



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFECTO ANTIMICROBIANO DE BACTERIOCINAS EN BACTERIAS
MULTIRRESISTENTES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA
MÉDICA**

**AUTOR: BRUNO ENRIQUE ORREGO ANDRADE
PROFESORA GUÍA: Blga. Mg. Cs. OLGA LOBOS GILABERT**

TALCA – CHILE

2020

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2021

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso de este trabajo se han involucrado diferentes personas, quiero empezar agradeciendo a mi profesora guía Blga. Mg. Cs. Olga Lobos Gilabert que resolvió mis dudas y me ayudó a darle forma a este trabajo durante el tiempo que duró la investigación. A mis padres y a mi hermana, que desde que empecé el viaje por la universidad han sido el apoyo fundamental para lograr mis metas y sin ellos no habría llegado a donde estoy. Por último, a Carla Sandoval y Erica Santelices por los buenos momentos que hemos formado y por estar siempre ayudándonos en todo lo que necesitamos.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos	II
Índice de tablas y figuras	V
Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	4
Metodología de búsqueda	5
1. Generalidades de bacteriocinas	6
1.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativo	9
1.1.1. Colicinas	10
1.1.2. Microcinas	13
1.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo	14
1.2.1. Clase I	17
1.2.2. Clase II	20
1.2.3. Clase III	26
1.2.4. Clase IV	28
2. Efecto de bacteriocinas sobre cepas de bacterias multirresistentes	30
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente	30
2.1.1. Epidemiología	31
2.1.2. Efecto de bacteriocinas	32

2.2. <i>Enterococcus spp.</i> resistente a vancomicina	39
2.2.1. Epidemiología	40
2.2.2. Efecto de bacteriocinas	42
2.3. <i>Escherichia coli</i> resistente a antibióticos	51
2.3.1. Epidemiología	53
2.3.2. Efecto de bacteriocinas	54
2.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos	60
2.4.1. Epidemiología	61
2.4.2. Efecto de bacteriocinas	62
2.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos	66
2.5.1. Epidemiología	68
2.5.2. Efecto de bacteriocinas	70
2.6. <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos	75
2.6.1. Epidemiología	77
2.6.2. Efecto de bacteriocinas	78
3. Resistencia a bacteriocinas	82
3.1. Tipos de resistencia a bacteriocinas	83
3.1.1. Cambios en la pared celular y membrana externa	83
3.1.2. Cambios en la membrana celular	84
3.1.3. Sistemas de 2 componentes	85
3.1.4. Degradación enzimática	86
3.1.5. Bomba de eflujo	87
3.2. Resistencia a nisina y clase II	88

3.2.1. Resistencia a nisina	89
3.2.2. Resistencia a clase II	90
Conclusión	92
Referencias	94

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Características generales de las bacteriocinas	8
Tabla 2. Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos	8
Figura 1. Mecanismo de acción de la nisina sobre la membrana bacteriana	19
Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas producidas por BAL	29
Tabla 4. Resumen de bacteriocinas activas contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	38
Tabla 5. Resumen de bacteriocinas activas contra <i>Enterococcus spp.</i> resistente a vancomicina	50
Tabla 6. Resumen de bacteriocinas activas contra <i>Escherichia coli</i> resistente a carbapenémicos y a betalactámicos	59
Tabla 7. Resumen de bacteriocinas activas contra <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a carbapenémicos y a betalactámicos	65
Tabla 8. Resumen de bacteriocinas activas contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos	74
Tabla 9. Resumen de bacteriocinas activas contra <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos	81
Figura 2. Mecanismos de resistencia a bacteriocinas en bacterias Gram positivo y Gram negativo	87

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias es un problema mundial. La OMS ha declarado ciertas especies resistentes como las más urgentes para abordar y los esfuerzos se han concentrado en buscar nuevas terapias o tratamientos. El uso de bacteriocinas, ofrece una alternativa en este aspecto. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos formados en los ribosomas de diversas especies bacterianas, siendo su espectro, mecanismo y dosis letal diferente para cada especie productora. Estos péptidos antimicrobianos pueden utilizarse por sí solos o en compañía de antibióticos de uso común en la práctica clínica. Las bacteriocinas se clasifican en clases dependiendo del tipo de bacteria productora, sean estas Gram positivo o negativo. Aquellas bacteriocinas elaboradas por Gram positivo como las bacterias ácido lácticas (BAL) son las más estudiadas, siendo algunas de ellas actualmente usadas como probióticos. Aun cuando las bacteriocinas pueden investigarse como potenciales tratamientos, no están exentas de provocar resistencia por diversos mecanismos. Aunque esta resistencia no se presenta de forma común, las hace buenas moléculas para el estudio ya que se puede mejorar su acción si se conoce la forma específica que utilizan para atacar el blanco de acción. El objetivo de este estudio fue realizar una revisión actualizada respecto de los avances científicos existentes en relación con el efecto antimicrobiano que poseen las bacteriocinas frente a bacterias multirresistentes. Para realizar esto se recurrió a la información en buscadores como PubMed, Scopus, Google académico, Web of Science, entre otros. Como conclusión se puede inferir que las bacteriocinas presentan acción contra bacterias multirresistentes ya sea en sinergia con antibióticos o individualmente, este efecto puede darse en presentación de CFS (*cell-free supernatant*) o en forma purificada. La dosis puede variar, por lo general, desde los $\mu\text{g/ml}$ a los mg/mL . Utilizada en conjunto con antibióticos reduce la concentración requerida del primero.

Palabras claves: bacteriocinas, efecto antimicrobiano, mecanismos de resistencia, bacterias multirresistentes, antibióticos.

INTRODUCCIÓN

El aumento de cepas bacterianas resistentes a los antimicrobianos usados de manera rutinaria sumado al aislamiento mayoritario de éstas en los centros clínicos, es la base para la investigación y conocimiento de nuevas formas terapéuticas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desarrollado una lista de patógenos prioritarios que son resistentes a los antibióticos para ayudar a priorizar la investigación y el desarrollo de nuevos tratamientos efectivos. La selección de estos patógenos se realizó mediante bases de datos sobre enfermedades infecciosas, revisiones sistemáticas en la literatura y guías internacionales centradas en el tratamiento y la prevención de infecciones debidas a bacterias resistentes a los antibióticos (1).

La lista de patógenos de la OMS se divide en patógenos de prioridad crítica, alta y media, destacando a *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos; *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* resistentes a fluorquinolonas (1).

La elección de los géneros bacterianos a estudiar es en base a reportes nacionales y extranjeros que coincidan con los aislamientos más frecuentes, centrados principalmente, en *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Enterococcus* resistente a vancomicina,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Acinetobacter baumannii* y bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.

Las principales bacteriocinas que se han estudiado tanto para la industria alimentaria, las cuales se encuentran aprobadas y para tratar a seres humanos, son las que provienen de las bacterias ácido lácticas (BAL). Éstas actúan en dosis pequeñas y son consideradas seguras para los seres humanos, por lo tanto, pueden ser administradas. Entre las más conocidas están las bacteriocinas de clases I y II, siendo producidas por bacterias Gram positivo. También, existen bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativo, además de otras clases adicionales elaboradas por bacterias Gram positivo.

En los últimos años, las bacteriocinas han sido candidatas para ser estudiadas como una alternativa a los antibióticos contra bacterias resistentes, han probado ser útiles en la industria alimentaria, y se ha pensado en su acción para el tratamiento de las infecciones en los seres humanos.

OBJETIVOS

Objetivo general: Realizar una revisión actualizada respecto de los avances científicos existentes en relación con el efecto antimicrobiano que poseen las bacteriocinas frente a bacterias multirresistentes.

Objetivos específicos

1. Describir los conceptos modernos relacionados con síntesis, tipos y mecanismos de acción de bacteriocinas sobre microorganismos.
2. Analizar, conforme a la literatura actual, el efecto antimicrobiano particular de las bacteriocinas sobre bacterias multirresistentes.

METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

Se realizó una revisión bibliográfica con la información disponible acerca del efecto antimicrobiano de bacteriocinas sobre bacterias multirresistentes. Para esta búsqueda, se consultaron bases de datos nacionales e internacionales para asegurar la calidad de la información. Las bases de datos consultadas fueron: PubMed, Scopus, Web of Science, Google académico, entre otros, con el propósito de revisar trabajos publicados relacionados al tema de investigación durante los últimos 5 años.

MARCO TEÓRICO

1. Generalidades de bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos catiónicos sintetizados en los ribosomas y son producidos por casi todos los grupos de bacterias. Su función fisiológica parece ser la inhibición del crecimiento de microorganismos, en un nicho ecológico particular, mediante la destrucción de estos (2). Las bacteriocinas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, ya sean Gram positivo o Gram negativo, además de las Arqueas (3). En la Tabla 1 se presentan características generales de las bacteriocinas.

En las bacterias, la producción de bacteriocinas involucra diferentes genes, como aquellos que participan en la modificación de aminoácidos, la exportación y la regulación, así como también la autoinmunidad, mediante la producción de proteínas, para que la bacteria productora evite ser dañada por sus propias bacteriocinas. Estos genes están localizados en cromosomas o en plásmidos (4).

Las bacteriocinas han mostrado sinergia con antibióticos convencionales e incluso algunas bacteriocinas han mostrado ser efectivas contra virus (4), como es el caso de la labirintopeptina, una clase de lantibiótico carbacíclico que tiene como aminoácido la labionina y presenta acción antimicrobiana sobre el virus herpes simple (5).

Los atributos positivos que permiten a las bacteriocinas ganar terreno, tanto en el ámbito de la preservación de alimentos como en la acción sobre bacterias que afectan a los seres humanos, son su capacidad inherente de tolerar alto estrés termal y un amplio rango de pH. Además, estas no tienen color, olor y sabor lo que potencia su utilidad (6).

Otro punto favorable de las bacteriocinas es su rápido mecanismo de acción, ya que actúan formando poros en la membrana de las bacterias, incluso en bajas concentraciones. Esto sumado a la rápida degradación por parte de enzimas proteolíticas debido a su naturaleza proteica permite que no queden circulando en el cuerpo o en el ambiente, reduciendo así la oportunidad de desarrollar resistencia por parte de los microorganismos (6). Además de su acción en la membrana bacteriana, se destaca su uso en alimentos, cáncer y enfermedades infecciosas (7).

Estos péptidos originalmente emergieron como mecanismos de adaptación, lo que los posiciona como una estrategia efectiva para mantener la población y reducir el número de competidores permitiendo así la obtención de nutrientes y espacio físico para desarrollar a la bacteria productora (8). A diferencia de los antibióticos, los cuales son metabolitos secundarios, las bacteriocinas pueden ser degradadas fácilmente por proteasas, siendo, por lo general, inocuas para los seres humanos o animales (9). En la Tabla 2 se presentan las principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos que dan cuenta de su utilidad por sobre estos últimos.

A grandes rasgos, las bacteriocinas se clasifican en las producidas por bacterias Gram negativo como *Citrobacter freudii*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*; y las producidas por bacterias Gram positivo como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus uberis*, *Bacillus spp.*, *Actinomadura*, *Bacillus subtilis*, *Pediococcus acidilactici*, *Carnobacterium*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus epidermidis*, entre otras (10).

Tabla 1. Características generales de las bacteriocinas

Tomado y adaptado de Heredia-Castro (2017)

Características generales de las bacteriocinas
Origen: ribosomal o plasmidial, péptidos extracelulares producidos por bacterias Gram positivo y negativo
Espectro de acción: actúan contra bacterias Gram positivo y negativo, siendo algunas bacterias susceptibles, como <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas spp.</i>
Modo de actividad: bactericida, bacteriostático y fungicida
Mecanismo de acción: permeabilización de la membrana y lisis celular mediante disminución de síntesis de ADN, ARN y proteínas
Estructura química: péptidos, glicoproteínas y lipoproteínas
Localización de genes que las codifican: plásmidos, cromosomas, transposones
Sensibilidad a enzimas: todas las bacteriocinas son sensibles a enzimas proteolíticas
Sensibilidad a temperatura: termoestables, la mayoría soporta 100 – 121°C por 15 – 30 minutos
Sensibilidad a pH: la mayoría son estables en el intervalo de 3,0 a 9,0

Tabla 2. Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos

Tomado y adaptado de Pérez (2014), Meade (2020).

Características	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicación	Alimentos y clínica	Clínica
Síntesis	Ribosomal o plasmidial	Metabolito secundario
Espectro de actividad	Reducido	Amplio
Intensidad de actividad	Activa en rango nano a micro molar	Activo en rango micro o milimolar

Degradación por enzimas	Alta	Moderada a nula
Estabilidad térmica	Alta	Baja
Rango de pH activo	Amplio	Reducido
Color/sabor/olor	No	Sí
Susceptibilidad a bioingeniería	Sí	No
Posible mecanismo para desarrollo de resistencia	Adaptación mediante cambios en la composición de la membrana	Componente transferible genéticamente que inactiva el compuesto activo
Modo de acción	Formación de poros, inhibición de síntesis de pared celular	Membrana celular o dominios intracelulares
Toxicidad en células eucariontes	Relativamente no	Sí
Costo	Alto	Económicas costo-efectivas
Efectos adversos	No identificados	Varios

1.1. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram negativo

Mientras que el término “bacteriocina” está reservado para los péptidos ribosomales de las bacterias Gram positivo, también se debe incluir a los péptidos similares que son producidos por las bacterias Gram negativo. Entre estas se destacan las colicinas y microcinas, pero debido a que las bacterias Gram negativo no se presentan con frecuencia en los alimentos y su asociación típica es con las heces, no se han estudiado demasiado. Sin embargo, estas presentan características interesantes, han sido sintetizadas *in vitro* y su modo de acción y síntesis han demostrado ser más rápidas que las bacteriocinas de Gram positivo (11).

1.1.1. Colicinas

Las colicinas son grupo de bacteriocinas producidas por bacterias comensales y patógenas, se destaca principalmente *Escherichia coli*, que eliminan cepas no peligrosas de la misma especie con tal de ganar una ventaja competitiva, mediante la formación de poros en la membrana interna, inhibición de la síntesis de la pared celular y la degradación de ácidos nucleicos. Entre las especies que elimina se destacan la misma *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* Todas las colicinas deben unirse y cruzar la membrana externa y algunas deben cruzar, además, la membrana interna, dependiendo de su modo de citotoxicidad (11, 12, 13).

Las colicinas son proteínas antibacterianas que están codificadas, en su mayoría, en plásmidos, mientras que algunas lo están en cromosomas. Un gen típico de colicina codifica para una proteína tóxica, una proteína inmune y genes de lisis. Estas se pueden clasificar en 3 dominios específicos: el dominio amino terminal de translocación (N), el cual está implicado en la transferencia a través de la membrana externa por vía de una proteína translocadora; el dominio central de unión a receptor (R), el cual se une a la membrana externa de la bacteria mediante un receptor; y el dominio citotóxico carboxi terminal (C) el cual tiene actividad antibacteriana (10, 13).

Para evitar el envenenamiento producido por la misma colicina a la cepa productora, se expresan simultáneamente proteínas de la inmunidad específica para inactivarla. Las proteínas inmunes forman un complejo con las colicinas mediante la unión a su dominio citotóxico (C) neutralizando su actividad catalítica (13). Ya que las colicinas tienen diferentes modos de acción, las proteínas inmunes también tienen diferentes métodos, pero comparten la característica de unirse al sitio activo de la colicina (11).

La acción de las bacteriocinas sobre las bacterias puede clasificarse dependiendo de la respuesta de estas frente a la acción de la colicina. Cuando una bacteria en su membrana externa posee receptores para la colicina y un sistema de translocación hacia el interior de la bacteria, lo cual ocasiona la muerte de esta, se dice que es una cepa sensible. Cuando una bacteria no tiene receptores en su membrana externa para una colicina específica, se dice que es una cepa resistente. Cuando una bacteria tiene deficiencia en el sistema de translocación, se dice que es una cepa tolerante. Por último, cuando una bacteria produce proteínas inmunes, se dice que es una cepa inmune (10).

De acuerdo al sistema de translocación a través de la membrana externa, las colicinas se pueden clasificar en 2 grupos, el grupo A y B. El grupo A está compuesto por colicinas codificadas en plásmidos pequeños y presentes en numerosas copias por célula (6 a 10 kb) que usan el sistema Tol para penetrar la membrana externa. Ejemplos de este grupo son las colicinas E1 a E9, colicina A, K, N (9, 10).

El grupo B está compuesto por aquellas colicinas codificadas en plásmidos de una sola copia (40 kb), lo que trae numerosos genes en adición a los que codifican para la actividad de la colicina. Se usa el sistema Ton para penetrar la membrana externa, este está codificado por grandes plásmidos sin un gen de lisis. Ejemplos de este grupo son las colicinas 5, 10, B, D, M, V, Ia, Ib. (9). Estas proteínas son las responsables de mantener la integridad de la membrana externa para el ingreso del sustrato en *Escherichia coli* (13). Sin embargo, el transporte mediante plásmidos no es un requerimiento para esta bacteriocina (9).

Se han estudiado más de 20 colicinas y cada una exhibe diferentes mecanismos de acción (13), los 2 más comunes son la formación de poros en la membrana y la degradación de ácidos nucleicos (14). Por ejemplo, la colicina Ia y E1 forman poros en la membrana interna, la colicina M inhibe la formación de la pared celular, la colicina E2 degrada el ADN y la colicina E3 degrada ARN ribosomal, lo que lleva a una translocación lenta, además, la colicina K y E1 inhiben la síntesis de macromoléculas (9, 13).

Las colicinas pueden ser divididas en 3 categorías basadas en su mecanismo bactericida. En la primera categoría se encuentran las colinas que forman poros en la membrana, los poros permiten la fuga de componentes citoplasmáticos, destruyen el gradiente químico, producen pérdida de iones y causan muerte celular, estas incluyen a las colicinas A, B, E1, Ia, Ib, K y N. En la segunda están las colicinas con actividad nucleasa, ya que contienen DNAsas, rRNAsa 16s y tRNAsa, estas incluyen colicinas de la E2 a la E9; y en la tercera se encuentran las colicinas de tipo peptidóglicanasa, estas colicinas pueden digerir los precursores de peptidoglicán llevando a una imposibilidad de producir peptidoglicán y por consiguiente a la muerte de la bacteria (10, 15).

Existe un grupo de colicinas denominado bacteriocinas similares a colicina (o colicin-like), estas son producidas por *Klebsiella spp.* (klebicinas) y *Pseudomonas aeruginosa* (S-piocinas) (14). También se incluye la salmocina que es producida por *Salmonella spp.* (16). Estas mantienen su estructura, tamaño y mecanismo de acción al igual que las colicinas producidas por *Escherichia coli* (14).

1.1.2. Microcinas

Las microcinas son péptidos antimicrobianos hidrofóbicos de bajo peso molecular sintetizados en el ribosoma (< 10 kDa). Estos son producidos como péptidos precursores que incluyen un péptido N terminal líder y péptidos de núcleo. Debido a que las microcinas son producidas como péptidos precursores, algunos pueden o no pueden sufrir un proceso post transcripcional en el curso de maduración a microcina. Las microcinas son producidas predominantemente por la familia *Enterobacteriaceae*, mostrando gran tolerancia al calor, pH extremo y proteasas (10). A diferencia de las colicinas, la síntesis de microcinas no es letal para la cepa productora por lo que no es necesario producir proteínas de inmunidad específica (15).

Las microcinas pueden estar codificadas en plásmidos o cromosomas, usualmente con varios genes que pueden ser organizados como un operón. Estos genes codifican para los precursores de la microcina como proteínas necesarias para la secreción, factores de autoinmunidad y enzimas que son necesarias para una modificación post transcripcional (17).

El mecanismo de acción de las microcinas es variado, incluye la formación de poros en la membrana, hay de tipo nucleasa usando DNAsa y RNAsa, y las inhibidoras de síntesis de proteínas o de replicación de ADN. Las microcinas no tienen genes de lisis y son secretadas por el transportador de tipo I ABC que es un cassette de unión con ATP (13).

Las microcinas se clasifican de acuerdo a la presencia, naturaleza y localización de la modificación post transcripcional, organización de los genes y secuencias peptídicas (15). Las de clase I como las microcinas B17, C7 a C51, D93 y J25 son de bajo peso molecular (< 5 kDa) y son péptidos modificados post transduccionalmente. Las de clase II son más pesadas que las tipo I (5 – 10 kDa) y pueden ser divididas en clase IIa como las microcinas I, V y N. Estas requieren 3 genes diferentes para sintetizar y ensamblar péptidos funcionales que pueden contener enlaces disulfuro. Incluye péptidos codificados en plásmidos que no pasan por una modificación post transcripcional. Por otro lado, las de clase IIb, también conocidas como microcinas dependientes de TonB, ya que requieren de TonB funcional en la célula blanco para eliminarla (18), como las microcinas E492, M y H47, son péptidos lineales codificados en cromosomas con modificaciones post traduccionales en el dominio C terminal (10, 17).

1.2. Bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo

Las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivo exhiben características similares a las microcinas, es decir, son péptidos antimicrobianos con menos de 60 aminoácidos. En este tipo de bacterias, las bacterias ácido lácticas (BAL) son las típicas bacterias que producen bacteriocinas, y por lo general, se dividen en clases, siendo la clase I los péptidos modificados o lantibióticos, la clase II los péptidos no modificados o que no presentan lantionina, la clase III que son proteínas grandes e inestables al calor y la clase IV son péptidos cíclicos asociados a lípidos o carbohidratos (actualmente desestimada) (10, 19).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias Gram positivo con forma cocácea o bacilar, no formadoras de espora, catalasa negativo, inmóviles, aerotolerantes, producen ácido láctico al fermentar azúcares, presentan alta tolerancia por el pH bajo y están protegidas contra los productos del oxígeno como el peróxido de hidrógeno gracias a la enzima peroxidasa (20, 21). Además, estas pertenecen al phylum de los Firmicutes donde se encuentran diversas familias y géneros (22).

Este grupo de bacterias está compuesto de las siguientes familias: 1. *Lactobacillaceae* con los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*; 2. *Streptococcaceae* con los géneros *Lactococcus* y *Streptococcus*; 3. *Enterococaceae* con el género *Tetragenococcus*; 4. *Leuconostocaceae* con los géneros *Leuconostoc* y *Oenococcus*; 5. *Bifidobacteriaceae* con el género *Bifidobacterium* (20).

Debido a sus beneficios en salud, algunas BAL son usadas como probióticos, es decir, como organismos que mejoran la calidad de vida de humanos o de animales y se encuentran en suplementos alimenticios o en comidas fermentadas como el yogurt. Las especies del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* están entre las BAL más comunes usadas como probióticos. Para ser consideradas como probióticos deben ser catalogadas como generalmente reconocidas como seguras (GRAS), tolerar bajo pH, altas concentraciones de sales biliares, ser toleradas por el sistema inmune y no estimular la formación de anticuerpos (23). Además se evalúan otros elementos como taxonomía, patogenicidad, potencial de resistencia a antibióticos, producción de toxinas, consideraciones metabólicas, reportes de efectos adversos, entre otras (24).

El mecanismo bactericida que ejercen las bacteriocinas de BAL es mediante la formación de un poro, deterioro del ADN celular, inhibición de la síntesis del peptidoglicán en la pared celular y la perturbación del ADN 16 S. El mecanismo bactericida conlleva 3 pasos, la adsorción de la bacteriocina en la membrana de la bacteria objetivo, formación e inserción del péptido en la bicapa lipídica y la formación del poro. Este poro es el que causa la pérdida de componentes vitales lo que lleva a un cese del crecimiento o a la muerte de la bacteria (20). La adsorción de la bacteriocina se debe a fuerzas electrostáticas ya que están cargadas positivamente e interactúan con los fosfolípidos de la membrana bacteriana cargada negativamente. La unión con la bacteria diana se da entre la región N-terminal de la bacteriocina (hidrofílica) con la superficie polar de la membrana. Luego de esta unión, la región C-terminal (hidrofóbica) penetra hacia el interior no polar de la membrana celular, lo que resulta en la formación de poros provocando un vaciamiento intracelular donde se pierden iones K, ATP y de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular. Esto se traduce en disminución del potencial de membrana y baja en las reservas energéticas lo que lleva a la disminución de síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que finalmente desencadena la muerte de la célula (19).

