* in vitro and in a systemic candidiasis mouse model. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *315*, 87–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Heras-Cañas, V.; Ros, L.; Sorlózano, A.; Gutiérrez-Soto, B.; Navarro-Marí, J.M.; Gutiérrez-Fernández, J. Isolated yeast species in urine samples in a Spanish regional hospital. *Rev. Argent. Microbiol.* **2015**, *47*, 331–334. [[CrossRef](#)]
25. Jiménez-Guerra, G.; Casanovas Moreno-Torres, I.; Gutiérrez-Soto, M.; Vazquez-Alonso, F.; Sorlózano-Puerto, A.; Navarro-Marí, J.M.; Gutiérrez-Fernández, J. Inpatient candiduria: Etiology, susceptibility to antifungal drugs and risk factors. *Rev. Esp. Quimioter.* **2018**, *31*, 323–328.
26. Aigner, M.; Erbeznik, T.; Gschwentner, M.; Lass-Flörl, C. Etest and Sensititre YeastOne susceptibility testing of echinocandins against *Candida* species from a single center in Austria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e00512-17. [[CrossRef](#)]
27. Alfouzan, W.; Al-Enezi, T.; AlRoomi, E.; Sandhya, V.; Chandy, R.; Khan, Z.U. Comparison of the VITEK 2 antifungal susceptibility system with Etest using clinical isolates of *Candida* species. *Rev. Iberoam. Micol.* **2017**, *34*, 171–174. [[CrossRef](#)]
28. Oz, Y.; Gokbolat, E. Evaluation of direct antifungal susceptibility testing methods of *Candida* spp. from positive blood culture bottles. *J. Clin. Lab. Anal.* **2018**, *32*, e22297. [[CrossRef](#)]
29. Siqueira, R.A.; Doi, A.M.; de Petrus Crossara, P.P.; Koga, P.; Marques, A.G.; Nunes, F.G.; Pasternak, J.; Martino, M. Evaluation of two commercial methods for the susceptibility testing of *Candida* species: Vitek 2<sup>®</sup> and Sensititre YeastOne<sup>®</sup>. *Rev. Iberoam. Micol.* **2018**, *35*, 83–87. [[CrossRef](#)]
30. Diba, A.; Alizadeh, F. In vitro and in vivo antifungal activity of *Allium hirtifolium* and *Allium sativum*. *Avicenna J. Phytomed.* **2018**, *8*, 465–474.
31. Shams-Ghahfarokhi, M.; Shokoohamiri, M.R.; Amirrajab, N.; Moghadasi, B.; Ghajari, A.; Zeini, F.; Sadeghi, G.; Razzaghi-Abyaneh, M. In vitro antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. *Fitoterapia* **2006**, *77*, 321–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gruhlke, M.; Schlembach, I.; Leontiev, R.; Uebachs, A.; Gollwitzer, P.; Weiss, A.; Delaunay, A.; Toledano, M.; Slusarenko, A.J. Yap1p, the central regulator of the *S. cerevisiae* oxidative stress response, is activated by allicin, a natural oxidant and defence substance of garlic. *Free Radic. Biol. Med.* **2017**, *108*, 793–802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Li, W.R.; Shi, Q.S.; Dai, H.Q.; Liang, Q.; Xie, X.B.; Huang, X.M.; Zhao, G.Z.; Zhang, L.X. Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 22805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Khodavandi, A.; Alizadeh, F.; Harmal, N.S.; Sidik, S.M.; Othman, F.; Sekawi, Z.; Chong, P.P. Expression analysis of SIR2 and SAPs1-4 gene expression in *Candida albicans* treated with allicin compared to fluconazole. *Trop. Biomed.* **2011**, *28*, 589–598.
35. Ebrahimy, F.; Dolatian, M.; Moatar, F.; Majd, H.A. Comparison of the therapeutic effects of Garcin<sup>®</sup> and fluconazole on *Candida vaginitis*. *Singap. Med. J.* **2015**, *56*, 567–572. [[CrossRef](#)]
36. Curtis, H.; Noll, U.; Störmann, J.; Slusarenko, A.J. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2004**, *65*, 79–89. [[CrossRef](#)]
37. Abubakar, E.-m.M. Efficacy of crude extracts of garlic (*Allium sativum* Linn.) against nosocomial *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Plant Res.* **2009**, *3*, 179–185.