Como estas bacteriocinas actúan en la membrana celular son más activas frente a las bacterias Gram positivo, sin embargo, bajo condiciones de estrés como bajo pH, calor o frío excesivo, presencia de quelantes, ausencia de iones o aumento de concentraciones de sal, algunas bacterias Gram negativo como *Escherichia coli* o *Salmonella spp.* pueden volverse sensibles a la acción de estas bacteriocinas (20). La producción de las bacteriocinas BAL está fenotípicamente relacionada y se sintetizan en presencia de competidores, principalmente por nutrientes (25). En la Tabla 3 se resumen las clases de bacteriocinas BAL.

Clases de bacteriocinas BAL

1.2.1. Clase I

Los lantibióticos son péptidos pequeños (<5 kDa) que son obtenidos mediante modificaciones postraduccionales donde se obtienen aminoácidos inusuales como dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb) con los residuos lantionina y metil-lantionina (6). La síntesis de estos aminoácidos se produce por la deshidratación de serina y treonina respectivamente para formar dehidroalanina y dehidrobutirina luego estos pueden unirse con cisteína para generar lantionina y metil-lantionina (20). Estos residuos inusuales forman enlaces covalentes entre aminoácidos, lo que resulta en “anillos” internos y les da a los lantibióticos su estructura característica (6).

La estructura de los lantibióticos varía según la localización de la unión de los aminoácidos modificados por lo que se distinguen 2 clases; la clase A péptidos lineales catiónicos y anfifílicos cuyo efecto antimicrobiano reside en la permeabilización de la membrana citoplasmática y en la inhibición de la biosíntesis de la pared celular, y la clase B son lantibióticos circulares o globulares cuyo efecto antimicrobiano reside en la inactivación de las enzimas para la biosíntesis de la pared celular (20, 26). Además, la clase I puede dividirse en labirintopeptinas, como la labirintopeptina A2 (que es un péptido globular) y los sactibióticos (subtilosina A) (10).

El lantibiótico más caracterizado es la nisina, la cual ha sido utilizada en la industria alimentaria, es un péptido catiónico lineal de 34 aminoácidos producido *por Lactococcus lactis subespecie lactis*, al ser un lantibiótico lineal tiene un doble modo de acción, primero al ser los lantibióticos péptidos catiónicos tienen predilección por la membrana celular aniónica de las bacterias lo que resulta en una mayor atracción (27, 28). Además, se cree que los lantibióticos reconocen un receptor específico en las bacterias, en la actualidad sólo un receptor ha sido descubierto en *Streptococcus pyogenes* denominado LsrS que exhibe una función similar a un receptor para el lantibiótico Smb (27).

Una vez se unen a la membrana celular, los lantibióticos como nisina, mersacidina, epidermina, plantaricina C y lacticina 3147, forman un complejo con una molécula denominada lípido II, con el fin de despolarizar la membrana citoplasmática. El lípido II es un precursor del peptidoglicán de la pared celular y se encuentra en el exterior de la membrana celular bacteriana. Algunos lantibióticos (nisina, plantaricina C y lacticina 3147) se unen al pirofosfato del lípido II, mientras que los lantibióticos del grupo de la mersacidina se unen a los grupos N-acetilglucosamina y posiblemente a los residuos de azúcar y fosfato del lípido II (27). La formación de canales estables es lo que permite la muerte de la célula por diversos mecanismos (fuga de contenido celular, eflujo de iones, pérdida de ATP intracelular, entre otros.), este canal se compone de 8 moléculas de nisina y 4 de lípido II por canal (29).

El lípido I, que es esencialmente un lípido II antes de adquirir grupos N-acetilglucosamina, también ha sido identificado como objetivo de la nisina y la epidermina, sin embargo, la unión al lípido II ha mostrado un efecto más pronunciado (27). A pesar de que el lípido I se encuentra en la cara citoplasmática de la membrana, se ha aceptado como blanco (aunque no primario), lo que puede ocurrir al permear la membrana usando el lípido II, el cual es el blanco primario (30). La unión a estos lípidos es mediante los 2 anillos de lantionina que los envuelve en la membrana (31). Cabe destacar que los lantibióticos no sólo

pueden unirse al lípido I y II y su unión no sólo inhibe la síntesis de la pared celular, sino que también contribuye a la formación de poros y lleva a la liberación de iones y moléculas de la bacteria objetivo (27).

En la Figura 1 se aprecia el mecanismo de acción dual de nisina sobre la membrana bacteriana. En una primera etapa se une la nisina a la pared celular por acercamiento electrostático. En la segunda etapa nisina se une al lípido II lo que interfiere con su síntesis y en la tercera etapa, la nisina unida al lípido II se ancla e inserta en la membrana para la formación del poro y llevar a la bacteria a una muerte rápida (5).

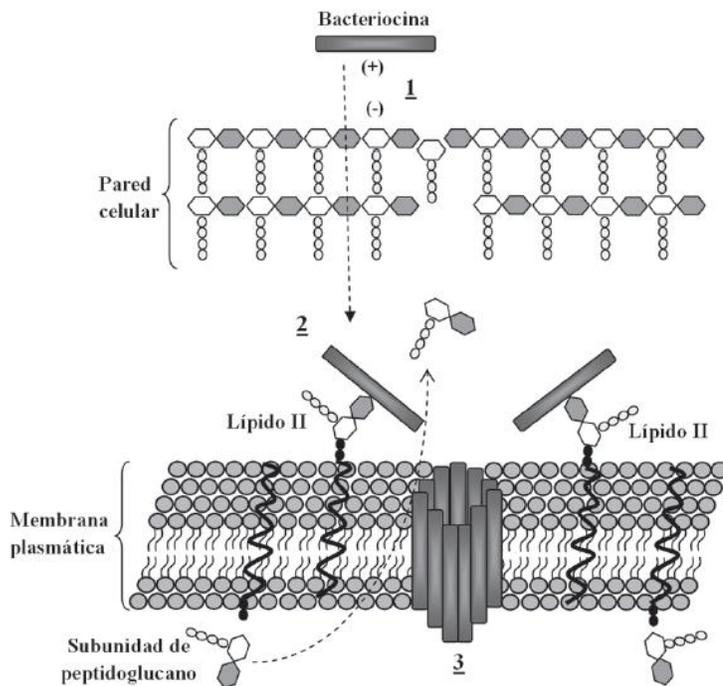


Figura 1. Mecanismo de acción de nisina sobre la membrana bacteriana. Tomada de López 2008

La vía mayor para los lantibióticos puede ser descrita usando el camino bien conocido de la nisina, aunque hay pequeñas diferencias para las bacteriocinas que no son lantibióticos ya que estas no necesitan la incorporación de aminoácidos inusuales. El primer paso se da con el gen *nisA* que codifica para el péptido pre-nisina A, la pre-nisina A es convertida en el precursor nisina A con el producto de los genes *nisB* (deshidrata residuos) y *nisC* (forma ciclos con los aminoácidos inusuales) que terminan deshidratando a los residuos de serina y treonina del propéptido. Se forman como resultado diversos puentes disulfuro y algunos aminoácidos son transformados a inusuales. Finalmente, el precursor nisina es exportado fuera de la membrana con ayuda de *nisT*. Por su parte, *nisP* con su actividad de proteasa corta la secuencia peptídica líder que hasta ese momento permanece inactiva biológicamente. (6, 21, 32).

1.2.2. Clase II

Las bacteriocinas de clase II son pequeñas y se componen de 30 a 60 aminoácidos (< 10 kDa), exhiben la propiedad de ser tolerantes al calor y no pasan por una modificación postraducciona, exceptuando el clivaje del péptido líder (33). Estos péptidos son hidrofóbicos, catiónicos y son bacteriocinas que permeabilizan la membrana plasmática interactuando con un receptor de membrana para manosa, lo que causa la fuga de componentes celulares (23). Esta clase es de particular interés por ser las más preparadas para su uso médico y aplicaciones en biotecnología (33).

Las bacteriocinas de la clase II se pueden subdividir en 5 categorías:

La categoría IIa cuenta con 2 propiedades principales, un dominio N-terminal conservado con una secuencia YGNGV o también llamada “caja pediocina” (34), la composición en aminoácidos está dada por la combinación Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys y una actividad anti *Listeria*. El dominio C terminal está menos conservado que el dominio N terminal y parece tener como función dar la especificidad para la célula objetivo, mientras que el dominio N terminal participa en la interacción con la célula objetivo (22). Esta clase llama la atención por su clasificación como GRAS, gran actividad biológica y estabilidad al calor (35).

Las bacteriocinas IIa pueden ser producidas constitutivamente (pediocina PA-1) o ser reguladas por *quorum sensing* (sakacina A) (22). Dentro de este subgrupo se encuentra la pediocina PA-1, es en honor a esta que también se les conoce como bacteriocinas del tipo pediocina y la carnobacteriocina X (13).

Las bacteriocinas de la clase IIa pueden ser divididas en 8 grupos basándose en su estructura primaria, pero la más estudiada y representativa del grupo es la pediocina PA-1. A modo general, la pediocina PA-1 está codificada en un plásmido y el operón contiene 4 genes de importancia, *pedA* como gen estructural, *pedB* como determinante de inmunidad, y *pedC* con *pedD* codifican para un transportador y proteínas accesorias, los que actúan sobre el transportados específico durante la secreción (22, 36). La pediocina PA-1 no está actualmente comercializada en estado puro, si no que se presenta en productos fermentados o congelados (36).

El mecanismo de acción de todas las bacteriocinas IIa se ha propuesto de forma similar, este se compone de 3 pasos, la pediocina se une a los receptores del sistema de manosa fosfotransferasa (Man-PTS), se inserta en la membrana citoplasmática y finalmente forma un poro (22) donde el dominio N terminal (positivo) se une al loop N terminal del sistema Man-PTS (37).

La categoría IIb requiere 2 péptidos diferentes no modificados para poseer una actividad antibacteriana óptima mediante la formación de poros, estos péptidos no muestran una actividad inhibitoria de manera individual. Se encuentran en esta categoría la lactacina F, lactococcina G y ABP-118 (3). Aunque se ha reportado que estas bacteriocinas necesitan ambos péptidos para tener actividad antimicrobiana, la termofilina 13 producida por *Streptococcus thermophilus* ha mostrado tener actividad antimicrobiana sólo con un péptido, aun así la combinación de ambos péptidos potencia la actividad (22). Lo interesante es que se caracterizan por tener una composición GxxxG lo que permitiría a los 2 péptidos tener interacciones de tipo hélice-hélice en la membrana para mediar su acción (38).

La producción de bacteriocinas IIb requiere de, por lo menos, 5 genes diferentes y pueden estar distribuidos en uno o dos operones. Lo más común es que contengan 2 genes estructurales para cada péptido, un gen de inmunidad, un gen que codifica para transportador y pueda exportarla de la célula y un gen que codifica para proteínas accesorias cuya función no está dilucidada del todo, aunque puede ser apoyando a la inmunidad o a la exportación, todos ellos en el mismo operón (39). A su vez, la producción es regulada transcripcionalmente por *quorum sensing* de 3 componentes, un factor de inducción, una proteína histidina kinasa asociada a membrana y reguladores de respuesta (22).

La categoría IIc, se define para las bacteriocinas que presentan una estructura circular que poseen modificaciones post traduccionales, la cual se forma por la unión covalente de los extremos carboxilo y amino terminal como la enterocina AS-48 (3, 23, 34). Estas bacteriocinas se caracterizan por su unión covalente entre el dominio N y C terminal formando una estructura circular conservada. Su espectro antimicrobiano es amplio y son conocidas por ser estables a cambios en pH y temperatura (resisten 121°C por 15 minutos), además de ser conocidas por su resistencia a enzimas proteolíticas (3). Además se reconoce su activación con residuos de cisteína (40). Las bacteriocinas circulares que se han descrito son producidas por bacterias Gram positivas y del phylum Firmicutes, también se han encontrado en los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (17).

Las bacteriocinas circulares pertenecen a la familia de péptidos sintetizados ribosomalmente y modificados post transduccionalmente (RiPPs), el término “circulares” no debe ser confundido con el término “cíclico” de péptidos que no son sintetizados en el ribosoma, que contienen anillos de lantionina y puentes disulfuro o son ciclados de manera intracelular (17, 41).

Las RiPPs no sólo tienen un origen bacteriano, sino que se ha encontrado en organismos eucariontes, para los cuales se les denomina ciclótidas. Sin embargo, las bacteriocinas circulares son ligeramente diferentes de las ciclótidas ya que no poseen puentes disulfuro intracelulares y sólo poseen extensiones en el dominio N terminal, a diferencia de las ciclótidas que poseen extensiones en ambos dominios. Debido a estas diferencias, se cree que la biosíntesis es diferente (41).

En cuanto a la síntesis de las bacteriocinas circulares, no se tiene tan claro el mecanismo, aunque se ha logrado dilucidar un gen que codifica para aminoácidos (49 a 88), proteínas de inmunidad y transportadores. En este aspecto se puede comparar a las bacteriocinas de clase I ya que requieren transportadores especiales más proteínas de inmunidad para adquirir una inmunidad completa. Los 3 pasos principales para su síntesis son clivaje de la secuencia líder, circularización, y exportación fuera de la membrana celular (17). Aunque no está dilucidado del todo se cree que participan de 4 a 10 genes donde hay un pre-péptido con un péptido señal que luego es clivado, el péptido maduro después de esto puede cerrarse volviéndose circular en la célula y luego secretado (42).

El mecanismo antimicrobiano se basa en la habilidad para interactuar directamente con la membrana celular bacteriana mediante la inserción de su parte central, esto causaría una fuga de iones, disipación del potencial de membrana, y eventualmente, la muerte celular. La característica común de las bacteriocinas circulares de tener una carga positiva hace creer que facilita su interacción con la membrana celular sin requerir una molécula de receptor (41, 43).

A la fecha se han descrito 14 bacteriocinas circulares, siendo la enterocina AS-48 la más representativa del grupo. Luego se fueron descubriendo la gaseicina A, circularina A, butyrivibriocina AR10, uberolisina, carnociclina A, lactociclina Q, garvicina ML, leucociclina Q, amilociclina, acidocina B (antes reportada como bacteriocina lineal, pero luego se demostró su forma circular), enterocina NKR-5-3B, pumilarina y más reciente plantariciclina A (41). Actualmente (2020) se han confirmado 20 bacteriocinas circulares, a la lista se suman aureociclina 4185, amilociclina CMW1, bacA, thermocina 458, paraciclina y plantaciclina B21AG (44).

La clasificación para bacteriocinas circulares es difícil ya que son muy similares en cuanto a ultra estabilidad a cambios de temperatura, variaciones de pH y generalmente resistentes a tratamiento con enzimas proteolíticas. Es por esto que se ha fijado en sus características bioquímicas para la clasificación (41).

El grupo I contiene péptidos catiónicos y con un punto isoeléctrico elevado ($pI > 9$), en esta clase se encuentran la enterocina AS-48, circularina A, uberolisina, carnociclina A, lactociclina Q, garvicina ML, leucociclina Q, amilociclina, enterocina NKR-5-3B y pumilarina (17, 41).

El grupo II contiene péptidos que son hidrofóbicos y tienen un punto isoeléctrico más bajo que el primero ($pI < 7$), en esta clase se encuentran gasericina A, butyrivibriocina AR10, acidocina B y plantariciclina A (17, 41).

La categoría IId son bacteriocinas que no encajan en las otras 3 categorías, estas son un grupo heterogéneo en cuanto a secuencia de aminoácidos, estructura, mecanismos de secreción y acción, se incluyen en esta categoría la epidermicina NI01, lactococcina 971, lactococcina A y enterocina B (22, 34). Estas bacteriocinas son únicas ya que son sintetizadas y exportadas sin un péptido líder N terminal, el cual, usualmente, funciona como secuencia de reconocimiento para secreción y modificación, y mantiene a la bacteriocina inactiva dentro de la célula productora (22, 45). Al ser un grupo heterogéneo de bacteriocinas pueden clasificarse en las bacteriocinas *sec*-dependiente que contienen una secuencia líder que dirige la exportación a través de la ruta secretora general (GSP), bacteriocinas líderes con doble glicina y las bacteriocinas sin péptido líder (46). Aunque hay autores que no consideran a las bacteriocinas líderes con doble glicina y mantienen sólo 2 categorías (47).

Dentro de la más estudiadas se encuentra la enterocina L50 (L50A y L50B) de *Enterococcus faecium* L50 codificada en plásmidos, esta incluye 2 genes estructurales en tándem, proteínas accesorias y 4 genes de transportador que participan en inmunidad. A diferencia de las otras 2 clases, esta carece de genes que codifican proteínas de inmunidad, lo cual es una característica común de las bacteriocinas sin péptido líder. Por tanto, el mecanismo de autoinmunidad no está claro (22). Esta bacteriocina exhibe características de la clase IIb (ya que son 2 péptidos) y IIc (ya que no tienen péptido líder) con una actividad antimicrobiana dependiendo de la acción de ambas (48). Además, se ha descubierto que esta bacteria productora de múltiples bacteriocinas puede producir 2 adicionales, enterocina P perteneciente a la clase IIa y enterocina Q perteneciente a la clase IIc sin péptido líder (a 37°C y 47°C, respectivamente) (48, 49).

La lactococcina A es una bacteriocina de clase IIc con reducido espectro y formadora de poros en la membrana. La síntesis involucra 4 genes, un gen estructural *lcnA*, un gen de inmunidad *lciA* y 2 genes para transportadores *lcnC* y *lcnD*, además de una proteína accesoria. El receptor de la lactococcina A es el sistema de manosa fosfotransferasa (Man-PTS) al igual que las bacteriocinas IIa (22). Sin embargo, se ha descubierto que sólo usa el Man-PTS de *Lactococcus*, mientras que las de clase IIa usan el Man-PTS de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y de *Listeria*. Además el componente que reconocen en la membrana es diferente (50).

1.2.3. Clase III

Esta clase contiene bacteriocinas de alto peso molecular (>30 kDa) y a diferencia de la clase II, no son termoestables. Esta clase puede subdividirse en las bacteriocinas del grupo A que son enzimas bacteriolíticas mediante la lisis de la célula como la enterolisina A, mientras

que el grupo B son proteínas no líticas como la caseína 80 y la helvétina J (34). Su mecanismo de acción es diferente al de las otras clases, actúan por hidrólisis de las uniones peptídicas del peptidoglicán de las células sensibles (19). Estas bacteriocinas tienen una conformación primaria que consiste en su dominio de unión y un dominio catalítico N terminal (51).

Las bacteriocinas del grupo A como la enterolisina A, exhiben en su región N-terminal una homología a una endopeptidasa involucrada en la síntesis de la pared celular, mientras que la región C-terminal es la que reconoce la célula objetivo (19, 22). Gracias a esta acción atacan la capa de peptidoglicán en la pared celular de las bacterias susceptibles Gram positivo (51). La zoocina A es una de las bacteriolisinas mejor caracterizadas y muestra actividad antimicrobiana contra estreptococos mediante el clivaje de puentes en el peptidoglicán. La proteína de inmunidad codificada por el gen *zif* añade una L-alanina para disminuir la habilidad de la zoocina A para degradar el propio peptidoglicán (22). La lisostafina de *Staphylococcus spp.* es una típica bacteriocina de este tipo que ejerce su acción dañando la pared celular (52), ha sido investigada desde 1960 y se ha determinado que su dominio catalítico posee 3 funciones distintas (endopeptidasa de glicilglicina, glucoamilasa y amilasa), permitiendo la hidrólisis de los componentes del peptidoglicán (53).

Por otra parte, las bacteriocinas de clase B exhiben su modo de acción sin causar la lisis de la célula. A modo general (y a modo de ejemplo, la disgalactina de *Streptococcus pyogenes*) se unen al sistema de manosa fosfotransferasa (Man-PTS) o al de glucosa, reduciendo la captación de este azúcar y también causa la fuga de pequeñas moléculas a través de la membrana y disturbando el potencial de membrana (22, 51). En contraste, la caseína inhibe la síntesis de ADN y de proteínas de la bacteria objetivo. No se conoce mucho acerca de la genética de estas bacteriocinas (22).

1.2.4. Clase IV

Las bacteriocinas de esta clase son péptidos grandes y de estructura compleja, ya que se encuentran asociados a carbohidratos (glicoproteínas) o lípidos (lipoproteínas), siendo la lactocina S (glicoproteína) y mesenterocina 52 (lipoproteína) las más representativas (13). Actualmente algunos autores consideran que la clase IV ha sido desestimada y los péptidos han sido reclasificados como bacteriolisinas incluyendo lactocina 27 y leuconocina S (21, 54). Dejando sólo 3 clases de bacteriocinas a modo general.

La clasificación de las bacteriocinas ha sido modificada con el paso de los años, entre 1993 y 2000 es donde fueron propuestas la mayor cantidad de modificaciones. Primeramente se establecieron 4 grupos (I, II, III y IV) y eso se mantuvo hasta 1996 donde el grupo IV fue desconsiderado por una reclasificación. Luego en el año 2000 el grupo IV siguió siendo eliminado, pero la clase II fue la que tuvo mayores modificaciones. Hasta llegar a una propuesta donde las bacteriocinas circulares (antes clasificadas como IIc en la mayoría de los casos), pasarían a ser de clase III, y las de clase III pasarían a ser de clase IV (55). En estudios actuales, no se hace referencia a una clase IV como en las propuestas anteriormente, si no que mantienen las 3 primeras clases con las modificaciones a las clase II que se habían hecho antes (IIa para pediocinas, IIb para péptidos dobles, IIc para circulares y IId para lineales sin péptido líder) (21, 25, 56). En otros casos se vuelve a establecer la existencia de una clase IV o V para las bacteriocinas circulares (17), mientras que otros prefieren no complicar un tema tan discutido con respecto a la clasificación (40). En esta memoria se utilizó la clasificación que se presentan en trabajos más actuales, ya que se considera más simple de explicar. Cabe destacar que la clasificación de estos péptidos aún no se define del todo y es posible que en algunos años se vuelva a modificar o que otros trabajos presenten una clasificación diferente.

Tabla 3. Clasificación de las bacteriocinas producidas por BAL

Creada por B.O. 2020

Clasificación	Características	Categorías	Mecanismo de acción	Ejemplos
Clase I	Péptidos pequeños (< 5 kDa) con aminoácidos inusuales con residuos como lantionina (6)	Clase A (péptidos lineales) Clase B (péptidos globulares) (20, 26)	Formación de poro en la membrana con lípido II (27, 29)	Nistatina Mersacidina
Clase II	Péptidos pequeños (< 10 kDa) y termoestables (33)	Clase IIa (caja pediocina) (22) Clase IIb (2 péptidos) (3) Clase IIc (circulares) (3, 23, 34) Clase IId (grupo heterogéneo, sin péptido líder) (22, 45)	Interacción con manosa de membrana mediante Man-PTS (22)	Pediocina PA-1 Lactococcina G Enterocina AS-48 Enterocina L50
Clase III	Péptidos de alto peso molecular (> 30 kDa) y no termoestables (19)	Clase A (bacteriolíticas) (19) Clase B (no líticas) (19)	-Hidrólisis de uniones en el peptidoglicán (19, 22) Unión con manosa de membrana mediante Man-PTS (22, 51)	Enterolisina A Caseicina 80

2. Efecto de bacteriocinas sobre cepas bacterianas multirresistentes

2.1. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Staphylococcus aureus es una cocácea Gram positivo con un importante rol en la producción de enfermedad en ambientes intrahospitalarios y nosocomiales, principalmente con infecciones a la piel y tejidos blandos, bacteriemias, osteomielitis y endocarditis, tanto en adultos como en niños (57). Además, se ha descrito como la primera causa de bacteriemia nosocomial en Norteamérica y Latinoamérica (58).

Con el descubrimiento de la penicilina se abrió una puerta para el tratamiento de esta bacteria, y en la década de los 40 se empezó a usar como método de tratamiento estándar. Sin embargo, aparecieron rápidamente cepas resistentes a penicilina gracias a la penicilinasas (57). En los años 60 se descubrió la meticilina como alternativa de tratamiento al ser resistente a penicilinasas, pero a final de la década aparecieron las primeras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina denominadas SARM o MRSA, por lo que se buscaron nuevas alternativas al tratamiento, entre las cuales surgió la vancomicina y otros antibióticos (59).

El SARM posee el gen *mecA* que codifica para una proteína fijadora de penicilina (PBP 2a) con baja afinidad por los antibióticos betalactámicos y sus asociaciones con inhibidores de betalactamasas (60). Este gen está ubicado en un cassette cromosómico (SCC) y produce una proteína homóloga al PBP2 del peptidoglicán, por lo tanto puede inhibir su formación (61).

2.1.1. Epidemiología

En el período de 1997 – 1999, Estados Unidos reportó fallecimientos de niños por cepas de SARM adquiridos en la comunidad. Este fue el inicio para la diseminación de la bacteria. Reportándose en 2005 el primer caso en Sudamérica y en 2008 el primer caso en Chile (62).

Actualmente, SARM tiene importancia en la clínica por su incidencia en unidades de cuidados intensivos (UCI) y su amplia distribución en ambientes hospitalarios. Se ha reportado en Chile presencia de SARM con una alta incidencia de 3,85 x 1.000 pacientes – día en UCI de adulto, más que en la de niños, ocupando el segundo lugar en incidencia (63).

En países como México se reporta una mortalidad del 5 – 70% por SARM. En Guadalajara se observó un incremento de estas cepas resistentes a meticilina con un 24,1% (64). En Perú se reporta un 8,2% de aislamientos de esta cepa (65). En un hospital de Etiopía buscando patrones de resistencia de infecciones nosocomiales se encontró un 67,5% de *Staphylococcus aureus* resistentes a cefoxitina (funciona como análogo de meticilina para determinar SARM) (66).

En el último boletín del Instituto de Salud Pública (ISP) acerca de la vigilancia de SARM adquirido en la comunidad para los años 2012 – 2016, el 90,2% (973 de 1.079) de las cepas recibidas resultaron positivas para SARM. Se muestra un aumento progresivo entre el año 2012 al 2016 siendo este último el más alto con 318 cepas confirmadas. Además el 50,3% de estas cepas fueron aisladas de heridas, el 30,8% de abscesos y el 12,2% de hisopado nasofaríngeo (67).

2.1.2. Efecto de bacteriocinas

Para determinar el efecto de bacteriocinas sobre SARM se aislaron 8 bacterias del suelo de las cuales sólo 1 mostró actividad antagónica contra la bacteria, la bacteriocina producida por esta bacteria fue denominada TA6. La bacteriocina TA6 tiene un peso molecular de 10 kDa y fue incluida en la clase III de bacteriocinas ya que no es resistente a temperaturas altas. Basándose en pruebas bioquímicas y morfológicas se caracterizó a la bacteria productora como *Pseudomonas aeruginosa* (68).

Para el crecimiento de la bacteria y la producción de la bacteriocina se evaluaron las condiciones óptimas de temperatura y pH, la actividad máxima de la bacteriocina fue a pH 7 con una temperatura de 60°C. La bacteriocina perdió su actividad al ser tratada con acetona, EDTA y butanol, demostró ser resistente a proteinasas, pronasa y tripsina. La actividad de esta bacteriocina se catalogó como bactericida ya que la densidad celular de *Staphylococcus aureus* disminuyó rápidamente gracias a la lisis celular (68).

Para evaluar el daño provocado a la cepa de *Staphylococcus aureus* se utilizó citometría de flujo, la entrada del yoduro de propidio como marcador fue facilitado, esto sugiere 2 mecanismos: ambas moléculas cooperan para formar más canales o canales más grandes, o la acumulación de daño en la membrana facilita la entrada. Incrementando el tiempo de duración de tratamiento, aumenta el número de células de *Staphylococcus aureus* lisadas, a las 3 horas hay un 60,5% de células lisadas y a las 6 horas hay un 66,5% de células lisadas. Al utilizar una concentración de 50 AU/mL la densidad empezó a disminuir considerablemente, con la máxima concentración producida por la bacteria (100 AU/mL) eventualmente ocurrió la lisis celular (68). En un estudio de inhibición de biofilm de

Staphylococcus aureus utilizando TA6 demostró que el usar 10 µg/mL y 20 µg/mL disminuye la formación de biofilm a las 48 horas (69).

La bacteriocina BAC-IB17 de *Bacillus subtilis* KIBGE-IB17 podría ser catalogada como una bacteriocina de la antigua clase IV ya que es termoestable y contiene un residuo glucosídico que es responsable de su actividad con un peso estimado de 10,7 kDa (70). Este tipo de bacteriocina tiene la característica de estar contenida en plásmidos, principalmente con una codificación similar al grupo de genes de colicinas, esto es importante ya que al ser transmitida como plásmidos entre las bacterias, las que no producen bacteriocinas pueden llegar a hacerlo (71). Esta exhibe actividad bactericida contra SARM con concentraciones letales de 80 AU mL⁻¹ y se observa una completa reducción a las 8 horas. La bacteriocina BAC-IB17 demostró ser altamente termoestable ya que mantuvo el 100% de su actividad a 60°C por 3 horas, además sólo se mostró una disminución del 25% luego de 4 horas a 80°C. A un pH ácido (pH 5) no mostró rastros de actividad, sin embargo, mostró 60% de actividad a pH 6 alcanzando el 100% de actividad a pH 7 y siendo más estable a pH alcalino. Para evaluar su actividad en forma de concentración mínima inhibitoria (CMI) comparándola con antibióticos comerciales, mostró una CMI de 50 µg/mL⁻¹, siendo cercana a la CMI de cefepime (30 µg/mL⁻¹) para tratar SARM (70). Un estudio sobre la actividad de esta bacteriocina se demostró que los cofactores que ayudan a su estabilización son los metales como calcio, cobre, manganeso, bario, entre otros. Mientras que inhiben por completo su actividad el cobalto y el mercurio (72).

Se estudió el efecto de las bacteriocinas nisina A, nukacina ISK – 1 y lacticina Q para tratar biofilm de SARM y células planctónicas, estas células están presentes en el biofilm sin adherirse a la superficie, es decir, se encuentran libres. La nisina A, producida por *Lactococcus lactis*, corresponde a la clase Ia de las bacteriocinas BAL, mientras que la nukacina ISK-1, producida por *Staphylococcus warneri*, pertenece a la clase Ib. Por otra parte, la lacticina Q, producida por *Lactococcus lactis*, pertenece a la clase IId. A diferencia

de la nisina A, la nukacina ISK-1 tiene un efecto bacteriostático al impedir la síntesis del peptidoglicán, pero no forma poros en la membrana (73). Además se ha determinado que la nukacina ISK-1 presenta 2 formas en solución, una forma A (a altas temperaturas) y una forma B (a bajas temperaturas), aunque sólo la forma A es capaz de unirse al lípido II (74). La lacticina Q forma un poro en la membrana de forma no específica (sin receptor) causando la fuga de componentes celulares e inestabilidad de la membrana, exhibiendo su capacidad bactericida (73, 75).

En el estudio de células planctónicas, se obtuvieron células de SARM a una densidad óptica establecida (0.05 a 595 nm) en el medio BHI, al utilizar nisina A con lacticina Q se mostró una lisis completa de las bacterias, en 1 hora para nisina A y en 4 horas para lacticina Q con una concentración de 10 μ M y 20 μ M, respectivamente. Por su parte, la nukacina ISK-1 con su actividad bacteriostática tuvo un efecto mucho menor al de las otras bacteriocinas (73).

Para el estudio sobre el biofilm, las células se incubaron junto con las bacteriocinas por 1 y 24 horas. En la primera hora la nisina A y lacticina Q mostraron actividad bactericida, pero a diferencia de las células planctónicas no se logró la completa erradicación del biofilm. En cambio, a las 24 horas de incubación, la nisina A mostró una actividad 10 veces mayor que la lacticina Q. La nukacina ISK-1 que mostró actividad bacteriostática contra las células planctónicas, no mostró actividad con las células del biofilm (73).

Luego de este tratamiento se utilizó microscopía de fluorescencia con un kit de viabilidad de biofilm, concordando con lo obtenido en los cultivos, nisina A y lacticina Q mostraron su efecto bactericida con una cantidad de bacterias muertas en todo el biofilm. Esto es de gran importancia ya que demuestra la capacidad de penetración de estas bacteriocinas en el

biofilm, si no hubieran penetrado a la parte más profunda del biofilm se habrían observado bacterias muertas sólo en la parte superior de este. La nukacina ISK-1 como fue demostrado en el cultivo, no mostró efectos en la viabilidad de las células del biofilm (73).

La diferencia de acción entre nisina y lacticina Q se atribuye principalmente a la estructura y mecanismo de acción de cada bacteriocina, la nisina A utiliza el lípido II de la membrana bacteriana para la formación del poro, mientras que la lacticina Q no tiene un receptor específico para formar el poro. Dado que el ambiente en el biofilm presenta diferentes macromoléculas, puentes catiónicos y uniones débiles, podría entorpecer la actividad de la lacticina Q, pero no así la de la nisina A que es más específica (73).

Estudiando el efecto de la nisina combinada con oxacilina para el tratamiento de SARM se obtuvo una CMI de 312,5 $\mu\text{g/mL}$ y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Se demostró un efecto sinérgico antibacteriano entre ambas usando sólo $\frac{1}{4}$ de su CMI, esto parece ser más efectivo que usar una sola dosis antimicrobiana en la práctica clínica (76).

Al utilizar lacticina 3147 (también de clase I) para el tratamiento de SARM en conjunto con vancomicina se puede reducir la concentración del antibiótico de 1,81 $\mu\text{g/mL}$ a 0,91 $\mu\text{g/mL}$ utilizando una concentración de lacticina 3147 de 3,85 $\mu\text{g/mL}$ que corresponde a la CMI contra esta bacteria. Se evaluó también para nisina Z donde la CMI fue de 4,17 $\mu\text{g/mL}$ para SARM y al utilizar 1 $\mu\text{g/mL}$ de nisina Z con 32 $\mu\text{g/mL}$ de meticilina se redujo el número de bacterias (77).

Las enterocinas DD28 y DD93 producidas por *Enterococcus faecalis* 28 y *Enterococcus faecalis* 93 son bacteriocinas de la clase IIb y fueron probadas para inhibir cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y SARM. Se aislaron cultivando las cepas de *E. faecalis* 28 y 93 a 37°C por 16 – 18 horas en medio MRS, la purificación de las bacteriocinas se realizó a temperatura ambiente y a pH 6,3 mediante sobrenadante libre de células y se probó su acción contra las 3 cepas de *Staphylococcus* mostrando una CMI de 100 µg/mL para los 2 primeros, mientras que la CMI fue el doble para la cepa SARM (200 µg/mL) (78).

Se estudió la resistencia que presenta la cepa de SARM obteniéndose como resultado ser resistente a eritromicina y kanamicina, por esta razón se evaluó el efecto de ambos antibióticos combinados con las enterocinas. Las concentraciones usadas fueron de 50 µg/mL para las enterocinas, 1 µg/mL de eritromicina y 4 µg/mL de kanamicina. Se demostró una sinergia y disminución de la CMI requerida para eliminar células de biofilm, se utilizó un kit de viabilidad con microscopía de fluorescencia, tanto para la eritromicina como para la kanamicina. Se confirmó el resultado con un ensayo de crecimiento en agar soya tripticosa incubando las combinaciones de enterocinas con antibióticos (eritromicina y kanamicina) y por separado. La combinación de ambas sustancias mostró una destrucción del 99% de las bacterias cultivadas durante el periodo de 3 – 24 horas (78).

Staphylococcus epidermidis ha demostrado tener actividad selectiva contra cepas de *S. aureus* y SARM. *S. aureus* causa principalmente afecciones en la piel y *S. epidermidis* es una de las competencias que tiene en ese ambiente, las bacteriocinas citoplasmáticas producidas por esta bacteria son específicas contra *S. aureus* y SARM y no afectan a otras bacterias como *E. coli*, *S. typhimurium* y el mismo *S. epidermidis* (79).

Se evaluó a *S. epidermidis* ATCC12228 en estado planctónico (libre) mediante difusión en agar, esta bacteria no es virulenta, no produce biofilm y no está asociada a infección. Lo interesante de esta bacteria es que su actividad antimicrobiana se da sólo en estado planctónico, no en sobrenadante libre de células o en precipitado de estas proteínas. Por lo tanto se supone que su bacteriocina es producida en el citoplasma, pero no es exportada (79).

El halo de inhibición en difusión en agar fue mayor en pH 5 – 6, más que a 7.4, esto se debe a que el pH de la piel humana varía en un rango de 5 – 6. Esto se realizó con pozos de 6 mm de diámetro con las células planctónicas, proteínas precipitadas y el sobrenadante libre de células. Además, se mantuvo estable a 45°C por 20 minutos, pero perdió su actividad a 100°C por 20 minutos (79).

La CMI fue de 250 µg/mL con un peso de la bacteriocina entre 40 – 70 kDa. Esto se realizó con diluciones de la bacteriocina citoplasmática a concentraciones de 2 mg, 1 mg, 500 µg, 250 µg y 125 µg en pozos de 6 mm y luego se incubaron a 37°C por la noche. En base a estas características se clasifica como clase I de lantibióticos. Aunque se ha reportado también como de clases I y II selectivas para *S. aureus* y SARM (79). En la tabla 4 se presenta el resumen de las bacteriocinas investigadas contra SARM.

Tabla 4. Resumen de las bacteriocinas activas contra SARM.

Creado por B.O. 2020

Bacteriocina	Cepa productora	Clasificación	Temperatura óptima	pH óptimo	Concentración mínima para producir daño
TA6 (68)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clase III (10 kDa) (68)	60°C (68)	7 (68)	50 AU/mL (68)
BAC-IB17 (70, 71, 72)	<i>Bacillus subtilis</i>	Clase IV (10 kDa) (70)	60°C (70)	7 (70)	50 µg/mL (70)
Nisina A (73)	<i>Lactococcus lactis</i>	Clase Ia (<5 kDa) (73)	30 – 37°C (80)	5,5-6,5 (80)	10 µM (73)
Lacticina Q (73)	<i>Lactococcus lactis</i>	Clase IId (5,92 kDa) (81)	100°C (81)	2 – 10 (81)	20 µM (73)
Enterocina DD28 (78)	<i>Enterococcus faecalis</i>	Clase IIb (5,20 kDa) (78)	37°C (78)	6,3 (78)	200 µg/mL (78)
Enterocina DD93 (78)	<i>Enterococcus faecium</i>	Clase IIb (5,20 kDa) (78)	37°C (78)	6,3 (78)	200 µg/mL (78)
Sin nombre por el momento (79)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Clase I (40 – 70 kDa) (79)	45°C (79)	5 – 6 (79)	250 µg/mL (79)

2.2. *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina

Enterococcus es un género bacteriano compuesto por más de 30 especies, siendo las más comunes *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, del tipo cocáceas Gram positivo, estos son patógenos oportunistas y reconocidos por producir enfermedades nosocomiales entre las que destacan, bacteriemia, endocarditis, infecciones del tracto urinario (ITU), de heridas quirúrgicas, intra abdominales y pélvicas (82). Son reconocidos por su resistencia intrínseca a penicilina, ampicilina, cefalosporinas, cotrimoxazol y aminoglicósidos de bajo nivel. Además, se destaca su resistencia adquirida por plásmidos o mutaciones a aminoglicósidos de alto nivel, macrólidos y glucopéptidos como vancomicina y teicoplanina (82, 83, 84).

Desde su primer uso en 1958, la vancomicina fue administrada para tratar infecciones por bacterias Gram positivo, lo que llevó a aislar en 1988, en Inglaterra, las primeras cepas de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV) correspondientes a las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (82) siendo *E. faecium* la especie de ERV más aislada (85). El mayor reservorio de ERV en humanos es el tracto gastrointestinal y su presencia en las superficies ambientales permite su diseminación intrahospitalaria más fácilmente (86, 87).

Los ERV se caracterizan por impedir la acción de la vancomicina, cuyo efecto se basa en unirse a los precursores del peptidoglicán y evitar así su síntesis, mediante sustituciones en la síntesis de peptidoglicán para eliminar el blanco del antibiótico. Estas sustituciones son posibles gracias a los genes de resistencia *van*, de los cuales se han descrito *vanA*, -B, -C, -D, -E, -G, -L, -M y -N (83, 88). De estos son importantes *van A* y *van B* que viajan en plásmidos, pero el gen *van A* es el que requiere mayor seguimiento y control por ser más común (89).

Los más frecuentes en la clínica son *van A*, *van B* y *van C*, los dos primeros genes tienen expresión fenotípica inducible y se han encontrado en plásmidos y de manera cromosómica, mientras que *vanC* no se encuentra en plásmidos. La diferencia radica en que *vanA* presenta resistencia alta para vancomicina y teicoplanina, *vanB* tiene una alta pero variable resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina, y *vanC* presenta una baja resistencia a vancomicina y sensibilidad a teicoplanina (83, 90).

2.2.1. Epidemiología

La última vigilancia de *Enterococcus spp.* resistente a vancomicina del ISP para los años 2010 – 2012 mostró como resultado que de las 2.591 cepas enviadas para confirmación de resistencia, 2.336 (90,2%) fueron positivas. Además, en el 2012 se alcanzó la mayor sospecha y confirmación de esta resistencia, lo cual se atribuye a la mejor preparación de los profesionales para identificarlas (91).

Dentro de las cepas de ERV, la especie más común fue *E. faecium* (99%), el 1% restante corresponde a 24 cepas de las especies *E. gallinarum* (9 cepas), *E. faecalis* (8 cepas), *E. casseliflavus* (6 cepas) y *E. raffinosus* (1 cepa). Finalmente, en cuanto a los genes identificados en el total de cepas de ERV confirmadas se encontró *vanA* (73,2%), *vanB* (26,2%) y *vanC* (0,6%) (91).

Un estudio en Paraguay evaluó la presencia de ERV en un Servicio de Cuidados Intensivos de adultos con 22 muestras, donde el 54,5% correspondían a ERV, se destaca que los afectados eran hombres mayores a 20 años con alguna patología quirúrgica (92). Por otra parte, un estudio en Argentina sobre el efluente hospitalario demostró la presencia de ERV en mayor concentración que las aguas municipales residuales, siendo la especie *E. faecium* la más común (93).

Un estudio nacional en Suiza comparando datos entre 2015 – 2018 obtuvo como resultado un aumento de 96 casos de ERV en el 2015 a 146 en el 2018, lo que se traduce en aumento de 0,26 casos/día a 1,58 casos/día. En cuanto a los genes de resistencia encontrados, corresponden a *vanA* y *vanB* (94).

En relación a Alemania se utilizó la base de datos de vigilancia entre el 2012 – 2017 para el estudio de prevalencia de ERV, se obtuvo como resultado la presencia de *E. faecium* en 33.643 pacientes de 35.906. La presencia de ERV disminuyó de 15,2% a 11,2% en el período 2012 – 2014. Sin embargo, a partir de este último año se ha mostrado un incremento continuo de ERV en *E. faecium* llegando a un 26,1% (95).

2.2.2. Efecto de bacteriocinas

La enterocina A es una bacteriocina de clase IIa producida por *Enterococcus faecium* que de por sí presenta actividad contra cepas de *Enterococcus*, *Listeria* y *Pediococcus*. Se modificaron sitios en el gen *entA*, el cual codifica para la enterocina A, para generar mutantes y evaluar su actividad contra cepas de *Enterococcus*. Los sitios a modificar fueron A24 y T27 ya que están implicados en la selectividad de la bacteriocina y además son sitios conservados. Luego de un análisis de las posibles combinaciones para sustituir en A24 y T27, 3 mutantes mostraron la mayor actividad inhibitoria siendo A24G, A24P y T27G. Estas fueron aisladas en cultivos luego de una noche, y la producción de bacteriocina fue obtenida en cultivos líquidos luego de 8 horas post inoculación, el sobrenadante se centrifugó y procesó para dejarlo guardado a -20°C hasta su uso (96).

La actividad de estas mutantes se evaluó en caldo BHI suplementado con 0,8% de agar y concentraciones diferentes de *E. faecalis* (0,5 µL/mL) y *E. faecium* (0,75 µL/mL), cuando el agar solidificó se colocaron diferentes colonias de *Lactococcus lactis* que expresaba *lacZ* como control, *entA*, A24G, A24P y T27G. Luego de la incubación durante la noche a 37°C se midió el halo de inhibición restándole el tamaño de la colonia. Para la prueba de susceptibilidad se utilizó el sobrenadante que contenía *entA* al 10% (90% de medio BHI con 100 mg/L de ampicilina y el patógeno junto a 10% del sobrenadante *entA*) (96).

De las 3 mutantes, A24P y T27G mostraron mayor actividad inhibitoria en comparación a *entA* de tipo salvaje, tanto en el ensayo con agar como en el ensayo líquido para viabilidad, para las cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*. Por otra parte, A24G mostró inhibición pero en menor grado comparado con las otras 2, por lo que no se estudió para viabilidad (96).

Para el estudio de viabilidad se estudió la disminución de la densidad celular que puede estar dada por muerte celular o reducción en nivel de crecimiento de la bacteria. La viabilidad de *E. faecium* utilizando entA disminuyó a 5,4%. Usando las mutantes A24P y T27G la viabilidad disminuyó a 0,4% y a 0,31%, respectivamente. Se pensó que una mutante que tuviera ambas mutaciones mejoraría su desempeño en la inhibición, pero no mostró cambios significativos en comparación a las mutaciones por separado (96).

Se evaluó la actividad inhibidora de diferentes bacterias recolectadas contra *E. faecalis* y *E. faecium*, teniéndose a la cepa *E. faecalis* 478 con la mejor actividad produciendo la bacteriocina denominada EF478. Al ser probada contra otras bacteriocinas como EF344, EF349 y EF355 en inhibición de ERV, la EF478 inhibió el 41,4% de las cepas utilizadas (28 de 68 cepas) (97).

En la caracterización de EF478 demostró ser degradada por proteinasa K, tripsina y quimotripsina, sin embargo, mantuvo su actividad en presencia de lipasa y amilasa. En la prueba de pH demostró su máxima actividad a pH 5 – 6. En cuanto a la temperatura óptima, mantuvo su actividad luego de 1 hora a 60°C, pero empezó a disminuir a 80°C y 100°C llegando a 50% y 12,5% de actividad, respectivamente. La medición en SDS-PAGE determinó que pesa 45 kDa. Al ser una bacteriocina nueva y no estar reportada, gracias a la caracterización se llegó a la conclusión de que es una bacteriocina posiblemente LAB ya que presenta actividad a bajo pH siendo interesante su estabilidad térmica a largo plazo (97).

Se determinó que la bacteriocina EF478 presenta 2 dominios conservados, un dominio N-terminal que actúa como hidrolasa de peptidoglicán (CWIO1) y un dominio CAP. CWIO1 es un dominio de autolisinas con hidrolasas que actúan en el peptidoglicán de bacterias Gram positivo y son denominadas lisozimas. El dominio CAP participa principalmente en defensa

del huésped y supresión de tumores. Esto sugiere que la actividad bactericida de EF478 depende del dominio CWIO1 mientras que el dominio CAP participa en la protección de la célula productora (97).

Se evaluó el efecto de la nisina junto a antibióticos convencionales para tratar ERV y determinar si puede ser usada como parte del tratamiento. Se recolectaron 80 cepas de Enterococo que provenían de orina (38/80, 47,5%), de sangre (28/80, 35%) y de heridas (14/80, 17,5%). Luego de la identificación, se obtuvo como más frecuente a *E. faecalis* (45/80, 56,2%), *E. faecium* (31/80, 38,8%) y otras especies (4/80, 5%) (98).

De estos aislados, 23 (28,8%) mostraron resistencia a vancomicina utilizando E test (6 ERV *faecalis* y 17 ERV *faecium*). Se evaluó el fenotipo Van presente en las cepas utilizando teicoplanina, *VanB* fue más frecuente que *VanA* (18 muestras (78,3%) contra 5 muestras (21,7%), respectivamente (98).

Para determinar esta acción se utilizó la técnica de dilución en micro placa para determinar el MIC y el MBC, para el MIC se prepararon suspensiones bacterianas de ERV ajustadas a 10^6 CFU/mL con los antibióticos en un radio 1:1 y se incubaron las placas por 24 horas a 37°. La menor concentración de antibiótico en la que se inhibe el crecimiento de bacterias se consideró como MIC (98).