38. Müller, A.; Eller, J.; Albrecht, F.; Prochnow, P.; Kuhlmann, K.; Bandow, J.E.; Slusarenko, A.J.; Leichert, L.I. Allicin induces thiol stress in bacteria through S-allylmercapto modification of protein cysteines. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 11477–11490. [[CrossRef](#)]
39. Lemar, K.M.; Turner, M.P.; Lloyd, D. Garlic (*Allium sativum*) as an anti-Candida agent: A comparison of the efficacy of fresh garlic and freeze-dried extracts. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *93*, 398–405. [[CrossRef](#)]
40. Shadkchan, Y.; Shemesh, E.; Mirelman, D.; Miron, T.; Rabinkov, A.; Wilchek, M.; Osherov, N. Efficacy of allicin, the reactive molecule of garlic, in inhibiting *Aspergillus* spp. in vitro, and in a murine model of disseminated aspergillosis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 832–836. [[CrossRef](#)]
41. Abouelfetouh, A.Y.; Moussa, N.K. Enhancement of antimicrobial activity of four classes of antibiotics combined with garlic. *Asian J. Plant Sci.* **2012**, *11*, 148–152. [[CrossRef](#)]
42. Jonkers, D.; Sluimer, J.; Stobberingh, E. Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 3045. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Ogita, A.; Nagao, Y.; Fujita, K.; Tanaka, T. Amplification of vacuole-targeting fungicidal activity of antibacterial antibiotic polymyxin B by allicin, an allyl sulfur compound from garlic. *J. Antibiot.* **2007**, *60*, 511–518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pillai, R.; Trivedi, N.A.; Bhatt, J.D. Studies on in vitro interaction of ampicillin and fresh garlic extract against *Staphylococcus aureus* by checkerboard method. *Anc. Sci. Life* **2013**, *33*, 114–118. [[CrossRef](#)]
45. Yalindag-Ozturk, N.; Ozdamar, M.; Cengiz, P. Trial of garlic as an adjunct therapy for multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in a critically ill infant. *J. Altern. Complement. Med.* **2011**, *17*, 379–380. [[CrossRef](#)]
46. Guo, N.; Wu, X.; Yu, L.; Liu, J.; Meng, R.; Jin, J.; Lu, H.; Wang, X.; Yan, S.; Deng, X. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2010**, *58*, 193–201. [[CrossRef](#)]
47. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*; Fourth Informational Supplement M27-S4; CLSI: Wayne, PA, USA, 2012.
48. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, 1st ed.; Supplement M60; CLSI: Wayne, PA, USA, 2017.
49. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antifungal Agents-Breakpoint Tables for Interpretation of MICs. Version 8.1. 2017. Available online: <http://www.eucast.org/> (accessed on 24 October 2017).
50. Abad, P.; Lara, F.J.; Arroyo-Manzanares, N.; Baños, A.; Guillamón, E.; García-Campaña, A.M. High-performance liquid chromatography method for the monitoring of the *Allium* derivative propyl propane thiosulfonate used as natural additive in animal feed. *Food Anal. Methods* **2015**, *8*, 916–921. [[CrossRef](#)]
51. Abad, P.; Arroyo-Manzanares, N.; Gil, L.; García-Campaña, A.M. Use of onion extract as a dairy cattle feed supplement: Monitoring propyl propane thiosulfonate as a marker of its effect on milk attributes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 793–799. [[CrossRef](#)]



Caleb Wettenhall  
Editor

# Allium

*Ecology, Distribution and Cultivation*



PLANT SCIENCE RESEARCH AND PRACTICES

NOVA

*Chapter*

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF  
ALLIUM-DERIVED COMPOUNDS:  
FOCUS ON POTENTIAL TREATMENT OF  
HUMAN INFECTIONS**

***Antonio Sorlózano-Puerto<sup>1,\*</sup>, María Albertuz-Crespo<sup>1</sup>,  
Isaac López-Machado<sup>1</sup>, José Manuel García-Madero<sup>2</sup>,  
Enrique Guillamón-Ayala<sup>2</sup>, Alberto Baños-Arjona<sup>2</sup>  
and José Gutiérrez-Fernández<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Department of Microbiology,  
School of Medicine and PhD Program in Clinical Medicine and Public  
Health, University of Granada-ibs, Granada, Spain

<sup>2</sup>Department of Microbiology and Biotechnology,  
DMC Research Center, Granada, Spain

**ABSTRACT**

The use of conventional antimicrobials (especially antibiotics) for the prevention of infectious diseases and as growth promoters in animal

---

\*Corresponding Author's Email: asp@ugr.es.



production has fostered the appearance of resistant microorganisms and the transmission of these pathogens to humans. In addition, the use and sometimes misuse of antibiotics in humans has increased the occurrence of infections caused by multiresistant bacteria, which has reduced the therapeutic options and has made necessary to investigate newer molecules with antibacterial properties. Natural compounds obtained from vegetables with antimicrobial properties could be considered an alternative to conventional drugs.