Para establecer el MBC se tomó una suspensión de bacterias de la misma placa donde fue evaluado el MIC (10 µL) y se incubó en placas de agar Mueller Hilton por 24 horas a 37° y las colonias de bacterias se contaron. La menor concentración de antibiótico en la que más del 99,9% de las bacterias son destruidas se consideró como MIC (98).

La solución de nisina utilizada (200 U/mL) se añadió a cada placa para estimar de igual manera el MIC y el MBC. Se consideró un MIC de < o igual a 4 µg/mL como sensible, entre 8 – 16 µg/mL como intermedio, > o igual a 32 – 128 µg/mL como resistente y > o igual a 256 µg/mL como extremadamente resistente. Los antibióticos usados para el estudio fueron ampicilina, vancomicina, gentamicina, ciprofloxacino, imipenem, cefuroxima, cloranfenicol, linezolid, cefazolina y cefepime (98).

Se obtuvo como resultado una considerable mejora al añadir la nisina, tanto en el MIC como en el MBC, para los 23 aislados de ERV los valores de vancomicina para MIC fueron < o igual a 8 µg/mL. Los antibióticos como ciprofloxacino, imipenem y linezolid también estuvieron en el rango de sensibilidad luego de añadir la nisina (< o igual a 4 µg/mL). Para la MBC todos los antibióticos utilizados en las 23 cepas aisladas mostraron menores valores (es decir, todas las cepas fueron destruidas al añadir la nisina) (98).

A pesar de la evaluación de MBC luego de la nisina, todas las cepas aisladas mostraron valores > 256 µg/mL para 1 – 5 antibióticos antes de usarla. Esto indica y comprueba que *Enterococo* es uno de los patógenos más comunes que exhiben una resistencia antimicrobiana que hace difícil el destruirlos. El efecto de la nisina mejora la actividad bactericida de los antibióticos al formar poros en la membrana utilizando el lípido II y permitiendo así la entrada del antibiótico (98).

Otro estudio similar utilizando nisina Z y lacticina 3147, producidas por *Lactococcus lactis*, mostró una disminución en la concentración de vancomicina usada para eliminar las cepas de *E. faecium*. Aunque las cepas utilizadas no eran resistentes a vancomicina, se estipula que este hallazgo es significativo ya que se puede causar toxicidad en el organismo al utilizar altas dosis de antibióticos para tratar Enterococo (99).

Al evaluar la actividad de la nisina P producida por *Streptococcus gallolyticus* se mostró un efecto en ERV, así como en otras bacterias resistentes a antibióticos como MRSA y *Streptococcus spp.* A pesar de esto, la nisina P no es considerada la variante de nisina más efectiva, principalmente porque la nisina A y nisina Z muestran efecto contra más bacterias Gram positivo y presentan actividad contra células cancerígenas (100).

La enterocina K1 es una bacteriocina producida por *Enterococcus faecium* que pertenece a la familia LsbB, esta familia cuenta con 4 miembros conocidos: LsbB, EntK1, EntQ y EntEJ97. Todos los miembros no cuentan con péptido líder y no están modificadas, por lo tanto se clasifican como bacteriocinas de clase IId de tipo LAB (101).

Se evaluó la actividad de las bacteriocinas LsbB, EntK1 y EntEJ97, EntQ no fue evaluada debido a que los péptidos sintéticos de esta bacteriocina presentan baja actividad, contra diversos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *faecium* (este último también provenía de ambientes hospitalarios, por lo que se incluyen cepas de tipo ERV) y *hirae*, *Lactococcus garvieae* y *lactis*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (101).

Se estudiaron los patógenos cultivando las cepas en caldo BHI a 30°C, las bacteriocinas fueron sintetizadas al 98 – 99% de pureza y solubilizadas a concentraciones de 10.0 – 0.1 mg/mL en 0,1% de ácido trifluoroacético y mantenidas a -20°C hasta su uso. El MIC se determinó como la mínima concentración de bacteriocina que inhibe el crecimiento por al menos 50% en 200 µL de cultivo (101).

Los resultados obtenidos indican que LsbB sólo fue activa contra *Lactococcus lactis*. EntK1 fue activa principalmente contra *E. faecium* y *E. hirae* y algunas cepas de *Lactococcus*. EntEJ97 mostró el mayor espectro de actividad, inhibiendo *E. faecium* y *E. faecalis* (MIC de 145 – 295), *L. lactis*, *S. aureus*, *L. garvieae* y *L. monocytogenes*. Se destaca que EntK1 presentó los valores más bajos de MIC (más potente), especialmente contra *E. faecium* y *E. hirae* (10 – 85), pero fue prácticamente inactiva contra *E. faecalis* (2.700 – >5.500) (101).

La diferencia de MIC para EntK1 y EntEJ97 se atribuye a que son producidas por *E. faecium* y *E. faecalis*, respectivamente. EntEJ97 es activa de igual manera contra ambas cepas, mientras que EntK1 sólo lo es contra *E. faecium*. La diferencia se observa debido a que son más activas contra especies relacionadas cercanamente a la especie productora como forma de mantener un equilibrio ecológico, es decir, darle a la especie productora una ventaja en la competencia por los nutrientes. Se concluye que tanto EntK1 como EntEJ97 pueden ser usadas para el tratamiento de Enterococos resistentes a antibióticos, incluyendo ERV (101).

Se aisló de leche humana la especie *Enterococcus hirae* HM02-04 donde se estudió su efecto sobre ERV debido a su bacteriocina. La bacteriocina se identificó como hiracina HM02-04, esta bacteriocina fue considerada como nueva, ya que no presenta homología aminoacídica en las regiones conservadas como otras bacteriocinas de tipo enterocina

producidas por *Enterococcus* (enterocina CRL35, enterocina A, bacteriocina 31 y SE-K4, hiracina JM79, entre otras) (102).

Presentó sensibilidad a 4 enzimas proteolíticas (actinasa, pepsina, proteasa K y tripsina), excepto amilasa y lipasa, lo que refuerza su composición proteica y que el sitio de inhibición no presenta lípidos ni carbohidratos. Su estabilidad a la temperatura fue de 80 – 100 °C por 30 minutos y a 121 °C por 15 minutos. Se demostró su estabilidad al pH entre 3 – 9. En ambos casos mantuvo cerca del 100% de actividad. El peso de la bacteriocina fue de 2,605 kDa, por lo tanto puede clasificarse como tipo I o tipo II. Sin embargo, por diversas razones no se puede colocar en la categoría II, principalmente porque no exhibió actividad contra *Listeria* (característica de las IIa) y no presenta 2 péptidos que provoquen su acción (característica de las IIb). Aun así se ha dejado sin clasificación hasta realizar más estudios (102).

Las cepas en estudio se cultivaron en agar MRS por 18 horas a 37 °C (estas incluían *Staphylococcus aureus*, ERV, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*), para determinar la actividad de la bacteriocina se colocaron 10 µL de la cepa indicadora en 6 mL de agar suave 0,7% y fue superpuesto en una placa con agar 1,5%. 10 µL de la solución de bacteriocina (obtenida de sobrenadante libre de células) fue puesta sobre el agar e incubada por 18 horas a 37°C (102).

Para evaluar el mecanismo de acción de la bacteriocina, se colocaron 2,17 µg (correspondientes a 20 AU/mL) de bacteriocina en el cultivo de ERV luego de 8 horas de incubación. La densidad celular y viabilidad de las células se determinaron cada 2 horas por 24 horas utilizando un espectrofotómetro a 600 nm (102).

Como resultado se obtuvo una actividad de 800 AU/mL (dada por la densidad óptica a 600 nm y la concentración de células viables) para ERV, mientras que para *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* fue de 3200 AU/mL y 200 AU/mL, respectivamente. No mostró actividad en *Listeria*, *Staphylococcus aureus* ni en bacterias Gram negativo. En cuanto al mecanismo de acción, al agregar 20 AU/mL luego de las 8 horas de incubación se mostró una baja considerable en la viabilidad celular pasando de 9.9×10^4 a 2.0×10^4 con una eficiencia de 99,8 +/- 0.034% a las 10 horas. Finalmente, a las 24 horas, se obtuvo una eficiencia del 99,89% dejando una viabilidad celular de $1,4 \times 10^4$ CFU/mL lo que sugiere una actividad bactericida con lisis celular (102).

Se concluye que la hiracina HM02-04 exhibe una acción bactericida contra ERV, similar a lacticina 3147 y pumilicina 4. Sin embargo, estas bacteriocinas requirieron altas concentraciones (80 AU/mL y 20.000 AU/mL, respectivamente) para tener efecto sobre ERV, mientras que la hiracina HM02-04 sólo requirió de 20 AU/mL para provocar un cambio significativo a las 2 horas (102). En la tabla 5 se presenta el resumen de las bacteriocinas investigadas contra ERV.

Tabla 5. Resumen de las bacteriocinas activas contra ERV

Creada por B.O. 2020

Bacteriocina	Cepa productora	Clasificación	Temperatura óptima	pH óptimo	Concentración mínima para producir daño
Enterocina A (96)	<i>Enterococcus faecium</i>	IIa (<10 kDa) (96)	20 – 45°C (103)	5,7 – 8 (103)	10% (90% BHI y 10% sobrenadante EntA) (96)
EF478 (97)	<i>Enterococcus faecalis</i>	No descrita (45 kDa) (97)	60 °C (97)	5 – 6 (97)	320 AU/mL (97)
Nisina (98)	<i>Lactococcus lactis</i>	Ia (<5 kDa) (73)	30 – 37°C (80)	5,5-6,5 (80)	200 µg/mL (98)
Enterocina K1 (101)	<i>Enterococcus faecium</i>	IIId (<10 kDa) (101)	30 °C (101)	3 – 6 (104)	10 – 45 nM (101)
Hiracina HM02-04 (102)	<i>Enterococcus hirae</i>	I ó II (2,6 kDa) (102)	80 – 100°C (102)	3 – 9 (21)	20 AU/mL (102)

2.3. *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos y a betalactámicos

Con el uso de los carbapenémicos para el control de los microorganismos, se han incrementado drásticamente las cepas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE). El principal mecanismo de esta resistencia es la producción de carbapenemasas, siendo KPC y NDM las más prevalentes en la clínica perteneciendo a *Klebsiella pneumoniae* y a *Escherichia coli*, respectivamente (105). Las especies principales que portan carbapenemasas son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter spp.* (106).

Las carbapenemasas son un tipo de betalactamasas que confieren resistencia contra los carbapenémicos, estas se pueden dividir en cuatro clases: A, B, C y D. Las de tipo A, C y D son denominadas serino o serino carbapenemasas y son comparables a betalactamasas de espectro extendido (BLEE), por lo tanto afectan tanto a carbapenémicos como a los betalactámicos. Mientras que las de tipo B son denominadas metalo carbapenemasas (107). De la clase C (AmpC) no son capaces de hidrolizar carbapenémicos, aunque puede elevarse la CMI si hay una hiperproducción de esta enzima (108).

De las serino carbapenemasas, destaca la clase A con la enzima KPC que ha tenido una diseminación más rápida en los últimos años a nivel intrahospitalario. Esta enzima plasmidial de *Klebsiella pneumoniae* también se puede encontrar en otras enterobacterias como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, entre otras (107), esta ha demostrado alta resistencia a carbapenémicos y a betalactámicos donde se incluyen cefalosporinas de amplio espectro (108). También se destacan las de clase D con las enzimas OXA de las cuales existe una gran variedad (107), la OXA-48 es la que presenta mayor actividad de carbapenemasa que el resto de las OXA y fue aislada primeramente en

K. pneumoniae en Turquía (109), también se ha aislado principalmente en *Acinetobacter spp.* así como en otras enterobacterias (108).

En las enterobacterias igualmente se han detectado carbapenemasas de tipo B como IMP, VIM, NDM y SPM, con identificación ocasional (107). Estas se caracterizan por hidrolizar carbapenémicos y resistir inhibidores de betalactamasas (108) por lo que hidrolizan todos los betalactámicos, con excepción del aztreonam (109).

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo que se caracteriza por tener una numerosa cantidad de cepas y con una virulencia marcada. Se asocia principalmente a gastroenteritis infantil en países en vías de desarrollo, esta bacteria presenta un patotipo O157:H7 que causa diarrea sanguinolenta y se identifica a nivel de laboratorio por su implicancia en el organismo (110). Las infecciones gastrointestinales son las más comunes producidas por *E. coli* y se pueden clasificar en 6 patotipos (111).

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son también un problema clínico y comunitario al ser una Infección asociada a la atención en salud (IAAS), principalmente en mujeres fértiles que además tienen una vida sexual activa, presentan diabetes o han tenido una ITU previa. *E. coli* destaca en esta infección ya que es uno de los principales agentes (23%) junto con *Klebsiella spp.* (24%) y otras enterobacterias (112).

2.3.1. Epidemiología

De acuerdo a los datos del ISP de los años 2014 – 2017 (5.308 cepas totales recibidas), el número de cepas positivas para carbapenemasas aumentó de 15 a 225 entre esos años observándose principalmente en muestras de orina (50,4%, 2.673), respiratorias (14,7%, 778), secreciones y heridas (12,9%, 685), entre otras. Del total de cepas recibidas, el 9,2% (489) resultaron positivas para carbapenemasas, de estas, sólo 40 cepas corresponden a *E. coli* (8,2%), principalmente de hisopado rectal, orina y secreción. *E. coli* muestra un aumento en números absolutos en el período evaluado, con 3 cepas el 2014, 18 el 2016 y 19 el 2017. Al evaluar el tipo de carbapenemasa, el 76,6% pertenecía a KPC (375/489), siendo en *E. coli* un 4,9% (24/489), el 15,3% pertenecía a NDM (75/489), en *E. coli* un 2,9% (14/489) y el 7% correspondía a VIM (34/489) siendo en *E. coli* un 0,4% (2/489) (107).

En Venezuela se aisló la primera cepa de *E.coli* productora de carbapenemasa tipo NDM obtenida de 2 muestras clínicas, herida quirúrgica y cultivo de región sacra, sólo en una de ellas se observó en conjunto la producción de una BLEE (113). En un estudio en China, de las 11 cepas que estudiaron de *E.coli* resistente a carbapenémicos, las 11 presentan genes que codifican para carbapenemasa de tipo NDM, además, 10 de ellas codifican para una BLEE de tipo CTX-M y sólo 3 lo hacen para KPC (105).

En Colombia se aisló una cepa de *E.coli* productora de carbapenemasa de tipo NDM como complicación de una cirugía, además se destaca la aparición de estas cepas desde 2009 en Suecia y principalmente en Asia (114).

2.3.2. Efecto de bacteriocinas

Un estudio evaluó la actividad de *Lactobacillus parafarraginis* aislado de yogurt comercial, este mostró actividad antimicrobiana contra 14 organismos Gram negativo resistentes a diferentes drogas y con presencia de BLEE. Se obtuvieron 5 cepas para *E. coli* donde 4 de ellas (HUH05, HUH07, HUH12 y HUH14) exhibieron BLEE mostrando resistencia compartida a ampicilina, cefazolina, cefepime, cefotaxima, ceftriaxona, cefuroxima y manteniendo sensibilidad a carbapenémicos. La cepa HUH13 exhibió carbapenemasa al ser resistente a imipenem, meropenem y ertapenem (115).

Para evaluar la actividad antimicrobiana de *L. parafarraginis* se realizaron ensayos de tipo “spot” y de difusión en pozo. Para el ensayo “spot” se cultivó la cepa de *L. parafarraginis* en caldo MRS (especial para la recuperación de *Lactobacillus*), fue incubado en anaerobiosis y luego centrifugado, el sobrenadante fue decantado y sembrado en un pozo de 1 mm al centro de una placa de agar MRS e incubado. Las cepas a evaluar fueron cultivadas en caldo BHI y llevadas a 0,5 McFarland usando solución salina y luego fueron sembradas en la placa MRS para evaluar la zona de inhibición (115).

En el ensayo de difusión en pozo las bacterias se sembraron en agar soya tripticasa y luego se prepararon inóculos a 0,5 McFarland, se preparó un pozo de 5 mm el cual fue llenado con sobrenadante libre de células (CFS) de *L. parafarraginis*. Se sembró una placa de agar soya tripticasa con las bacterias y el disco se colocó en el centro, se dejó incubar 16-24 horas a 37°C para evaluar la zona de inhibición (115).

De acuerdo a los resultados, se logró una inhibición de las cepas con ambos métodos que mostraron una correlación. Para las cepas de BLEE la zona de inhibición del ensayo “spot” comprendía un rango de 23,3 – 27 mm, mientras que para el ensayo de difusión mostró un rango de 10 – 14 mm. Para la cepa de carbapenemasa el valor del ensayo “spot” fue de 29,3 mm y para difusión fue de 14 mm. La concentración mínima inhibitoria (MIC) de *L. parafarraginis* fue de 20 mg/mL, mientras que la concentración mínima bactericida (MBC) fue > 20 mg/mL (115).

Teniendo estos resultados se pensó en una bacteriocina como causante de esta inhibición, por lo que decidieron estudiar su producción, se encontraron 4 genes productores de bacteriocinas denominados, *sakT-β*, *sakT-α*, *plnc8A* y *acdT*. Se concluyó que es una bacteriocina estable al calor, acidófila y pesa alrededor de 75 kDa. Además mantuvo su actividad a los 121°C, algo típico en bacteriocinas pequeñas de la clase I (< 5 kDa) o clase II (> 10 kDa). Al ser evaluada con proteasas como pepsina, tripsina y proteinasa K no mostró disminución de actividad. Esto puede ser explicado con las bacteriocinas que poseen una conformación circular como la circularina A, microcina J25 y AS-48, donde la ausencia de digestión por proteasas no se debe a la ausencia de sitios para su unión, si no a su inaccesibilidad. Sin embargo, se deben realizar más estudios para establecer su composición exacta (115).

La colicina M es naturalmente producida por *E. coli*, tiene un efecto contra cepas relacionadas y es reconocida como segura por la FDA. Se expresó esta colicina en una planta (*Nicotiana tabacum*) para evaluar su actividad contra *E. coli*, donde tiene como ventaja su expresión estable y por lo tanto requiere menos tiempo para el procesamiento lo que la hace una técnica económica y atractiva para el comercio (116). Otros autores encontraron que la colicina M en un sobrenadante libre de células es insoluble y la porción soluble (5%) es la que posee actividad antimicrobiana, sin embargo, con el uso de chaperonas se logró aumentar la solubilidad y la recuperación de esta (117).

La actividad antimicrobiana se determinó con microdilución para obtener la CMI usando concentraciones desde 0,49 a 250 µg/mL de bacteriocina y 5 µL de suspensión bacteriana para alcanzar una concentración final en cada pozo de 5×10^5 UFC/mL. Para las cepas de *E. coli* que producen BLEE (dada por resistencia a cefalosporinas de tercera generación y sensibilidad a carbapenémicos) la CMI fue de 125 µg/mL y de 62,50 µg/mL para las 2 cepas evaluadas, mientras que la CMB fue >250 µg/mL y 125 µg/mL, respectivamente. Esta bacteriocina pesa alrededor de 29 kDa, lo que la hace la más pequeña, además no fue tóxica para las células usadas y demostró ser degradada completamente en el tracto digestivo humano, por lo que la hace segura para la microbiota intestinal y para el medio ambiente (116).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* contra patógenos multirresistentes aislados de catéter urinario (*E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp* y *Bacillus cereus*). Se utilizó sobrenadante libre de células (100 µL) en una difusión en agar ajustando la concentración bacteriana a 0.5 McFarland. Se determinó que *E. coli* es sensible a la bacteriocina ya que presentó un diámetro de 17 +/- 0.6 mm. En cuanto a sus características físico químicas la bacteriocina estudiada presentó temperatura óptima de 30 – 37°C, temperaturas más altas provocaron la pérdida de la acción. En cuanto al pH, la zona de inhibición aumentó a medida que el pH disminuía, la actividad máxima se presentó a pH 4 y la mínima se presentó a pH 7, aunque para *E. coli* la actividad fue mejor a pH 6 a diferencia de otras bacterias. Esta no estuvo dada solamente por la bacteriocina, otras sustancias como ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno pueden contribuir a su acción (118).

Se evaluó la actividad de diversos *Lactobacillus* y *Pediococcus* sobre *E. coli* productora de BLEE, de las 10 bacteriocinas evaluadas, 2 fueron las mejores, JM22 pertenece a *Lactobacillus plantarum* y ULZ16 de *Lactobacillus curvatus*. Se evaluó la actividad de las bacteriocinas por un ensayo de difusión en pozo utilizando sobrenadante libre de células (75

μL) a una concentración de 0.5 McFarland de bacteria. Se usaron 2 cepas de *E. coli* productora de BLEE donde JMQ22 mostró un diámetro de 17.8 +/- 0.14 mm y 14.30 +/- 0.40 para cada cepa. Mientras que ULZ16 mostró un diámetro de 16.60 +/- 0.12 y 15.75 +/- 0.20. Se evaluaron sus características químicas donde resistieron el tratamiento a 60 y 80°C por 30 minutos, JMQ22 mantuvo su actividad incluso a 121°C por 15 minutos. En cuanto al pH presentaron un amplio espectro de 2 – 10, aunque el óptimo para ambas fue de 4 a 6. También mostraron actividad nula luego del tratamiento con proteinasa, lo que indica su naturaleza proteica (119). Un estudio similar demostró que la bacteriocina LS6 de *Lactobacillus plantarum* y LU11 de *Pediococcus pentosaceus* fueron las más efectivas contra *E. coli* resistente a drogas, LS6 mostró una CMI de 10 +/- 0.334 mg/mL y LU11 de 20.33 +/- 0.003 mg/mL (120).

La microcina PDI (MccPDI) es una microcina de clase IIa producida por la cepa *E. coli* 25 y 284, el término PDI le fue otorgado por su inhibición dependiente de cercanía (Proximity-Dependent Inhibition). Su actividad se ha relacionado con la inhibición de cepas de *E. coli*, donde se incluye el EHEC y el serotipo O157:H7 junto con 026. Se tienen además 5 proteínas, 2 para síntesis (*mcpM* y *mcpA*), 1 para inmunidad (*mcpI*) y 2 de exportación (*mcpD* y *mcpB*) (121, 122). Se estudió esta bacteriocina contra cepas de *E. coli* aisladas del tracto urinario que son resistentes a múltiples antibióticos (se destacan amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, cefalosporinas de segunda generación y algunas cepas son positivas para BLEE) (121).

Se realizó un estudio de competencia donde se cultivó a las cepas en estudio en medio líquido, fueron transferidas a un medio con *E. coli* 25 para demostrar la disminución del conteo de células (CFU), *E. coli* BW25113 fue usada como control negativo y positivo. Las cepas de *E. coli* probadas mostraron una disminución en el conteo de células de 3.5 – 8.5 log CFU. Un ensayo tipo “spot” fue realizado como segunda opción y más rápido para detectar las bacterias susceptibles, se cultivaron las bacterias y se sembraron. La proteína precursora

de MccPDI se utilizó a una concentración de 40 $\mu\text{l}/\text{mL}$ y se colocaron 5 μL en el cultivo. Las cepas que mostraron zonas de inhibición fueron consideradas como susceptibles entre las que se destacó MAD96 y MAD102 (121).

El mecanismo de MccPDI es mediante la porina OmpF, por lo tanto, bacterias que no presentan esta porina obtienen resistencia (como es el caso de *E. coli* BW25113 sin OmpF del control negativo). Sin embargo, MAD96 mostró resistencia en el primer ensayo gracias a sus propias bacteriocinas (colicina Ia/Ib y microcina V) que le permitieron inhibir el crecimiento de *E. coli* 25, mientras que en el segundo ensayo se mostró susceptible. Se destaca que esto se debe al uso de la proteína recombinante en el segundo ensayo ya que posiblemente utiliza otro medio de entrada (como otras porinas en la membrana). Son necesarios más estudios para determinar la forma de daño de la proteína recombinante y las proteínas de inmunidad de *E. coli* 25 (121). En la tabla 6 se presenta el resumen de las bacteriocinas investigadas contra *E. coli* resistente a carbapenémicos y a betalactámicos.

Tabla 6. Resumen de las bacteriocinas activas contra *Escherichia coli* resistente a carbapenémicos y a betalactámicos

Creada por B.O. 2020

Bacteriocina	Cepa productora	Clasificación	Temperatura óptima	pH óptimo	Concentración mínima para producir daño
Sin nombre (115)	<i>Lactobacillus parafarraginis</i>	Clase I o II, posiblemente circular (75 kDa) (115)	Estable al calor (25, 37 y 45 °C) (115)	3 (115)	20 mg/mL (115)
Colicina M (116)	<i>Escherichia coli</i>	Colicina (29 kDa) (116)	37 °C (12)	8 (116)	62,50 – 125 µg/mL (116)
Sin nombre (118)	<i>Lactobacillus casei</i>	No especificada	30 – 37°C (118)	4 – 7 (118)	100 µL (118)
JMQ22 (119)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	No especificada	60 – 80°C (119)	4 – 6 (119)	75 µL (119)
ULZ16 (119)	<i>Lactobacillus curvatus</i>	No especificada	60 – 80°C (119)	4 – 6 (119)	75 µL (119)
Microcina PDI (121)	<i>Escherichia coli</i> 25/284	Microcina clase IIa (5 – 10 kDa) (121)	4 – 8 °C (17)	7,6 - 8 (121)	40 µL/mL (121)

2.4. *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y a betalactámicos

Dentro de las bacterias Gram negativo que producen betalactamasas, *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa (KPC) es la de mayor relevancia en la clínica ya que sus variante enzimáticas pueden ser transmitidas a diferentes especies mediante plásmidos (123), se han identificado 24 alelos diferentes del gen *blaKPC*, estos se denotan con el número correspondiente. Sin embargo, la secuencia KPC-1 y KPC-2 son idénticas por lo tanto corresponden a la misma enzima. Estas variantes no sólo se han aislado en ambientes hospitalarios, también en aguas costeras o de pozo (124).

Las principales complicaciones que se observan en una infección por esta bacteria son bacteriemia (30,7%), infecciones intraabdominales (23,1%) y neumonía (17,9%). Además se presenta alta proporción a fallos terapéuticos y mortalidad (125). Algunos factores de riesgo asociados a estas infecciones son administración previa de cefalosporinas, procedimientos invasivos, cirugía abdominal, entre otros (126).

Se pueden atribuir las complicaciones a la falta de un tratamiento empírico inicial apropiado durante las primeras 24 – 72 horas de la infección, el aumento de la resistencia a colistín también juega un papel de complicación ya que es el más utilizado para el tratamiento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos (127). Sin embargo, la producción de carbapenemasas no significa siempre un fallo terapéutico, incluir carbapenémicos en el tratamiento cuando la CMI es de 4 µg/mL muestra eficacia terapéutica (128).

2.4.1. Epidemiología

De acuerdo a los datos del ISP de los años 2014 – 2017, para *K. pneumoniae* el 49,2% (239/486) fue positivo para carbapenemasas, el 88% (212/239) presentó carbapenemasa de tipo KPC, el 10% (24/239) de tipo MBL y el 0,8% (2/239) de tipo OXA (107).

En Madrid se aisló *K. pneumoniae* en el 87,8% de los pacientes estudiados donde el mecanismo de resistencia por carbapenemasa fue OXA-48 (91,9%), VIM-1 (6,6%), KPC (1%) y NDM (0,5%) (129). Un estudio en Venezuela estudió 32 aislados de *K. pneumoniae*, los 32 portaban el alelo de KPC-2 el cual es uno de los más distribuidos a nivel mundial, principalmente en América del Sur, Brasil, Argentina, etc (130).

En Paraguay se obtuvieron 333 aislados de diferentes bacterias en un plazo de 13 meses, donde 116 (34,83%) presentaron resistencia a carbapenémicos. 16 cepas de *K. pneumoniae* presentaron KPC (29,09%), 24 cepas de MBL (43,64%) y 15 de otros mecanismos (27,27%) (131). Se estudiaron aislados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos entre los años 2013 – 2018 en Portugal. Del total de los 46 aislados se identificaron 36 de tipo KPC-3 (78%), 9 de tipo OXA-181 (20%) y 8 de tipo GES-5 (17%) (132).

2.4.2. Efecto de bacteriocinas

Se estudió el efecto de *Brevibacillus laterosporus* sobre *K. pneumoniae* Ni9 que presenta carbapenemasa de tipo NDM. Se aislaron 4 cepas (BGSP7, BGSP9, BGSP11 y BGSP12) que mostraron actividad contra la cepa resistente de *K. pneumoniae* probada, BGSP11 mostró el mayor halo de inhibición contra la bacteria donde la bacteriocina mostró un peso de 1,55 kDa, luego de estudiar los genes de la cepa se concluye que parece ser brevibacilina (133). La brevibacilina es un lipopéptido antimicrobiano que además tiene actividad contra otras bacterias resistentes como SARM, ERV, cepas de *Clostridium difficile*, entre otras (134).

Para estudiar la CMI se usó la cepa Ni9 a 0.5 McFarland con 20 μ L y BGSP11 fue probada en concentraciones desde 250 μ g/mL a 7.8 μ g/mL. La temperatura óptima mostró ser estable a 60, 80, 100 y 121°C por 20 minutos, sin embargo a 121°C la zona de inhibición fue menor. Fue susceptible a enzimas proteolíticas y mostró un rango de pH amplio de 2 – 14. La CMI de BGSP11 para *K. pneumoniae* fue de 316 μ M (11). Otro estudio, con brevibacilina, demostró que perdió su actividad a pH 3 y 9, pero se mantuvo estable a pH 5 y 7. Además es una buena alternativa para el control de bacterias Gram positivo (como *S. aureus*) y para *E. coli*, mientras que para bacterias como *Salmonella spp.* es mejor el uso de antibióticos (como la ampicilina probada en el estudio) (135).

La cepa BGSP11 además mostró la producción de otra bacteriocina de 6 kDa, esto explica por qué produce un mayor halo de inhibición que las otras cepas. Luego de estudiar los genes de la cepa BGSP11 para el posible metabolito, se llegó a la conclusión (con un 63% de identidad) que es laterosporulina (133). La laterosporulina es una bacteriocina de clase II_d que es similar a las defensinas humanas (136) debido a sus uniones disulfuro que mantienen

la estructura similar en solución, además el mecanismo de acción es mediante permeabilización de la membrana (137).

Se evaluó el efecto de las klebicinas en cepas de *K. pneumoniae* resistentes mediante la expresión en plantas (*Nicotiana benthamiana*) utilizando a *Agrobacterium tumefaciens* como vector para cada klebicina (138). Las klebicinas al ser de tipo colicin-like tienen su mecanismo de acción mediante la formación de poros en la membrana (138, 139), y a diferencia de las colicinas de *E. coli*, las klebicinas no han sido tan investigadas (140).

Los ensayos con disco en agar utilizaron klebicinas purificadas (10 µg) o extracto crudo (20 µl) en disco de 6 mm, mientras que las cepas fueron cultivadas en caldo LB antes de crecer en agar sólido LB. Estas fueron extraídas a una temperatura de 20 – 25 °C con una solución a pH 6. De las 6 klebicinas probadas (KpneA, KaerA, KpneM, KpneM2, KvarM, Kvarla), KvarM mostró el mejor espectro de actividad inhibiendo el 85% de las cepas, en segundo lugar KpneM inhibió el 74% de las cepas (se utilizaron 100 aislados clínicos de *Klebsiella*). Para las cepas resistentes de *K. pneumoniae* donde se incluyen carbapenemasas de tipo A (KPC), de tipo B (VIM-1, NDM) y de tipo D (OXA-48), KvarM y KpneM inhibieron las 7 cepas usadas aplicando 20 µg de cada klebicina en un disco (138).

La bacteriocina BCN2 de *Lactobacillus rhamnosus* BTK 20-12 se evaluó para cepas de *K. pneumoniae*. Se cultivaron las cepas en caldo MRS por 24 horas a 37°C, luego se centrifugó a 6.000 g por 20 minutos para obtener CFS. La purificación se realizó con cromatografía junto con filtración en gel para usarse en las pruebas. La determinación antimicrobiana de esta bacteriocina se realizó con 100 µL midiendo el halo de inhibición en las cepas en estudio luego de 24 horas a 30°C, se expresó en unidades arbitrarias (AU/mL) (141).

En cuanto a la estabilidad para temperatura, BCN2 perdió su actividad a los 121°C, pero se mantuvo estable en las temperaturas de 40, 60 y 80°C. Para el pH se mostró mayor actividad entre pH 4 – 5 y en cuanto a su peso molecular es de 0,602 kDa por lo que pertenece a la clase II. Luego de la purificación se encontró que la actividad específica para BCN2 es de $1,5 \times 10^7$ AU/mg y tiene efecto en cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de sangre, saliva, orina, heces y heridas (141).

Se evaluó la actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *Lactobacillus casei* contra *K. pneumoniae* multirresistente, el efecto inhibitorio a diferencia de *E. coli* aumentó utilizando un pH 4 en vez de pH 6. Se determinó como sensible con un halo de inhibición de 19 +/- 2.5 mm. Además se vio un mejor efecto en *K. pneumoniae* con 72 horas de incubación, en comparación a las 24 horas normales. Al igual que antes se utilizó sobrenadante libre de células (100 µL) en una difusión en agar ajustando la concentración bacteriana a 0.5 McFarland (118).

Se evaluó el efecto de las bacteriocinas LU11 de *Pediococcus pentosaceus* y LS6 de *Lactobacillus plantarum* (que mostraron la mayor actividad antimicrobiana) contra *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa de tipo NDM. Se concluyó que su actividad es debido a bacteriocina al ser inhibida por pepsina y no perder su actividad por el efecto de catalasa (lo que demuestra que el peróxido de hidrógeno no es el causante), las bacteriocinas fueron estables a temperaturas de 60 y 80°C por 60 minutos, mientras que el rango de pH fue de 2 – 10. La CMI para el aislado resistente fue de 13,33 +/- 0.003 mg/mL para LU11 y 18 +/- 0.334 mg/mL para LS6. El diámetro mostrado de LU11 es de 21 mm, mientras que para LS6 fue de 18 mm (120). En la tabla 7 se presenta el resumen de las bacteriocinas investigadas contra *K. pneumoniae* resistente a antibióticos.

Tabla 7. Resumen de las bacteriocinas activas contra *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos y a betalactámicos

Creada por B.O. 2020

Bacteriocina	Cepa productora	Clasificación	T° óptima	pH óptimo	Concentración mínima para producir daño
Brevibacilina (133)	<i>Brevibacillus laterosporus</i> <i>BGSP11</i>	1,55 kDa (133)	60, 80, 100°C (133)	2 – 14 (133)	316 µM (133)
Klebicina (138)	<i>Klebsiella spp</i>	Colicina (138)	20 – 25°C (138)	6 (138)	20 µg (138)
BCN2 (141)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>BTK 20-12</i>	Clase II (0,602 kDa) (141)	40, 60, 80°C (141)	4 – 5 (19)	1,5 x 10 ⁷ AU/mg (141)
Sin nombre (118)	<i>Lactobacillus casei</i>	No especificada	30 – 37°C (118)	4 – 7 (14)	100 µl (118)
LU11 (120)	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	No especificada	60 – 80°C (120)	2 – 10 (120)	13,33 mg/mL (120)
LS6 (120)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	No especificada	60 – 80°C (120)	2 – 10 (120)	18 mg/mL (120)

2.5. *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, ubicuo y oportunista que es responsable de 10 – 15% de las infecciones nosocomiales mundiales (142). Causa infecciones en pacientes internados que están débiles o inmunocomprometidos afectando la piel y tejidos blandos, vías aéreas, urinarias, bacteriemia, entre otras (143). La adquisición de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos puede darse por vía exógena (contacto con personal o superficies ambientales) o endógena (colonización por la bacteria y uso de antibióticos que la hacen resistente) (144). Las personas con mayor riesgo de contraer esta infección son pacientes crónicos, procedimientos invasivos como ventiladores o catéter intravenoso, quemaduras o heridas quirúrgicas, consumo de antibióticos por período prolongado, etc (145).

Los mecanismos de resistencia se pueden resumir en 4: adquisición de carbapenemasas mediante transferencia horizontal de genes, deficiencia o represión de la porina OprD, sobreexpresión de la bomba de eflujo *mexAB-oprM* y sobreexpresión de gen cromosomal (*ampC*) que codifica para una cefalosporinasa intrínseca (146, 147, 148).

Los genes de carbapenemasas juegan un papel importante, VIM fue la primera metalo betalactamasa reportada en *P. aeruginosa* en el 2001 (145). Además la producción de metalo betalactamasas aumentó de un 12,3% a 30,6% del 2010 al 2011. En cuanto a otras carbapenemasas también se han identificado cepas productoras de KPC de *K. pneumoniae*, otros tipos de metalo betalactamasas (VIM, IMP y NDM) (147) y se han encontrado cepas con producción de OXA 141 (142).

Dentro de las mutaciones de porinas que permiten esta resistencia se encuentra OprD (en el gen *oprD*) el cual es el mecanismo más frecuente que desarrolla resistencia a carbapenémicos (imipenem y posiblemente meropenem) (149). La porina OprD es una proteína de membrana con sustratos específicos, como aminoácidos básicos, péptidos pequeños y carbapenémicos, también funciona como serino proteasa. La transcripción reducida puede deberse a diversos mecanismos como disrupción del promotor, terminación prematura de transcripción, detención del codón por mutaciones, inserciones, secuencias de inserción, etc (150, 151).

La sobreproducción de bombas se debe a mutaciones en los genes reguladores de la expresión de MexAB-OprM lo que aumenta la resistencia a carbapenémicos, esta bomba de eflujo es la más importante y la más expresada en *P. aeruginosa*. Estas mutaciones también pueden ocurrir para la síntesis de otras porinas (152). La bomba de eflujo tiene el perfil de sustrato más amplio de betalactámicos donde se incluye meropenem, por esto se relaciona con una resistencia a carbapenémicos si está expresado (153). También confiere resistencia a otras familias como quinolonas, macrólidos, cloranfenicol, tetraciclinas y lincomicina (154).

El operón *mexO* codifica las proteínas MexA (unión a membrana), MexB (transportador) y OprM (porina exterior) (155, 156). Está regulado por genes reguladores que codifican proteínas que mantienen reprimido el operón *mexO*. Cuando estos genes sufren mutaciones el operón *mexO* deja de estar reprimido y puede expresar la bomba de eflujo, generando la resistencia (155), principalmente se refiere al gen *mexR* (principal) y al gen *nalC* (secundario) (157). La combinación de MexAB-OprM junto a OprD la hace altamente resistente a meropenem, imipenem y doripenem y es más probable que una cepa de *P. aeruginosa* tenga uno de estos 2 mecanismos (158).

La AmpC cefalosporinasa es una enzima cromosomal de *P. aeruginosa* que confiere resistencia contra betalactámicos (excepto ceftazidima) y carbapenémicos (153). La desrepresión de AmpC que causa resistencia suele estar acompañado de pérdida de porinas y sobreexpresión de bombas de eflujo (159). La desregulación suele estar dada con inductores de betalactamasas (como carbapenémicos) que permiten la acumulación de metabolitos del catabolismo del peptidoglicán, esto a su vez permite al mediador AmpR la expresión de AmpC (160), también si se afecta el gen *ampR* se incrementa la expresión de AmpC (148). Cuando no hay inductor, se ve afectado el AmpD (procesa los metabolitos) con mutaciones lo que resulta en una desrepresión constitutiva de AmpC causando una hiperproducción (160).

2.5.1. Epidemiología

En Chile el año 2017 se identificaron 2 brotes de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos, uno en la unidad de quemados productora de VIM con 4 casos y sin letalidad, el otro en servicio de medicina con casos de ITU, infección a la piel, herida operatoria y neumonía no asociada a ventilación mecánica productora de KPC, con 2 muertes atribuibles (letalidad del 40%) (161). En una UCI pediátrica se estima que la incidencia de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos alcanza el 22-27% (161). En el boletín de resistencia antimicrobiana del ISP entre el año 2012-2016 evaluando imipenem y meropenem, para las 3.499 cepas de *P. aeruginosa* estudiadas, el año 2014 se observa el mayor porcentaje de resistencia (44,2% y 41,6%, respectivamente), el año 2015 descendió a 34,0% y 32,5%, respectivamente. Finalmente en el año 2016 se observó un aumento a 37,8% y 38,8%, respectivamente (162).

En Perú se estudiaron 76 cepas de *P. aeruginosa* donde 24 (31,6%) mostraron una detección fenotípica para carbapenemasa de tipo MBL (metalo betalactamasa), la más común fue IMP con 23 aislados (95,8%), seguida de VIM con 1 aislado (4,2%) y no se detectó para NDM (164). En un trabajo de México se estudiaron 22.943 aislamientos donde el 40% fue de *P. aeruginosa* MDR donde se incluyen carbapenémicos (165). Se detectaron genes de carbapenemasas en 59 aislados, 41 con resistencia a carbapenémicos y MDR, 13 expresaban IMP, 16 GES y 4 ambos genes. Sin embargo, también exhibían otros mecanismos como pérdida de porinas (166).

En Estados Unidos se estudiaron los primeros aislados de *P. aeruginosa* que mostraran resistencia a imipenem, meropenem o doripenem y se les realizó PCR para identificar genes de carbapenemasas. De los 937 aislados, 847 fueron estudiados con PCR donde sólo 6 mostraron carbapenemasas, 3 VIM, 2 KPC y 1 IMP. Lo que sugiere otro mecanismo para la resistencia (167).

La resistencia a carbapenémicos es del 60% en hospitales de Brasil y se da principalmente por metalo betalactamasas, como IMP, VIM, NDM, entre otras. Siendo en Brasil las más prevalentes IMP y SPM (168). En Filipinas entre el 2013-2016 se estudiaron 130 aislados donde 45 (35%) presentaban resistencia a carbapenémicos y sólo 2 (1,5%) exhibían VIM (169).

2.5.2. Efecto de bacteriocinas

Se estudió el efecto de piocinas producidas por *P. aeruginosa* contra diferentes cepas de esta misma especie, entre ellas se encuentran piocina S5 (56kDa), PaeM (32 kDa), PaeM4 (39 kDa) las cuales fueron expresadas en niveles de 30 – 50% y piocinas similares a lectinas como L1 (28,4 kDa), L2 (28,4 kDa) y L3 (30,3 kDa) las cuales se expresaron en niveles de 10 – 30% con la mejor expresión de L3 (170).

Las piocinas pertenecen al grupo de las colicinas y al igual que estas ejercen su acción en la membrana formando poros o presentan actividad nucleasa (171). Estas bacteriocinas están codificadas en *P. aeruginosa* y se encuentran 3 tipos (R-, F- y S-), la piocina R tiene actividad en el LPS de la membrana y no pueden transmitir resistencia o virulencia, estas son de alto peso molecular y resistentes a proteasas y nucleasas (172, 173). La piocina S toma ventaja del sistema TonB para su acción, además tiene un dominio de anclaje a la membrana junto a un dominio tóxico en el carboxilo terminal, estas es soluble y sensible al calor y proteasas (173, 174). La piocina F al igual que la piocina R también forma poros en la membrana y causa su despolarización, es de alto peso molecular y resistente a proteasas (173, 175).

Se cultivaron las cepas en estudio y se prepararon vectores que fueron expresados en la planta *Nicotiana benthamiana* mediante *A. tumefaciens*. Luego de purificar las piocinas se realizaron ensayos en agar con discos de 6 mm y fueron impregnados con las respectivas piocinas (20 µL de extracto crudo o 10 µg de piocina purificada). En este estudio había 21 cepas resistentes a los carbapenémicos, 14 de ellas (67%) mostraron sensibilidad a por lo menos 1 de las piocinas estudiadas (S5, PaeM, PaeM4). La que tuvo mejor acción fue PaeM4 con 10 cepas, luego S5 con 7 cepas y PaeM con 4 cepas. Para las cepas que no eran resistentes

a carbapenémicos, PaeM4 demostró la mayor inhibición con un 53% (para 100 cepas), seguida de S5 con un 40% y luego PaeM con 26% (170).

La enterocina P (Ent P) fue evaluada contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos (productora de VIM), esta fue expresada en cepas de *E. coli* y en células ováricas de hámster (176). La enterocina P es una bacteriocina de clase IIa producida por *Enterococcus faecium* P13, tiene un efecto antimicrobiano amplio e inhibe patógenos alimenticios como *Listeria* (177). La temperatura óptima para producir la cantidad máxima de EntP es de 37°C (178).

Se determinó la CMI mediante el cultivo de las cepas en agar Mueller-Hinton a 37°C, luego fueron transferidas a Mueller-Hinton en caldo donde se llevaron a una concentración de 0.5 McFarland. Luego se diluyeron hasta una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Se prepararon diluciones de Ent P desde 0.5 a 512 µg/mL para ser probadas en una placa de 96 pocillos. El peso de la enterocina P fue de 5,45 kDa. En cuanto a los resultados de la CMI, *P. aeruginosa* ATCC 27853 demostró ser la más sensible con 8 µg/mL, por otra parte, la cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos mostró una CMI de 256 µg/mL, siendo la más alta de las bacterias resistentes evaluadas. Se estudió si la sal y el plasma tendrían algún efecto sobre la bacteriocina, pero no mostró ningún cambio bajo esas condiciones. El sobrenadante fue ajustado a pH 7 (176).

Se estudiaron las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* contra *P. aeruginosa*. Se obtuvieron 70 muestras de infecciones en heridas y quemaduras, sólo 48 pudieron aislarse y 31 de estas se identificaron como *P. aeruginosa*. A cada cepa se le realizó un antibiograma y el 70% (21 cepas) mostró resistencia para imipenem y meropenem. De las 31 cepas 20 mostraron ser multirresistentes. Se obtuvieron las

bacteriocinas usando caldo MRS incubado anaeróbicamente a 37°C, luego fueron centrifugados para ser filtrados, se ajustó el pH a 7 (179).

Se evaluó el efecto antimicrobiano de los *Lactobacillus spp.* con difusión en agar y método de disco, para el primero se preparó una suspensión a 0,5 McFarland con las cepas de *P. aeruginosa* y se inocularon placas de agar nutritivo con 100 µL, se hicieron pozos de 6 mm de diámetro donde se colocaron 50 µL de *Lactobacillus spp* y se incubó a 37°C para examinar las zonas de inhibición. Para el método de disco se usaron suspensiones de *Lactobacillus spp* sobre discos de 6 mm sobre placas inoculadas con cepas de *P. aeruginosa*. El efecto de las bacteriocinas se realizó en pozos de 6 mm de diámetro utilizando 10 µL de bacteriocina en un inoculado de 10 µL con cepas de *P. aeruginosa*. Se incubaron a 37°C. Como resultado se tiene que *L. rhamnosus* tuvo mejor efecto que *L. acidophilus*, usando el método de disco fue de 20 mm y 25 mm en comparación a 18 mm, respectivamente. Usando el sobrenadante con bacteriocinas se tuvo un diámetro de 32 mm y 25 mm, respectivamente. La concentración de proteínas fue de 74 mg/mL y 44 mg/mL, respectivamente (179).

El efecto de *Brevibacillus laterosporus* también fue probado en una cepa de *P. aeruginosa* productora de NDM aislada en Serbia (MMA83) (180). Al igual que para *K. pneumoniae* Ni9 la cepa BGSP11 mostró mayor actividad debido a las 2 bacteriocinas que se identificaron, brevibacilina (1,55 kDa) y laterosporulina (6 kDa). El estudio se realizó usando la cepa de *P. aeruginosa* a 0.5 McFarland con 20 µL y BGSP11 con concentraciones entre 250 µg/mL a 7.8 µg/mL en una placa de microtitulación, se obtuvo como resultado una CMI de 158 µM para esta cepa. La temperatura y pH se mantuvo de igual manera (133).

Se estudió el efecto de la salivaricina producida por *Lactobacillus salivarius*, esta bacteria se ubica en la saliva siendo el segundo *Lactobacillus* más común luego de *L. acidophilus*, sobre *P. aeruginosa* (181). Las bacteriocinas de esta especie son a menudo de clase II, usualmente produciendo efecto contra bacterias de descomposición o contra patógenos alimenticios (182). Las salivaricinas conocidas (SalA, SalB, Sal9, SalG32, SalE, SalD) pertenecen principalmente a la clase Ia o IIa. Su mecanismo de acción, al ser lantibióticos, se basa en unir el lípido II de la membrana para formar poros o bloquear la síntesis de peptidoglicán (183).