Plants of the genus *Allium* such as garlic and onion have been traditionally used as food but also as medicine since ancient times in India, Egypt, Greece, and Rome. Its antimicrobial, antioxidant and cardiovascular properties are known for centuries and are not only accepted as an ethnopharmaceutical drugs but also proved to have therapeutic effects by several scientific research studies. The first investigations on the antimicrobial properties of garlic extracts were carried out in the 1940s and several research studies about antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic activity of *Allium*-derived compounds have been published since then and can be found as the current literature.

In this chapter, we have tried to gather the existing scientific evidence to date on the antimicrobial activity of *Allium*-derived compounds to establish whether, beyond their use in animals, it is possible that these molecules will as well be useful in the clinical practice on potential treatment of human infections.

## INTRODUCTION

The culinary and therapeutic properties of some plants of the *Liliaceae* family, such as garlic (*Allium sativum*), ramson (*Allium ursinum*), onion (*Allium cepa*), chive (*Allium schoenoprasum*), leek (*Allium ampeloprasum* var. *porrum*) and many other plants belonging to the genus *Allium*, are widely known since time immemorial. These properties are attributed to the presence of minerals (calcium, magnesium, potassium, iron, cobalt, copper, selenium...), essential amino acids, lipids, fiber, vitamins (B1, B2, B3, C), fructooligosaccharides, terpenes and various phenolic and sulfur compounds (Koch and Lawson, 1996). Among the latter, it should be noted the presence of a variable amount of precursors of S-alk(en)yl-cysteine sulfoxides, soluble in aqueous media, and responsible, not only for the characteristic smell and taste of these plants, but also, to a larger extent, for

some of the medicinal properties attributed to their consumption (Kodera et al. 2017). Getting to know in depth the physiological effects generated by these plants and the mechanisms of action by which they are produced is the previous and essential step in order to determine their potential use in medicine. In this sense, garlic and onion are the most studied plants.

Alliin (S-allyl-L-cysteine sulfoxide) is the most important sulfur compound found in raw garlic and it is distributed into the cellular cytoplasm. When the garlic is chopped or crushed, a common enzyme to all species of the genus *Allium* called alliinase, which is concentrated inside the cytosolic vacuoles, is released. In contact with alliin, this enzyme produces allyl sulfenic acid and dihydroalanine. Two molecules of allyl sulfenic acid are condensed changing into allicin (diallyl thiosulfinate) (Borlinghaus et al. 2014). The poor stability of allicin at room temperature favours its transformation by different mechanisms in other organosulfur derivatives (Figure 1) soluble in oily media, mainly ajoenes (e.g., E-ajoene, Z-ajoene), vinylthiines (e.g., vinyl-1.3-dithiin, vinyl-1.2-dithiin) and sulfides (diallyl sulfide or DAS, diallyl disulfide or DADS, diallyl trisulfide or DATS, diallyl tetrasulfide or DATTS) (Corzo-Martinez et al. 2007).

In onion, the most common sulfur compounds are isoalliin (S-propenyl-L-cysteine sulfoxide) that changes into lachrymatory factor; methiin (S-methyl-L-cysteine sulfoxide) that was found to be present in garlic, and propiin (S-propyl-L-cysteine sulfoxide) that changes into propyl-propane thiosulfinate (PTS) due to the action of alliinase (Keusgen et al. 2002). Although, it is more stable than allicin, PTS is also a labile compound that through dismutation or disproportionation reactions changes into dipropyl disulfur and propyl-propane thiosulfonate (PTSO) (Guillamón, 2018) (Figure 2).

All these molecules (thiosulfates and derivative compounds) show biological properties: antioxidative character, hypolipidemic and hypocholesterolemic effect, antihypertensive and heart-protective action, antithrombotic properties, anticancer activity, anti-inflammation and immunomodulator effect, and specially, antimicrobial activity (antibacterial, antifungal, antiviral and antiparasitic). Louis Pasteur initially