Se aislaron las cepas de *L. salivarius* en agar para obtener la salivaricina cruda donde las células fueron centrifugadas por 10 minutos a 6000 rpm y el sobrenadante fue guardado. Para purificar la bacteriocina se agregó butanol y se centrifugó, se evaporó la fase orgánica y se resuspendió en buffer citrato de sodio a pH 5. Luego se evaluó el peso de la bacteriocina, temperatura, pH y efecto de proteasas. El peso molecular de la salivaricina LHM es de 13,5 kDa. La temperatura óptima es de 25 – 80°C por 15 minutos, perdió el 60% de su actividad a 90 y 100°C y perdió el 70% luego de autoclavado (121°C por 15 minutos). El pH óptimo es de 4 – 9, sin embargo a pH 4 perdió el 70% de su actividad y entre 8 y 9 perdió el 40%. Perdió toda su actividad al ser tratada con enzimas proteolíticas, pero no mostró ninguna pérdida con lipasa, catalasa o amilasa (181).

Las 37 cepas de *P. aeruginosa* se obtuvieron de cultivos urinarios y se les realizó antibiograma, las cepas mostraron resistencia a imipenem y a otros antibióticos como ceftazidima, ampicilina, cefotaxima, entre otros. De las 56 muestras de saliva, 14 presentaban *L. salivarius* y todas las cepas produjeron bacteriocina. El efecto antimicrobiano fue evaluado con método por difusión de pozo en agar para evaluar el estado crudo y purificado de la salivaricina LMH contra *P. aeruginosa*. En estado crudo (32 mg/mL) la zona de inhibición fue de 15,33 +/- 2,01, mientras que la inhibición del estado purificado (32 µg/mL) mostró

una zona de inhibición de 27,6 +/- 3,87 (181). En la tabla 8 se presenta el resumen de las bacteriocinas investigadas contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Tabla 8. Resumen de las bacteriocinas activas contra *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

Creada por B.O. 2020

Bacteriocina	Cepa productora	Clasificación	T° óptima	pH óptimo	Concentración mínima para producir daño
Piocina PaeM (170)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colicina (32 kDa) (170)	4°C (170)	7 (170)	10 µg (170)
Enterocina P (176)	<i>Enterococcus faecium P13</i>	Clase IIa (5,45 kDa) (176)	37°C (176)	7 (176)	256 µg/mL (176)
Sin nombre por el momento (179)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	No especificado (179)	37°C (179)	7 (179)	74 mg/mL (179)
Brevibacilina (133)	<i>Brevibacillus laterosporus BGSP11</i>	1,55 kDa (133)	60, 80, 100°C (133)	2 – 14 (133)	158 µM (133)
Salivaricina LHM (181)	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Ia ó IIa (13, 5 kDa) (181)	25 – 80°C (181)	4 – 9 (181)	32 µg/mL (181)

2.6. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos

Acinetobacter baumannii es un cocobacilo gram negativo que se ha convertido en un patógeno de importancia clínica en pacientes hospitalizados (184). Se ha diseminado rápidamente en ambientes hospitalarios por adquirir resistencia principalmente mediante carbapenemasas de tipo D (oxacilinasas, los 6 subgrupos son OXA-51, -23, -40, -58, -143 y -235), y con menor frecuencia de clase B o metalo betalactamasas, pérdida de porinas y para los desinfectantes lo realiza mediante bombas de eflujo tipo *amv* A, (185, 186, 187, 188).

Para las carbapenemasas se han reportado de tipo B como IMP, VIM, SIM y recientemente NDM, también de clase OXA. Aunque esta última no hidroliza carbapenémicos con tanta fuerza, sí pueden hacerlo cuando hay un elemento móvil de inserción como *ISAbal* (189, 190). Las secuencias de inserción (IS) como *ISAbal* juegan un rol en la resistencia antimicrobiana y son los elementos de transferencia más simples, son especialmente importantes en las OXA ya que aumentan su expresión, estos están ubicados río arriba de los genes OXA (191, 192). La presencia de *ISAbal* sobreexpresa principalmente OXA-23 (adquirida) y OXA-51 (intrínseca) (193), además de cefalosporinasas (AmpC), estas se encuentran intrínsecamente, pero no hidrolizan cefepime ni carbapenémicos sin *ISAbal* (194, 195).

La reducción de permeabilidad por proteínas de membrana externa (OMP) contribuye a la resistencia de carbapenémicos (principalmente a imipenem), las más estudiadas son CarO y OprD, siendo CarO la más asociada. CarO permite la captación de ornitina, otros aminoácidos básicos y carbapenémicos, a su vez puede dividirse en CarOa y CarOb, donde la segunda es más específica para imipenem. CarO también juega un papel en la adhesión y la invasión de *A. baumannii* a las células (189, 196, 197, 198). La disrupción de CarO suele

darse por secuencias de inserción (IS) (199), con esta interrupción y la no entrada del antibiótico se amplifica la actividad enzimática de las carbapenemasas (200).

Las bombas de eflujo también tienen su importancia, se han descrito 5 familias donde la familia RND (*resistance-nodulation-cell division*) tiene los 3 miembros más importantes que expulsan la mayor cantidad de sustancias, *AdeABC*, *AdeFGH* y *AdeIJK*. La bomba *AdeABC* fue la primera en identificarse teniendo a *AdeB* como transportador antimicrobiano, *AdeC* como OMP y *AdeA* como la proteína que une al espacio periplásmico (189, 201, 202). *AdeB* captura las sustancias ya sea desde la membrana fosfolipídica, de la membrana interna o del citoplasma y lo envía al medio extracelular mediante *AdeC* (203). Esta bomba además regula la sensibilidad a aminoglicósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina, trimetoprim (204), y se ha encontrado que se asocia su sobreexpresión con la resistencia a carbapenémicos (meropenem) (205).

La resistencia a carbapenémicos exceden el 90% en algunas partes del mundo, para *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) la mortalidad con neumonía adquirida en hospitales e infecciones al torrente sanguíneo se acercan al 60% (206). Se atribuye como *A. baumannii* pan-resistente (AB-PR) a aquellas cepas que presentan resistencia a carbapenémicos y que son susceptibles, por lo general, sólo a polimixinas como colistín (186). La contaminación por CRAB se da principalmente en pacientes en habitaciones múltiples, más que en las individuales, también en objetos de alto contacto como mecanismos de gas y eléctricos, lámparas, cortinas, monitores (207), con factores de riesgo como enfermedades crónicas (hipertensión, diabetes, hepatitis), procedimientos invasivos, estancia en UCI, uso de antifúngicos, antibióticos y metilprednisona (208).

2.6.1. Epidemiología

En el boletín de resistencia antimicrobiana entre el año 2012 – 2016 se reportó la resistencia más baja a imipenem y meropenem en el año 2016 (al estudiar 1.469 cepas) siendo de 43,1% y 44,5%, respectivamente. Sin embargo, los años anteriores se alcanzaron cifras bastante más altas, para imipenem se alcanzó un rango de 64,4% - 74,7% entre los años 2012 – 2015. Mientras que para meropenem fue de 69,9% - 83,9% en el mismo periodo (163). Se estipula que la susceptibilidad de carbapenémicos es menor al 30%, y la resistencia es sobre el 50% a casi todos los antibióticos (209) menos a colistín, el cual ha presentado cepas resistentes, y esto es preocupante (210).

En El Salvador se estudiaron cepas productoras de carbapenemasas, donde 954 (66%) de 1446 cepas totales resultaron positivas. *A. baumannii* fue el más frecuente con un 85% (807), siendo el mecanismo más común la presencia de oxacilinasas, donde el 99,6% de las oxacilinasas totales pertenecían a *A. baumannii* (211). En Egipto la carbapenemasa más prevalente fue OXA-23 con un 90% (27/30), seguido de NDM con un 66,7% (20/30) y luego GES con un 50% (15/30). Otros estudios de África reportan a OXA-23 como la más común, desplazando a OXA-58 que había sido la más común por un largo periodo de tiempo (212).

En Colombia se aislaron 32 pacientes con infección por CRAB, provenientes de hospitales, todas las cepas presentaron resistencia a meropenem e imipenem, además todas presentaron OXA-23 y OXA-51 (213). Otro estudio reveló que la presencia de OXA-23 y OXA-51 es de un 21,2%, además se presentaron otros mecanismos como VIM, IMP, TEM, pero en menor cantidad (214).

2.6.2. Efecto de bacteriocinas

El efecto de la enterocina P (producida por *E. faecium* P13) fue estudiada en *A. baumannii* resistente a carbapenémicos (producción de OXA 27). Se determinó la CMI mediante el cultivo de las cepas en agar Mueller-Hinton a 37°C, donde se prepararon diluciones de Ent P desde 0.5 a 512 µg/mL para ser probadas en una placa de 96 pocillos. Como resultado se obtuvo que la CMI para *A. baumannii* es de 128 µg/mL, casi la mitad que para *P. aeruginosa* productora de VIM. Los parámetros de pH y temperatura se mantuvieron (176).

El efecto de *Brevibacillus laterosporus* también fue probado en una cepa de *A. baumannii* productora de OXA 23, 24 y 58 además de expresar la porina CarO aislada en Serbia (6077/12) (215). Al igual que para *K. pneumoniae* Ni9 y *P. aeruginosa* MMA83 la cepa BGSP11 mostró mayor actividad debido a las 2 bacteriocinas que se identificaron. El estudio se realizó usando la cepa de *A. baumannii* a 0.5 McFarland con 20 µL y BGSP11 con concentraciones entre 250 µg/mL a 7.8 µg/mL en una placa de microtitulación, se obtuvo como resultado una CMI de 20 µM para esta cepa. La temperatura y pH se mantuvieron de igual manera (133).

La combinación de enterocina AP-7121 (antes llamada MR99) fue probada en conjunto a colistín para cepas de *A. baumannii* sensibles solamente a colistín y a tigeciclina (216). La enterocina AP-7121 es producida por la cepa probiótica de *Enterococcus faecalis* CECT7121 aislada de Argentina (217), esta pertenece a la clase II y es un péptido catiónico e hidrofóbico, por lo tanto necesita encapsulación para su administración oral. Cuando el péptido no está encapsulado es sensible a enzimas proteolíticas, y encapsulado su pH óptimo es de 2 por lo menos por 2 horas (218), aunque también presenta actividad en rango de 4 – 8. El mecanismo de acción es mediante formación de poros en la membrana, seguido de un shock osmótico y

lisis celular (216). Se estudia preferentemente a colistín en combinación con otro agente ya que al ser la primera opción de tratamiento frente a *A. baumannii* resistente a carbapenémicos presenta nefrotoxicidad y neurotoxicidad si se utiliza sola (206).

La obtención de la bacteriocina se realizó cultivando la cepa en caldo BHI por 18 horas a 37°C, luego se transfirió a 4 litros de caldo BHI e incubada por 9 horas a 37°C, se centrifugó a 15.000 g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se ajustó a pH 7 y se centrifugó a 20.000g por 20 minutos a 4°C. Luego el precipitado se resuspendió en 40 mL de PBS a pH 7 (péptido semi purificado). Para purificarlo por completo se utilizó HPLC en fase reserva utilizando 20 µL y luego almacenado a -20°C. El estudio de la CMI se realizó por método de micro dilución en caldo utilizando AP-7121, colistín y una combinación entre ambos, para esto se cultivaron las cepas necesarias, se diluyeron en PBS y fueron llevadas a pH 7 para llegar a un inóculo de 10⁶ UFC/mL. La CMI obtenida para *A. baumannii* fue de 128 µg/mL para AP-7121 (resistente) y de 0,5 µg/mL para colistín, sin embargo, al combinarlas la CMI disminuyó considerablemente, dejando 0,12 µg/mL para colistín y 16 µg/mL para AP-7121. La sinergia temprana entre ambas fue observada entre las 4 y 8 horas (217).

Para 7 cepas de *A. baumannii* PDR (pandrug-resistant) y 8 XDR (extensively drug-resistant) se evaluó la combinación de nisina con polimixina B con el fin de determinar si se observa sinergia (219). Se define como XDR a las cepas que no son sensibles a > 1 droga en todas las categorías excepto < 2, esto quiere decir, ser resistente a todas las penicilinas, fluorquinolonas, aminoglicósidos y a carbapenémicos, mientras que PDR se define como no sensible a todos los agentes mencionados, o en otras palabras, resistente a los mencionados anteriormente más polimixinas y tigeciclina (220, 221).

Se preparó la nisina con 1 gramo (2,5%) disuelta en 25 mL de ácido acético al 0,005%, centrifugada a 4.000 g por 20 minutos. Luego fue filtrado el sobrenadante para preparar una solución de stock de 1 ug/ mL y conservada a -70°C. Se evaluó la CMI utilizando micro dilución en caldo con micro placas de 96 pocillos y se determinó como CMI el primer pocillo sin crecimiento claro. La CMI de nisina fue de 50 o 100 µg/mL dependiendo de la cepa. Mientras que la de polimixina fue de 1 – 2 µg/mL para XDR y varió de 4 a > 128 µg/mL para PDR. La sinergia se realizó con ensayos de inhibición en tiempos de 0 a 24 horas con un inóculo de 5×10^5 UFC/mL, se utilizaron en combinaciones de: (a) 1 MIC para ambas, (b) ½ MIC para ambas y (c) ½ MIC para nisina y ¼ MIC para polimixina con el fin de evaluar si a menor concentración de ambas se lograría sinergia. Se utilizó un escáner espiral que puede detectar conteos bacterianos como mínimo a 20 UFC/mL. Se definió como sinergia una disminución de > 2 log en el recuento de colonias luego de 24 horas (219).

Como resultado se obtuvo que al usar la combinación (b) se mostró sinergia en 3 cepas XDR y 7 de PDR, la cual fue la más prometedora, ya que las otras combinaciones mostraron menos sinergia. Además las cepas PDR mostraron mayor sinergia con más de una combinación, por lo que la sensibilidad a polimixina no es un factor de requerimiento para la sinergia. Esto se puede explicar por el efecto de la polimixina sobre la membrana externa permitiendo la acción de la nisina (219). En la tabla 9 se presenta el resumen de las bacteriocinas investigadas contra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos.

Tabla 9. Resumen de las bacteriocinas activas contra *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos.

Creada por B.O. 2020

Bacteriocina	Cepa productora	Clasificación	T° óptima	pH óptimo	Concentración mínima para producir daño
Enterocina P (176)	<i>Enterococcus faecium</i> P13	Clase IIa (5,45 kDa) (176)	37°C (176)	7 (176)	128 µg/mL (176)
Brevibacilina (133)	<i>Brevibacillus laterosporus</i> BGSP11	1,55 kDa (133)	60, 80, 100°C (133)	2 – 14 (133)	20 µM (133)
Enterocina AP-7121 (217)	<i>Enterococcus faecalis</i> CECT7121	Clase II (217)	37°C (217)	2 y 4 – 8 (217)	16 µg/mL con colistín (217)
Nisina (219)	<i>Lactococcus lactis</i>	Ia (< 5 kDa) (73)	30 – 37°C (80)	5,5 – 6,5 (80)	½ MIC nisina + ½ MIC polimixina (219)

3. Resistencia a bacteriocinas

La resistencia a bacteriocinas se creía menos probable en comparación con los antibióticos debido su rápido efecto bactericida y los diferentes objetivos potenciales de estos compuestos, aun así se han reportado mecanismos para la resistencia (222). A largo plazo es difícil anticipar si la resistencia a estos productos se convertirá en un problema tanto para el control de microorganismos patógenos en alimentos como por la posibilidad de generar reacciones cruzadas con antibióticos clínicos. La investigación en el área de la resistencia aportaría con un mejor entendimiento de su modo de acción, además de que la secuenciación del genoma de la cepa mutante resistente, aportaría con el conocimiento referente a la identificación de receptores u otras moléculas que son necesarias para la acción de la bacteriocina (223).

Generar resistencia a bacteriocinas puede parecer complejo debido a que actúan en diferentes maneras sobre las bacterias. Sin embargo, dicha resistencia puede existir de forma natural o adquirida. La resistencia natural engloba el hecho de copiar los mecanismos inmunes de las cepas productoras de bacteriocinas, la degradación y la adaptación al ambiente. Mientras que la resistencia adquirida se refiere a cambios en la pared celular, membrana celular, receptores y sistema de transporte (7, 13, 224). Se ha demostrado que al igual que para los antibióticos, la exposición a altas dosis de bacteriocina promueve la resistencia, sin embargo, se ha encontrado que a costa de producir resistencia, las cepas mutantes disminuyen su capacidad de crecimiento. Esto fue especialmente interesante ya que al usar un competidor heteroespecífico junto a una baja dosis de bacteriocina, se logró disminuir la densidad de bacterias resistentes (225). En la figura 2 se presentan los mecanismos de resistencia a bacteriocinas en bacterias Gram positivo y negativo.

3.1. Tipos de resistencia a bacteriocinas

3.1.1. Cambios en la pared celular y membrana externa

La pared celular en bacterias Gram positivo está compuesta de una capa gruesa de peptidoglicán conformada por cadenas de N-acetilglucosamina (GlcNac) y ácido N-acetilmurámico (MurNac), además existen ácidos teicoicos (WTAs) y lipoteicoicos (LTAs) que son polímeros aniónicos. Los primeros se anclan directamente al peptidoglicán mientras que los segundos se unen primeramente a la membrana citoplasmática de la bacteria y desde allí cruzan la pared celular (226, 227). Estos son la razón por la que las bacteriocinas (cargadas positivamente) pueden entrar en contacto con la pared.

Un mecanismo de resistencia frente a bacteriocinas, es aumentar las cargas positivas en la pared celular mediante la adición de D-alanina a los WTAs o LTAs, las que funcionan como factor de virulencia y resistencia. Esto se logra mediante 4 proteínas codificadas en el operón *dlt*. Lo anterior, se ha estudiado en *S. aureus* ya que contiene más copias del operón y produce más WTAs, que permiten exponer aminoácidos cargados positivamente con tal de reducir la red negativa y por tanto disminuir la atracción electrostática con las bacteriocinas. La mutación del operón *dlt* en *Streptococcus* del grupo A y B, *E. faecalis* y *Listeria monocytogenes* incrementa la susceptibilidad a bacteriocinas, polimixina B, colistín, nisina, entre otros (228, 229, 230, 231).

En la membrana externa de las bacterias Gram negativo se encuentran 2 capas, la capa interna compuesta de fosfolípidos y la externa contiene lipopolisacáridos (LPS). Este último está compuesto de endotoxina (lípidos A), un núcleo oligosacárido y un antígeno O de

polisacárido. Todo esto le confiere una carga negativa a la pared celular de este tipo de bacterias (228, 229).

La resistencia en bacterias Gram negativo se puede dar por la modificación del lípido A mediante la adición de una cadena de acilos como palmitato, fosfoetanolamina y 4-aminoarabinosa (Ara4N). Un ejemplo se da con el gen *PagP* que codifica para una enzima que añade palmitato al lípido A e incrementa la fluidez de la membrana. Esta resistencia está inducida también por el sistema PhoQ/PhoP (PhoPQ) que controla las 3 modificaciones al lípido A, pero principalmente la de 4-aminoarabinosa. A grandes rasgos, PhoPQ es el responsable de conferir la resistencia a polimixina mediante un sistema de 2 componentes (PmrA-PmrB) que inducen la expresión de genes *pmrD*, estos están presentes en *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa* (228, 229, 230, 231, 232).

3.1.2. Cambios en la membrana celular

Los componentes de la membrana celular más abundantes son fosfatidilglicerol (PG), difosfatidilglicerol (DPG) y cardiolipina (CL) los cuales confieren resistencia a diversos antimicrobianos. Se ha detectado en cepas de *L. monocytogenes* que niveles aumentados de PG y DPG confieren resistencia a nisina. La adición de lisina a PG (L-PG) ha mostrado cambiar la carga negativa a positiva para repeler mejor las bacteriocinas. Esto se logra mediante el factor de resistencia multipéptido (MprF) codificado por el gen *mprF*, que está altamente conservado en ambos tipos de bacteria. Este mismo factor expresa L-PG al exterior para transformar la carga de la membrana. En una variante de *L. monocytogenes* se encontró menor expresión de DPG y mayor de PG en la resistencia a nisina, lo que se reafirma con el

método de añadir lisina sólo a uno de ellos. Otros mecanismos observados son la sintasa de fosfatidilglicerol (PgsA) y la sintasa de cardiolipina (Cls) (228, 229, 231, 232, 233).

3.1.3. Sistemas de 2 componentes

Estos sistemas contienen diferentes unidades que sensan y responden al ambiente en donde se encuentra la bacteria. Están compuestos por un sensor o receptor que suele ser una histidina kinasa en la membrana plasmática, la cual transmite la información mediante el regulador de respuesta a través de fosforilaciones del dominio C-terminal. La activación de este sistema conlleva la participación de genes de virulencia, transportadores de iones y genes de remodelación de membrana. Se han identificado 2 grupos de estos sistemas, BceS-like intramembrane-sensing histidine kinases (IM-HK) que están ligadas a transportadores ABC y, LiaS-like IM-HK, que funciona como un sistema de 2 componentes (228, 232, 234).

El sistema BceRS-like se presenta en *Bacillus subtilis* donde tiene función de detoxificación contra péptidos antimicrobianos y regula la resistencia. La activación completa del sistema conlleva expresión de genes de transporte e hidrólisis de ATP. Sistemas similares se encuentran en *S. aureus* con el sistema BraRS, *Streptococcus mutans* con un operón *mbrABCD*, *E. faecalis* y *L. casei*. Los transportadores ABC a los que están ligados también funcionan para transporte de sustratos a través de la membrana, péptidos, aminoácidos, azúcares y antibióticos. Están compuestos de un dominio ATPasa expresado como un dominio de unión a nucleótido (NBD) y un dominio hidrofóbico conocido como dominio de permeasa o el dominio que abarca la membrana (228, 235, 236).

El sistema LiaRS está presente en casi todas las bacterias del phylum Firmicutes, responde principalmente a bacteriocinas que atacan la pared celular utilizando lípido II (como nisina), también a la falta de nutrientes, variaciones en temperatura, integridad de membrana y daño oxidativo. *S. mutans* presenta LiaRS que se relaciona directamente con la resistencia a bacitracina y en la formación de biofilm, y en *Listeria spp.* se ha encontrado que tiene un rol en la virulencia y en la protección contra péptidos antimicrobianos. Además de contribuir en la resistencia se ha encontrado que en cepas de *Streptococcus* que carecen de LiaR se vuelven avirulentos y no causan sepsis ni neumonía en ratones (228, 233, 234).

3.1.4. Degradación enzimática

El rol de las proteasas es otro factor importante tanto en la resistencia como en la formación de bacteriocinas, las proteasas de la cepa productora las activan, pero a su vez pueden ser desactivadas por proteasas de otros organismos. Para las bacteriocinas, la más estudiada y reconocida de las proteasas es la nisinasa producida por cepas de *Bacillus*, esta se produce en la esporulación de *Bacillus cereus* y *Paenibacillus polymyxa*. Esta nisinasa es activa también contra la subtilina, pero no contra antibióticos como bacitracina y polimixina, esta ausencia de resistencia cruzada es algo bueno, ya que si existiera, sería un problema para la aplicación clínica. La degradación de nisina se ha observado también en *L. lactis* con la proteasa NSR que cliva el dominio C-terminal de la nisina (228, 233, 237).

Otras proteasas se han asociado con la resistencia a péptidos antimicrobianos como elastasas de *P. aeruginosa*, proteasas de *P. mirabilis*, metaloproteasas de *Burkholderia cenocepacia*, proteasas de cisteína en *Streptococcus* del grupo A, aureolisina en *Staphylococcus* (228, 229, 231). Estas enzimas han demostrado degradar LL-37 y defensinas, LL-37 es un péptido antimicrobiano humano perteneciente a las catelicidinas cuyo lugar de

almacenamiento es en polimorfonucleares (PMN) y células epiteliales, con espectro de acción en cierto tipo de bacterias (238).

3.1.5. Bombas de eflujo

La principal bomba de eflujo y la más potente para conferir resistencia a antibióticos, solventes orgánicos y péptidos antimicrobianos es la bomba RND, esta bomba también se encuentra presente en las bacterias Gram negativo, principalmente en cepas de *Neisseria gonorrhoeae* y *Neisseria meningitidis*. La bomba MtrCDE es un ejemplo de esta familia en las especies mencionadas, la defensa se presenta contra péptidos antimicrobianos como LL-37 y protegrina-1. En *K. pneumoniae* se ha descrito la bomba AcrAB que ayuda con la resistencia a polimixina B y otros péptidos humanos. Otras especies bacterianas como *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. lactis*, *S. pneumoniae*, *L. monocytogenes*, también presentan bombas de eflujo dadas por transportadores ABC (228, 229, 231, 239).

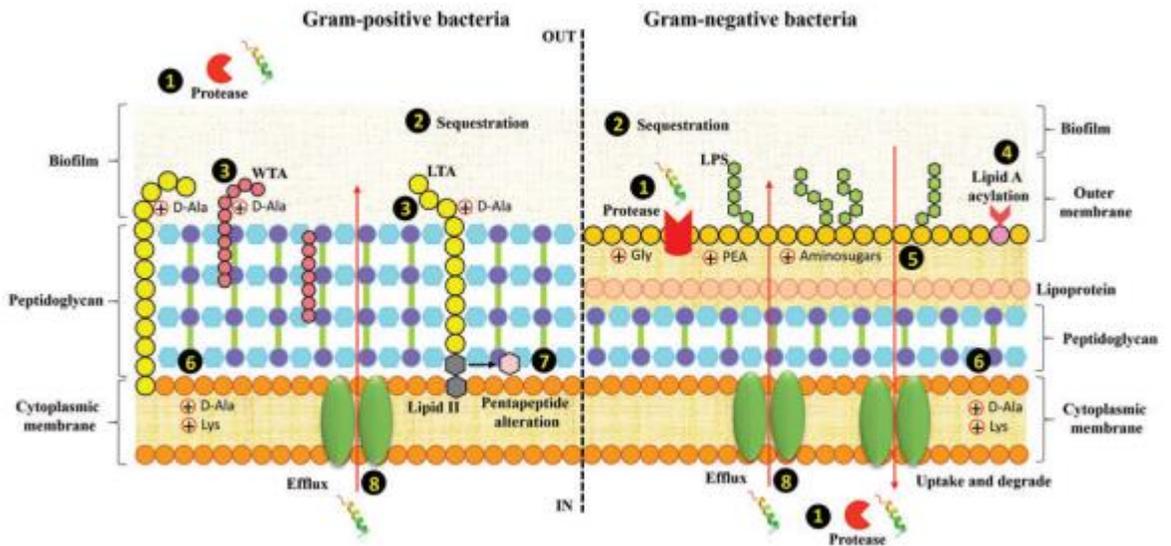


Figura 2. Mecanismos de resistencia a bacteriocinas en bacterias Gram positivo y negativo. Tomada de Baidara 2020.

3.2. Resistencia a nisina y clase II

La mayor parte de la resistencia a bacteriocinas se ha enfocado en nisina y bacteriocinas de clase IIa. En la primera se han detectado cepas mutantes de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *S. pneumoniae* y *S. bovis*, donde se ha relacionado con cambios en la pared y membrana celular. Para la clase II se observa en *L. monocytogenes* donde hay expresión reducida de una permeasa que actúa como posible receptor, cambios en la fluidez de la membrana y cargas en la superficie celular (3).

3.2.1. Resistencia a nisina

Una de las causas de la resistencia a nisina, además de las mencionadas en otros puntos de este capítulo, en *S. aureus* se da por el sistema BraRS, al ser un sistema de 2 componentes BraS reacciona a concentraciones de nisina y fosforila a BraR, esto provoca la activación de un transportador ABC (VraDE) que confiere la resistencia. Sin embargo, altas dosis de nisina tienen efecto contra las cepas de *S. aureus*. Se ha encontrado que mutaciones en la región *braXRS* provocan mayor expresión de estos transportadores, y por lo tanto, aumenta la resistencia. Otra mutación encontrada en el gen *nsaS* que codifica para el sensor de histidina kinasa (SHK) también ocasiona resistencia a nisina. Cuando se cultivaron cepas mutantes de *S. aureus* para el gen BraRS junto con nisina y nukacina, el crecimiento se mostró significativamente inhibido, por lo que el gen BraRS tiene efectos regulatorios entre la simbiosis de *S. aureus* con bacteriocinas de clase I (240, 241, 242, 243).

Otro mecanismo es la expresión de proteínas resistentes, el caso de la proteína resistente a nisina (NSR) fue identificada hace una décadas en cepas de *L. lactis* las cuales ejercen su función degradando la nisina (244). Similar a esta se encuentra una proteína de *Streptococcus agalactiae* llamada SaNSR lo cual le confiere resistencia intrínseca a nisina, el operón codificada el gen *nsr* y *nsrFP* para la proteína propiamente tal y el transportador ABC, respectivamente. Esta resistencia funciona porque imita la proteína de inmunidad de *L. lactis* (NisI) y también degrada la nisina (245).

3.2.2. Resistencia a clase II

Debido a la acción de las bacteriocinas de esta clase, la resistencia está dada alrededor del sistema de manosa fosfotransferasa (Man-PTS), este sistema es un transportador para la entrada de manosa, además de glucosa, fructosa y otros compuestos. También es el blanco de agentes antimicrobianos como bacteriocinas. Es por esto que en algunos estudios se ha encontrado que cuando el sistema Man-PTS está desregulado negativamente, se obtiene resistencia a este tipo de bacteriocinas (246, 247, 248). Sin embargo, en algunos casos la resistencia se muestra con expresión normal o incluso aumentada de Man-PTS, esta excepcionalidad coloca otros factores en la resistencia como la composición lipídica, la fluidez o la carga de la membrana en la interacción bacteriocina – fosfolípido. Por lo que cambios en la membrana dan una pequeña resistencia mientras que mutaciones o falta de expresión de Man-PTS determinaría una mayor resistencia (249). Man-PTS se puede dividir en grupos desde I a IV, siendo el grupo I el que se usa como receptor para la clase II, además depende de la localización y características de la membrana. En *E. coli*, por ejemplo, el operón que codifica para la subunidad IIa no se encuentra, y por lo tanto no puede ser usado como receptor específico (250).

En *E. faecium*, al mutar los genes que lo hacen susceptible a la clase IIa se da la resistencia, esta está ligada a la proteína activadora ManR, otro factor es la delección del ARN^{o54} el cual es responsable del reconocimiento de la región promotora de genes, la delección causó menor expresión en PTS que mutaciones en la proteína ManR, por esto se cree que hay más de una vía que controla la expresión de PTS (251). En cepas de *L. monocytogenes* se ha encontrado resistencia a pediocina, con mecanismo similar a *E. faecium*, dada por mutaciones en el operón *mptA* que codifica para permeasa de manosa que es una parte del complejo Man-PTS, este es el principal mecanismo de resistencia, junto a mutaciones en el operón *mpe* para otra permeasa de manosa y también en el gen *manR*. En *L. ivanovii* también se aislaron cepas resistentes a pediocina exponiéndolas a concentraciones crecientes de esta bacteriocina.

Como resultado en ambos estudios, se obtuvo que la resistencia está ligada al sistema Man-PTS que es el blanco de la bacteriocina (252, 253).

CONCLUSIÓN

El uso de bacteriocinas es una buena alternativa para combatir bacterias multirresistentes, sus beneficios se basan en la menor concentración (rango nano molar) a utilizar en comparación a los antibióticos, su acción está sujeta a su estructura proteica por lo que no se mantienen en el organismo por mucho tiempo. Sus características físico-químicas las mantienen estables y como se ha descrito en algunos casos, pueden ser modificadas por bioingeniería para crear mutantes con mayor efecto. Además, en algunos estudios, la combinación de bacteriocinas con antibióticos disminuye la concentración a utilizar de este último, lo que permite controlar su toxicidad en caso de que la presente (como lo que ocurre con colistín para *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*), la sinergia que presentan entre ambos compuestos se debe principalmente a que la bacteriocina sensibiliza a la bacteria, formando poros en la mayoría de los casos, permitiendo la entrada y acción del antibiótico.

La forma de purificar las bacteriocinas también depende del tipo, es por esto que utilizar el procedimiento adecuado permite obtener la mayor cantidad de bacteriocina. Por ejemplo, en el caso de las colicinas y microcinas, la expresión en plantas resulta ser más efectiva, mientras que las bacteriocinas de Gram positivo se expresan mejor en los cultivos bacterianos. Aunque se ha destacado que la producción en cultivos a menudo va acompañada de toxicidad, y la expresión en plantas podría acelerar el proceso, obtener mayor cantidad de bacteriocina, menor toxicidad, entre otros. El estudio de los estadios de la bacteriocina también es importante, hay bacteriocinas que funcionan mejor en estado planctónico como *S. epidermidis* ATCC12228, otras veces se evalúa el estado de sobrenadante sin purificar o crudo y luego se purifican por técnicas más específicas para probar su acción, siendo este último estado el que requiere menor concentración. De igual manera se puede encapsular la bacteriocina para extender sus características físico-químicas como el pH óptimo.

Cabe destacar que la terapia con bacteriocinas, ya sean purificadas o en acompañamiento de antibióticos, aún no está regulada en cuanto a la concentración a usar o cuál bacteriocina sería la más adecuada para cada bacteria y en qué casos debería usarse. Lo que sí es claro es que estos productos han demostrado ser inocuos para seres humanos y animales. En este contexto, se deben continuar estudios para evaluar las diferentes condiciones de utilización. En cuanto a la resistencia a bacteriocinas, no es lo más común, pero se han reportado mecanismos y la forma en la que ocurren, lo que da mayor capacidad para estudiarlas y así poder modificarlas para mejorar su mecanismo de acción sobre las bacterias blanco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tacconelli E, Magrini N. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. In: Carmeli Y, Harbarth S, Kahlmeter G, Kluytmans J, Mendelson M, Pulcini C, et al., editors. 27 February 2017.
2. Sumanpreet K, Sukhraj K. *Bacteriocins as Potential Anticancer Agents*. November 2015. *Frontiers in pharmacology*.
3. López, J., Ochoa, A., Santoyo, G., Anaya, J., Medina, E., Martínez, M., Loeza, P. *Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 39, núm. 3, julio-septiembre, 2008, pp. 49-57 Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. Distrito Federal, México
4. Lagha AB, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. *Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production*. 2017. *Veterinary research*.
5. Meindl K, Schmiederer T, Schneider K, Reicke A, Butz D, Keller S, et al. *Labyrinthopeptins: A New Class of Carbacyclic Lantibiotics*. 2010.
6. Perez R, Zendo T, Sonomoto K. *Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications*. Kyushu university, Japan: *Microbial cell factories*; September 2014. p. 1.
7. Meade, E., Slattery, M., Garvey, M. *Bacteriocins, potent antimicrobial peptides and the fight against multi drug resistente species: resistance is futile?*. *Antibiotics and Environment*. 2020. 9(1), 32.
8. Salazar, L., Galán, L., Moreno, V., Reyes, M., Pereyra, B. *Bacteriocins synthesized by Bacillus thuringiensis: generalities and potential applications*. *Rev Med Microbiol*. 2016. 27(3): 95 - 101.
9. Imran S. *Bacteriocin: an alternative to antibiotics*. Manac rachna internatinoal university: *World journal of pharmaceutical research*; October 2016. p. 467 - 77.
10. Ovchinnikov KV, Chi H, Mehmeti I, Holo H, Nes IF, Diepa DB. *Novel Group of Leaderless Multipeptide Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria*. September 2016.
11. Taylor and Francis Group. *Functional foods and biotechnology*. 2020.
12. Bartos, K., George, P., George, N., Hopper, J., Kaminska R. *Bifurcated binding of the OmpF receptor underpins import of the bacteriocin colicin N into Escherichia coli*. *JBC Papers*. 2020.
13. Mondragón, Guadalupe., Escalante, Pilar., Osuna, J., Ibarra, V., Morlett, J., Aguilar, C., Rodríguez, R. *Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos* Investigación y Ciencia, vol. 21, núm. 59, septiembre-diciembre, 2013, pp. 64-70 Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, México.
14. Simons, A., Alhanout, K., Duval, R. *Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria*. *Microorganisms*. 2020. 8(5), 639.
15. Budic M, Rijavec M, Petkova Z, Zgur-Bertok D (2011) *Escherichia coli Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia*. *PLoS ONE* 6(12).

16. Hahn, S., Stephan, A., Schulz, S., Schnedier, T., Shaverskyi, Tusé, D. *Colicins and Salmocins - New classes of plant-made non-antibiotic food antibacterials*. Front Plant Sci. 2019. 10:437.
17. Gabrielsen C, Brede D, Dzung N. *Circular bacteriocins: biosynthesis and mode of action*. Norwegian University of science and technology: Applied and Environmental Microbiology; November 2014. p. 6854 - 62.
18. Chung L, Raffatellu M. *G.I. pros: antimicrobial defense in the gastrointestinal tract*. Seminars in cell and developmental biology: Elsevier; February 2018.
19. Heredia P, Hernández A, González A, Vallejo B. *Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos*. Caracas, Venezuela: Asociación Interciencia; Junio 2017. p. 340 - 6.
20. Ghodhbane H, Elaidi S, Sabatier J-M, Achour S, Benhmida J, Regaya I. *Bacteriocins Active Against Multi-Resistant Gram Negative Bacteria Implicated in Nosocomial Infections*. 2015.
21. Mokoena P. *Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review*. University of KwaZulu: Molecules; July 2017.
22. Alvarez P, Montalbán M, Mu D, Kuipers O. *Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family*. Springer; February 2016. p. 2939 - 51.
23. Belicová A, Mikulášová M, Dusinský R. *Probiotic potencial and safety properties of Lactobacillus plantarum from Slovak Bryndza Cheese*. BioMed Research International; August 2013.
24. Mattia, A., Merker, R. *Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: premarket approval or "generally recognized as safe" notification*. Clinical Infectious Diseases. 2008. Vol. 46. S115-S118.
25. Pardini, M., Sousa, J., Pereira, P., Prado, J. *Phylogenetic distribution of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese*. Food Research International. 2020. Vol 128.
26. Barbour, A., Wescombe, P., Smith, L. *Evolution of lantibiotic salivaricins: new weapons to fight infectious diseases*. Trends in microbiology. 2020.
27. Draper L, Cotter P, Hill C, Ross P. *Lantibiotic resistance*. June 2015.
28. Prince, A., Sandhu, P., Ror, P., Dash, E., Sharma, S., Arakha, M., Jha, S., Akther, Y., Saleem, M. *Lipid-II independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization*. Scientific Reports. 2016. 6, 37908.
29. Galván, I., McKay, B., Wong, A., Cheetham, J., Bean, C., Golshani, A., Smith, M. *Mode of action of nisin on Escherichia coli*. Can J Microbiol. 2020. 66(2): 161 - 168.
30. Scherer, K., Wiedemann, I., Ciobanasu, C., Sahl, H., Kubitscheck, U. *Aggregates of nins with various bactoprenol containing cell wall precursors differ in size and membrane permeation capacity*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes. 2013. Vol. 1828. Issue 11. 2628 - 2636.
31. Scherer, K., Spille, J., Sahl, H., Grein, F., Kubitscheck, U. *The lantibiotic nisin induces lipid II aggregation, causing membrane instability and vesicle budding*. Biophys J. 2015. 108(5): 1114 - 1124.
32. Lubelski J, Rink R, Khusainov R, Moll G, Kuipers O. *Biosynthesis, immunity, regulation, mode of action and engineering of the model lantibiotic nisin*. Cellular and Molecular Life Sciences; October 2007. p. 455 - 76.

33. Ríos, N., Chalón, M., Dupuy, F., González, C., Bellomio, A. *The case for class II bacteriocins: a biophysical approach using "suicide probes" in receptor-free hosts to study their mechanism of action.* Biochimie. 2019. 183-195.
34. Shih-Chun Y, Chih-Hung L, Calvin S, Jia-You F. *Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals.* May 2014.
35. Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., C, H. *Class IIa bacteriocins: diversity and new developments.* Int. J. Mol. Sci. 2012. 16668-16707.
36. Bédard, F., Hammami, R., Zirah, S., Rebuffat, S., Fliss, I., Biron, E. *Synthesis, antimicrobial activity and conformational analysis of the class IIa bacteriocin pediocin PA-1 and analogs thereof.* Scientific Reports. 2018. Number 9029.
37. Fariziano, J., Masías, E., Hsu, F., Salomón, R., Freitag, N., Hebert, E., Minahk, C., Saavedra, L. *PrfA activation in Listeria monocytogenes increases the sensitivity to class IIa bacteriocins despite impaired expression of the bacteriocin receptor.* BBA-General Subjects. 2019. 1283-1291.
38. Kyriakou, P., Ekblad, B., Kristiansen, P., Kaznessis, Y. *Interactions of a class IIb bacteriocin with a model lipid bilayer, investigated through molecular dynamics simulations.* BBA-Biomembranes. 2016. Vol 1858. 824-835.
39. Nissen-Meyer, J., Oppergard, C., Rogne, P., Haugen, H., Kristiansen, P. *The two-peptide (Class IIb) bacteriocins: genetics, biosynthesis, structure, and mode of action.* Prokaryotic Antimicrobial Peptides. 2011.
40. Kumar, V., Pandey, A. *New and future developments in microbial technology and bioengineering.* 2019.
41. Perez RH, Zendo T and Sonomoto K *Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects.* 2018. Front. Microbiol. 9:2085. doi: 10.3389/fmicb.2018.02085
42. Vezina, B., Rehm, B., Smith, A. *Bioinformatic prospecting identified 99 novel, misannotated and unnoticed putative circular bacteriocins.* Research Square. 2019.
43. Ibrahim, O. *Classification of antimicrobial peptides bacteriocins, and the nature of some bacteriocins with potential applications in food safety and bio-pharmaceuticals.* EC Microbiology. 2019. 591-608.
44. Vezina, B., Rehm, B., Smith, A. *Bioinformatic prospecting and phylogenetic analysis reveals 94 undescribed circular bacteriocins and key motifs.* BMC Microbiology. 2020. 20:77.
45. Lozo, J., Mirkovic, N., O'Connor, P., Malesevic, M., Miljkovic, M., Polovic, N., Jovicic, B., Cotter, P., Kojic, M. *Lactolisterin BU, a novel class II broad spectrum bacteriocin from Lactococcus lactis subsp. lactis bc. diacetyllactis BGBU1-4.* Appl. Environ. Microbiol. 2017. 83(21):e01519-17.
46. Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications.* 2016.
47. Chen, W., Narbad, A. *Lactic acid bacteria in foodborne hazards reduction: physiology to practice.* 2018.
48. Basanta, A., Gómez, B., Sánchez, J., Diep, D., Herranz, C., Hernández, P., Cintas, L. *Use of the yeast Pichia pastoris as an expression host for secretion of enterocin L50, a leaderless two-peptide (L50A and L50B). Bacteriocin from Enterococcus faecium L50.* Applied and Environmental Microbiology. 2010. 3314-3324.
49. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. *The genus Enterococcus: between probiotic potential and safety concerns- an update.* Front. Microbiol. 2018.

50. Kristiansen, P., Persson, C., Fuochi, V., Pedersen, A., Karlsson, G., Nissen-Meyer, J., Oppedgaard, C. *Nuclear magnetic resonance structure and mutational analysis of the lactococcin A immunity protein*. *Biochemistry*. 2016. 55; 6250-6257.
51. Ge, J., Kang, J., Ping, W. *Effect of acetic acid on bacteriocin production by Gram-positive bacteria*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2019. 29(9), 1341-1348.
52. Zhan, Z. *Optimizing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria isolated from foods using improved deferred antagonism assay*. 2017.
53. Newstead, L., Varjonen, K., Nutfall, T., Paterson, G. *Staphylococcal produced bacteriocins and antimicrobial peptides: their potential as alternative treatments for Staphylococcus aureus infections*. *Antibiotics*. 2020. 9, 40.
54. Kumariya, R., Kumari, A., Rajput, Y., Sood, S., Akhtar, N., Patel, S. *Bacteriocins: classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria*. *Microbial Pathogenesis*. 2019. 171-177.
55. Franz, C., Belkum, M., Holzappel, W., Abriouel, H., Gálvez, A. *Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2007. Vol 31. 293-310.
56. Zacharof, M., Lovitt, R. *Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. A review article*. *APCBEE Procedia*. 2012. 50-56.
57. Acuña, M., Benadof, D., Jadue, C., Hormazábal, J., Alarcón, P., Contreras, J. et al. *Staphylococcus aureus resistente a meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC): comunicación de los primeros cuatro casos pediátricos descritos en Hospital de Niños Roberto del Río*. *Rev. chil. infectol.* 2015 Jun; 32(3): 350-356.
58. Pasachova, J., Ramírez, S., Muñoz, L. *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular*. 2019. Vol 17. No 32.
59. Fareed, M. *Brief history of Staphylococcus aureus: a focus to antibiotic resistance*. *EC Microbiology*. 2017. 36-39.
60. Nodarse, R., del Campo, R. *Staphylococcus aureus resistente a meticilina como causa de infección de piel y partes blandas*. *Rev Cub Med Mil* . 2013 Mar; 42(1): 116-123.
61. Foster, T. *Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2017. Vol 41. 430-449.
62. Aguayo, A., Quezada, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo, A., Bello, H., Domínguez, M., González, G. *Bases moleculares de la resistencia a meticilina en Staphylococcus aureus*. *Rev. chil. infectolo.* 2018. 35 (1): 7 - 14.
63. Acuña, M., Cifuentes, M., Silva, F., Rojas, A., Cerda, J., Labarca, J. *Incidencia de bacterias multi-resistentes en unidades de cuidados intensivos de hospitales chilenos*. *Rev. chil. infectolo.* 2017. 34 (6): 570 - 575.
64. Cervantes, E., García, R., Salazar, P. *Importancia de Staphylococcus aureus meticilina resistente intrahospitalario y adquirido en la comunidad*. *Rev. Latinoam. Patol. Clin. Med Lab*. 2014. 61 (4): 196 - 204.
65. Gamboa, A., Rómulo, F., Martínez, A., Alarcón, C., Valverde, F., Almanzor, D., Campos, R. *Portadores de bacterias multirresistentes de importancia clínica en áreas críticas (UCI - UCIN) de un hospital al norte de Perú*. *Horiz Med*. 2016. 16 (3): 50 - 57.
66. Feleke, T., Eshetle, S., Dagne, M., Endris, M., Abebe, W., Tiruneh, M., Moges, F. *Multidrug-resistant bacterial isolates from patients suspected of nosocomial infections at the University of Gondar comprehensive specialized hospital, Northwest Ethiopia*. *BMC Res Notes*. 2018. 11:602.
67. Instituto de Salud Pública. *Vigilancia de Staphylococcus aureus meticilina resistente adquirido en la comunidad*. Chile, 2012 - 2016

68. Arumugumam, T., Dhanam, S., Rameshkumar, N., Krishnan, M., Kayalvizhi, N. *Inhibition of methicillin resistant Staphylococcus aureus by bacteriocin producing Pseudomonas aeruginosa*. International journal of peptide research and therapeutics. 2019. 25: 339 - 348.
69. Arumugumam, T., Dhanam, S., Gattu, S., Kayalvizhi, N. *Efficacy of partial purified bacteriocin of Pseudomonas aeruginosa on methicillin resistant Staphylococcus aureus biofilm*. Journal of drugs delivery and therapeutics. 2019. 9 (4-A): 438 - 441.
70. Ansari, A., Rahmat, R., Mukthar, O., Ali, S., Aman, A. *Screening, purification and characterization of thermostable, protease resistant bacteriocin active against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. BMC microbiology. 2018. 18: 192.
71. Ansari, A., Naveed, N., Ghani, M., Aman, S., Ali, S. *Plasmid borne BAC-IB17: localization of a potential antibacterial positive marker (Bac+) encoded broad inhibitory spectrum bacteriocin*. Pak. J. Pharm. Sci. 2015. Vol 28. No 4. 1331-1335.
72. Ansari, A., Pervez, S., Javed, U., Ishaque, M., Asid, M., Ali, S. *Characterization and interplay of bacteriocin and exopolysaccharide-mediated silver nanoparticles as an antibacterial agent*. Biomac. 2018.
73. Okuda, K., Zendo, T., Sugimoto, S., Iwase, T., Tajima, A., Yamada, S., Sonomoto, K., Mizunoe, Y. *Effects of bacteriocins on methicillin resistant Staphylococcus aureus biofilm*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2013. p. 5572 - 5579.
74. Fujinami, D., Mahin, A., Elsayed, K., Islam, M., Nagao, J., Roy, U., Momin, S., Zendo, T., Kohda, D., Sonomoto, K. *The lantibiotic nukacin ISK-1 exists in an equilibrium between active and inactive lipid II binding states*. Communications Biology. 2018. Article 150.
75. Imran, S., Gupta, T., Arora, A., Das, N. *A comparative study of antimicrobial profile having broad spectrum bacteriocins against antibiotics*. Asian J Pharm Clin Res. 2017. Vol 10. 44-47.
76. Bergamo, F., Albano, M., Murbach, B., Chechi, J., Marques, A., Furlanetto, A., Mores, V. *Comparative proteomics of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus subjected to synergistic effects of the lantibiotic nisin and oxacillin*. Microbial Drug Resistance. 2019.
77. Ellis, J., Ross, R., Hill, C. *Nisin Z and lactacin 3147 improve efficacy of antibiotics clinically significant bacteria*. Future Microbiol. 2019. 14(18), 1573-1587.
78. Atya, A., Belguesmia, Y., Chataigne, G., Ravallec, R., Vachée, A., Szunerits, S., Boukherroub, R., Drider, D. *Anti MRSA activities of enterocins DD28 and DD93 and evidences on their role in the inhibition of biofilm formation*. Frontiers in microbiology. 2016. Vol 7. Article 817.
79. Jang, I., Yang, M., Kim, H., Park, J. *Novel cytoplasmic bacteriocin compounds derived from Staphylococcus epidermidis selectively kill Staphylococcus aureus, including Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Pathogens. 2020. 9,87.
80. Álvarez, L., Blanco, A. *Evaluación de las condiciones de operación de un bio-reactor para la producción de nisina*. Medellín. 2014.
81. Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F, Nakayama, J., Sonomoto, K. *Structural analysis and characterization of Lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria*. Applied and Environmental Microbiology. 2007. p. 2871-2877.
82. Raza, T., Ullah, S., Mehmood, K., Andleeb, S. *Vancomycin resistant Enterococci: A brief review*. Journal of the Pakistan Medical Association. 2018. Vol 68. Issue 5.
83. Ahmed, M., Baptiste, K. *Vancomycin-resistant Enterococci: A review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health*. Microbial drug resistance. 2018. Vol 24. Number 5.

84. Cercenado, E. *Enterococcus: resistencias fenotípicas y genotípicas y epidemiología en España*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011. 29(5): 59 - 65.
85. Levitus, M., Rewane, A., Perera, T. *Vancomycin Resistant Enterococci (VRE)*. StatPearls. 2020.
86. Duarte, L., Arbo, A., Gallardo, M., Riquelme, I., Delgadillo, L., Jiménez, H. *Factores asociados a colonización por Enterococo spp. resistente a vancomicina en una unidad de cuidados intensivos pediátricos del Paraguay: estudio transversal sobre historias clínicas*. *Medwave*. 2019. 19(8): 7694.
87. MacDougall, C., Johnstone, J., Prematunge, C., Adomako, K., Nadolny, E., Truong, E., Saedi, A., Garber, G., Sander, B. *Economic evaluation of vancomycin resistant enterococci (VRE) control practices: a systematic review*. *Journal of Hospital Infection*. 2020. Vol 105. 53 - 63.
88. Lopardo, H. *La resistencia a vancomicina más allá de los enterococos*. *Medicina infantil*. 2016. XXIII: 303 - 307.
89. Estrada, A., Mendo, R., Astocondor, L., Zervos, M., García, C. *Colonización por enterococo resistente a vancomicina en pacientes internados en un hospital de Lima, Perú*. *Rev. perú. med. exp. salud publica*. 2017. vol 34. no 4.
90. Lozano, C., Torres, C. *Actualización en la resistencia antibiótica en Gram positivos*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017. Vol 35. 2 - 8.
91. ISP. *Vigilancia de Enterococcus spp. resistente a vancomicina Chile, 2010 - 2012*. Septiembre 2013. Vol 3. Número 10.
92. Bernal, C., Takahasi, V., Vega, M. *Prevalencia de Enterococos resistentes a la vancomicina en un Servicio de Cuidados Intensivos de adultos*. *Rev. Nac. (Itauguá)*. 2015; 7 (1): 24 - 27.
93. Nuñez, L., Tornello, C., Puentes, N., Espigares, E., Moreno, E., Espigares, M., Moreton, J. *Hospital effluent constitutes a source of vancomycin-resistant Enterococci*. *Ars. Pharm*. 2016; 57 (3): 121 - 126.
94. Buetti, N., Wassilew, N., Rion, V., Senn, L., Gardiol, C., Widmer, A., Marschall, J. *Emergence of vancomycin-resistant Enterococci in Switzerland: a nation-wide survey*. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2019. 8:16.
95. Markwart, R., Willrich, N., Haller, S., Noll, I., Koppe, U., Werner, G., Eckmanns, T., Reuss, A. *The rise of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Germany: data from the German Antimicrobial Resistance Surveillance (ARS)*. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2019. 8:147.
96. McClintock, M., Kaznessis, Y., Hackel, B. *Enterocin A mutants identified by saturation mutagenesis enhance potency towards vancomycin-resistant Enterococci*. *Biotechnol Bioeng*. 2016. 113(2): 414 - 423.
97. Phumisantiphong, U., Siripanichgon, K., Reamtong, O., Diraphat, P. *A novel bacteriocin from Enterococcus faecalis 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant Enterococci*. *PLoS ONE*. 2017. 12(10).
98. Sabry, S., Tharwat, N. *The effect of lantibiotic nisin on the inhibitory and bactericidal activities of antibiotics used against vancomycin resistant enterococci*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2020.
99. Ellis, J., Ross, R., Hill, C. *Nisin Z and lacticin 3147 improve efficacy of antibiotics against clinically significant bacteria*. *Future Microbiology*. 2020. 14(18).
100. Aldarhami, A., Felek, A., Sharma, V., Upton, M. *Purification and characterization of nisin P produced by a strain of Streptococcus gallolyticus*. *Journal of Medical Microbiology*. 2020. 69: 605 - 616.

101. Ovchinnikov, K., Kristiansen P., Straume, D., Jensen, M., Aleksandrak, T., Nes, I., Diep, D. *The leaderless bacteriocin Enterocin K1 is highly potent against Enterococcus faecium: a study on structure, target spectrum and receptor*. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Volume 8. Article 774.
102. Nguyen, N., Nakphaichit, M., Nitisinprasert, S., Roytrakul, S. *Purification and characterization of a novel bacteriocin against vancomycin resistant enterococci produced by Enterococcus hirae HM02-04*. *Applied Science and Engineering Progress*. 2020.
103. Berghe, E., Winter, T., Vuyst, L. *Enterocin A production by Enterococcus faecium FAIR-406 is characterised by a temperature- and pH- dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion*. *International Journal of Food Microbiology*. 2006. 159 - 170.
104. Djadouni, F. *Study of bacteriocin produced by Enterococcus faecium strain isolated from traditional fermented tomatoes in Algeria*. *Asian Journal of Biological Sciences*. 2017. 10: 130 - 137.
105. Zhou, H., Zhang, K., Chen, W., Chen, J., Zheng, J, Liu, C, Cheng, L., Zhou, W., Shen, H., Cao, X. *Epidemiological characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae collected from 17 hospitals in Nanjing district of China*. *Antimicrobial Resistance Infection Control* 9. Article 15. 2020.
106. Pintos, I., Cantero, M., Muñoz, E., Sánchez, I., Asensio, Á., Ramos, A. *Epidemiología y clínica de las infecciones y colonizaciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital de tercer nivel*. *Rev Esp Quimioter*. 2020. 33(2): 122 - 129.
107. ISP. *Vigilancia de carbapenemasas en bacterias que pueden producir Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), Chile 2014 - 2017*. Agosto 2018. Vol 8. Número 8.
108. Gijón, D. *Estudio microbiológico y epidemiológico de enterobacterias productoras de carbapenemasas de tipo VIM y OXA-48*. Facultad de farmacia, Madrid. 2019.
109. Muro, M. *Carbapenemasas: un mecanismo de resistencia bacteriana frente a las carbapenemasas, antibióticos de último recurso*. Facultad de farmacia. SF.
110. Canet, J. *Escherichia coli: características, patogenicidad y prevención (I)*. Betelgeux. 2016.
111. Rodríguez - Angeles, G. *Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli*. *Salud pública Méx*. 2002. Vol 44. Número 5.
112. Durán, L. *Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario*. *Revista médica clínica Las Condes*. 2018; 29(2) 213-221.
113. De Sousa, L., Chacare, M., Cuaical, N., Ashby, A. *Primer aislamiento de Escherichia coli productora de carbapenemasa tipo New Delhi (NDM) en un hospital de Ciudad Guayana, Venezuela. A propósito de dos casos*. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 2016. Vol 36. No 114.
114. Correa, C., Castro, E., Salamanca, D., Bustacara, L., Lemos, E. *Escherichia coli productora de Nueva Delhi metalo-β-lactamasa en Colombia: reporte de caso*. *Servicio de Infectología. Hospital Occidente de Kennedy. Bogotá, Colombia*. 2016.
115. Allen, R., Douglas, A., Bansal, G., Eribo, B. *Isolation and characterization of L. parafarraginis (KU495926) inhibiting multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase gram-negative bacteria*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and food sciences*. 2019: 8(4) 1041 - 1053.
116. Lojewska, E., Sakowicz, T., Kowalczyk, A., Konieczka, M., Grzegorzczak, J., Sitarek, P., Skala, E., Czarny, P. *Production of recombinant colicin M in Nicotiana tabacum plants and its antimicrobial activity*. *Plant Biotechnology Reports*. 2020. 14: 33 – 43.
117. Jin, X., Kightlinger, W., Hoom, S. *Optimizing cell-free protein synthesis for increased yield and activity of colicins*. *Methods Protoc*. 2019. 2, 28.

118. Binte, F., Reza, M., Abdullah, M., Kamal, Md., Seraj, M. *Preliminary characterization and inhibitory activity of bacteriocin like substances from Lactobacillus casei against multi-drug resistant bacteria*. Bangladesh J Microbiol. 2019. Vol 36. No 1.
119. Mechai, A., Debabza, M., Zouari, S. *Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milks against multi-drug resistant and β -lactamases producing pathogenic bacteria*. Res J Biotech. 2020. Vol 15 (4).
120. Biswas, K., Upadhayay, S., Freddyleen, G., Ram, S. *Antibacterial and synergistic activity against β -lactamase-producing nosocomial bacteria by bacteriocin of LAB isolated from lesser known traditionally fermented products of India*. Hayati Journal of Biosciences. 2017. 24: 87 – 95.
121. Lu, S., Graca, T., Avillan, J., Zhao, Z., Call, D. *Microcin PDI inhibits antibiotic-resistant strains of Escherichia coli and Shigella through a mechanism of membrane disruption and protection by homotrimer self-immunity*. Applied and Environmental Microbiology. 2019. Vol 85. No 11.
122. Zhao, Z., Orfe, L., Liu, J., Lu, S., Besser, T., Call, D. *Microcin PDI regulation and proteolytic cleavage are unique among known microcins*. Sci Rep. 2017. 7: 42529.
123. Sanctis, G., Ferraris, A., Ducatenzeiler, L., Benso, J., Fernández, L., Angriman, F. *Factores predictores de mortalidad intrahospitalaria en pacientes adultos con infecciones por Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenémicos y colistín: un estudio de cohorte retrospectivo*. Rev Chilena Infectol. 2018. 35(3): 239 – 245.
124. Vera, A., Barría, C., Carrasco, S., Lima, C., Aguayo, A., Domínguez, M., Bello, H., González, G. *KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias*. Rev Chilena Infectol. 2017. 34(5): 476 – 484.
125. Montúfar, F., Mesa, M., Aguilar, C., Saldarriaga, C., Quiroga, A., Builes, C., Villa, J., Zuleta, J. *Experiencia clínica con infecciones causadas por Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia*. Infectio. 2016. 20(1): 17 – 24.
126. Salgado, P. *Factores de riesgo de colonización intestinal por enterobacterias productoras de carbapenemasas al ingreso en una unidad de cuidados críticos*. Universidad Autónoma de Madrid. 2017.
127. Lespada, M., Córdova, E., Roca, V., Gómez, N., Badía, M., Rodríguez, C. *Bacteriemia por Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC. Estudio comparativo y evolución en 7 años*. Rev Esp Quimioter. 2019. 32(1): 15 – 21.
128. Márquez, K., Rojas, A., Camacho, G. *Klebsiella productora de carbapenemasa en pediatría: revisión de literatura*. Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica. 2017. Vol 30. 107 – 115.
129. López, M., Bischofberger, C., Sáez, D., García, L. *Epidemiología de la diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas en un hospital comercial y un hospital de media estancia en Madrid*. Rev Esp Quimioter. 2017. 30(6): 458 – 463.
130. Falco, A., Barrios, Y., Torres, L., Sandra, L., Takiff, H. *Epidemiología molecular de aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela*. Invest clín. 2017. Vol 57. No 1.
131. Cardozo, H., Auxiliadora, A., Velázquez, G., Ortellado, J. *Prevalencia de aislamientos bacterianos resistentes a carbapenémicos obtenidos a partir de urocultivos en el Hospital de Clínicas. San Lorenzo, Paraguay (2017 – 2018)*. Revista Discover Medicine. 2019. Vol 3. No 2.

132. Aires, M., Ortiz, J., Goncalves, M., Pereira, A., Nordmann, P., Poirel, L. *Epidemiology of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital, Portugal*. Emerging Infectious Diseases. 2019. Vol 25. No 9.
133. Milijkovic, M., Jovanovic, S., O'Connor, P., Mirkovic, N., Jovic, B., Filipic, B., Dinic, M., Studholme, D., Fira, D., Cotter, P., Kojic, M. *Brevibacillus laterosporus strains BGSP7, BGSP9 and BGSP11 isolated from silage produced broad spectrum multi-antimicrobials*. Plos One. 2019.
134. Yang, X., Huang, E., Yousef, A. *Brevibacillin, a cationic lipopeptide that binds to lipoteichoic acid and subsequently disrupts cytoplasmic membrane of Staphylococcus aureus*. Microbiological Research. 2017. 18 – 23.
135. Wu, Y., Zhou, L., Lu, F., Bie, X., Zhao, H., Zhang, C., Lu, Z., Lu, Y. *Discovery of a novel antimicrobial lipopeptide, brevibacillin V, from Brevibacillus laterosporus fmb70 and its application on the preservation of skim milk*. Agric Food Chem. 2019.
136. Baidara, P., Singh, N., Ranjan, M., Nallabelli, N., Chaudhry, V., Pathania, G., Sharma, N., Kumar, A., Patil, P., Korpole, S. *Laterosporulin 10: a novel defensin-like class IId bacteriocin from Brevibacillus sp. Strain SKDU10 with inhibitory activity against microbial pathogens*. Microbiology. 2016. 162, 1286 – 1299.
137. Marche, M., Satta, A., Floris, I., Lazzeri, A., Ruiu, L. *Inhibition of Paenibacillus larvae by an extracellular protein fraction from a honeybee-borne Brevibacillus laterosporus strain*. Microbiological Research. 2019.
138. Denkovskiene, E., Paskevicius, S., Misiunas, A., Stockunaite, B., Starkevicius, U., Vitkauskienė, A., Hahn, S., Schulz, S., Giritch, A., Gleba, Y., Razanskiene, A. *Broad and efficient control of Klebsiella pathogens by peptidoglycan-degrading and pore-forming bacteriocins klebicins*. Scientific Reports. 2019. 9:15422.
139. Yaghoubi, A., Khazaei, M., Avan, A., Hasanian, S., Soleimanpour, S. *The bacterial instrument as a promising therapy for colon cancer*. Int J Colorectal Dis. 2020. 35: 595 – 606.
140. Kon, K., Rai, M. *Antibiotic resistance. Mechanisms and new antimicrobial approaches*. Elsevier. 2016.
141. Tkhruni, F., Aghajanyan, A., Balabekyan, T., Khachatryan, T., Karapetyan, K. *Characteristic of bacteriocins of Lactobacillus rhamnosus BTK 20-12 potential probiotic strain*. Probiotics and antimicrobial proteins. 2020. 12: 716 – 724.
142. Paz, V., *Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria*. Rev chil Infectol. 2019. Vol 36. No 2.
143. Bush, L., Schmidt, Ch., Perez, M. *Infecciones por Pseudomonas y patógenos relacionados*. {Internet} Manual MSD. 2018. Visitado 27 junio 2020. Disponible en <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacilos-gramnegativos/infecciones-por-pseudomonas-y-pat%C3%B3genos-relacionados>
144. Valderrama, S., González, P., Caro, M., Ardila, N., Ariza, B., Gil, F., Álvarez, C. *Factores de riesgo para bacteriemia por Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano*. Biomédica. 2016. 36: 69 – 77.
145. About Carbapene-resistant Pseudomonas aeruginosa (CRPA){Internet} Minnesota Department of Health. 2019. Visitado 25 junio 2020. Disponible en <https://www.health.state.mn.us/diseases/crpa/basics.html>
146. Buehrle, D., Shields, R., Clarke, L., Potoski, B., Clancy, C., Nguyen, H. *Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and microbiologic treatment failure*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2017. Vol 61. No 1.

147. Walters, M., Grass, J., Bulens, S., Hancock, E., Phipps, E., Muleta, D., Mounsey, J., Kainer, M., Concannon, C. *Carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa at US emerging infections program sites, 2015*. Emerging Infectious Diseases. 2019. Vol 25. No 7.
148. Xu, C., Wang, D., Zhang, X., Liu, H., Zhu, G., Wang, T., Cheng, Z., Wu, W., Bai, F., Jin, Y. *Mechanisms for rapid evolution of carbapenem resistance in a clinical isolate of Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2020.
149. Shu, J., Kuo, A., Su, L., Liu, T., Lee, M., Su, I., Wu, T. *Development of carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa is associated with OprD polymorphisms, particularly the amino acid substitution at codon 170*. J Antimicrob Chemother. 2017.
150. Suresh, M., Skariyachan, S., Narayanan, N., Rajamma, J., Ramakrishnan, M. *Mutational variation analysis of oprD porin gene in multidrug-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Microbial Drug Resistance. 2019.
151. Beig, M., Taheri, M., Arabestani, M. *Expression of MexAB-OprM efflux pump and OprD porin in carbapenemase producing Pseudomonas aeruginosa clinical isolates*. Gene Reports. 2020.
152. Bravo, L. *Resistencia antibiótica en Pseudomonas aeruginosa: situación epidemiológica en España y alternativas de tratamiento*. Facultad Farmacia. Universidad Complutense. Trabajo de fin de grado. 2018.
153. Morales, S., Gallego, M., Vanegas, J., Jiménez, N. *Detection of carbapenem resistance genes in Pseudomonas aeruginosa isolates with several phenotypic susceptibility profiles*. Rev CES Med. 2018. 32(3): 203 – 214.
154. Pesingi, P., Singh, B., Pesingi, P., Bhardwaj, M., Singh, S., Kumawat, M., Sinha, D., Gandham, R. *MexAB-OprM efflux pump of Pseudomonas aeruginosa offers resistance to carvacrol: a herbal antimicrobial agent*. Front Microbiol. 2019.
155. Pan, Y., Xu, Y., Wang, Z., Fang, Y., Shen, J. *Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa*. Arch Microbiol. 2016.
156. Xu, Y., Niu, H., Hu, T., Zhang, L., Su, S., He, H., Wang, H., Zhang, S. *High expression of metallo- β -lactamase contributed to the resistance to carbapenem in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from Baotou, China*. Infect Drug Resist. 2020. 12: 35 – 43.
157. Tafti, F., Eslami, G., Zandi, H., Barzegar, K. *Mutations in nalC gene of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa isolated from burn wounds in Yazd, Iran*. Iran J Microbiol. 2020. 12(1): 32 – 36.
158. Moubareck, C., Halat, D., Akkawi, C., Nabi, A., AlSharhan, M., AlDeesi, Z., Peters, C., Celiloglu, H., Sarkis, D. *Role of outer membrane permeability, efflux mechanism, and carbapenemases in carbapenem-nonsusceptible Pseudomonas aeruginosa from Dubai hospitals: results of the first cross-sectional survey*. International Journal of Infectious Diseases. 2019. 143 – 150.
159. Asempa, T., Motos, A., Abdelraouf, K., Bissantz, C., Zampaloni, C., Nicolau, D. *Meropenem-nacubactam activity against AmpC-overproducing and KPC-expressing Pseudomonas aeruginosa in a neutropenic murine lung infection model*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2019.
160. Pérez, M., Torrens, G., Castillo, J., Moya, B., Zamorano, L., Cabot, G., Hultenby, K., Alberti, S., Mellroth, P., Henriques, B., Normark, S., Oliver, A., Juan, C. *Impact of AmpC derepression on fitness and virulence: the mechanism or the pathway?*. American Society of Microbiology. 2016. Vol 7. No 5.
161. Otaíza, F., Orsini, M., Pohlenz, M., Tarride, T. *Informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud*. Ministerio de Salud. 2017.

162. Acuña, M., Cifuentes, M., Silva, F., Rojas, Á., Cerda, J., Labarca, J. *Incidencia de bacterias multi-resistentes en unidades de cuidados intensivos de hospitales chilenos*. Rev Chilena Infectol. 2017. 34(6): 570 – 575.
163. ISP. *Boletín de resistencia antimicrobiana*. Programa de control de infecciones asociadas a la atención en salud. 2018
164. Salvador, G., García, R., Gonzales, E. *Caracterización de metalo- β -lactamasas en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* recuperados de pacientes hospitalizados en el Hospital Militar Central*. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2018. 35(4).
165. Giono, S., Santos, J., Morfín, M., Torres, F., Alcántar, M. *Estrategia nacional de acción contra la resistencia antimicrobiana, las redes de laboratorios, el grupo ESKAPE en México y el manejo de la resistencia antimicrobiana en el tratamiento en infecciones causadas por *Helicobacter pylori**. Gaceta Médica de México. 2020.
166. López, A., Rocha, R., Bello, E., Juárez, C., Sáenz, Y., Castañeda, M., Lítez, L. *Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variantes recovered from a Mexican hospital*. Infect Drug Resist. 2018.
167. Grass, J., Bulens, S., Bamberg, W., Janelle, S., Schutz, K., Jacob, J., Bower, C. *Epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* identified through the emerging infections program (EIP), United States, 2016-2018*. Open Forum Infect Dis. 2019.
168. Goncalves, I., Cavalcanti, R., Ferreira, M., Fonseca, D., Gontijo, P., Ribas, R. *Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation*. Brazilian Journal of Microbiology. 2017. Vol 48. No 2. 211 – 217.
169. Velasco, J., Valderama, M., Peacock, T., Warawadee, N., Nogrado, K., Navarro, F. *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and Nonfermentative bacteria, the Philippines, 2013 – 2016*. Emerging Infectious Diseases. 2017. Vol 23. No 9.
170. Pas̄kevičius, S., Starkevič, U., Misiūnas, A., Vitkauskienė, A., Gleba, Y., Raz̄anskienė, A. *Plant-expressed pyocins for control of *Pseudomonas aeruginosa**. Plos One. 2017.
171. Behrens, H., Lowe, E., Gault, J., Housden, N., Kaminska, R., Weber, M., Thompson, C., Mislin, G., Schalk, I. *Pyocin S5 import into *Pseudomonas aeruginosa* reveals a generic mode of bacteriocins transport*. American Society for Microbiology. 2020. Vol 11. No 2.
172. Redero, M., Aznar, J., Prieto, A. *Antibacterial efficacy of R-type pyocins against *Pseudomonas aeruginosa* on biofilms and in a murine model of acute lung infection*. J Antimicrob Chemother. 2020.
173. Afshan, S., Jabeen, N., Sohail, M., Rasool, S. *Biophysicochemical characterization of pyocin SA189 produced by *Pseudomonas aeruginosa* SA189*. Baz J Microbiol. 2015. Vol 46. No 4.
174. Ghequire, M., Öztürk, B. *A colicin M-type bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa* targeting the HxuC heme receptor requires a novel immunity partner*. American Society for Microbiology. 2018.
175. Saha, S. *A tale of two tails: characterization of R-type and F-type pyocins of *Pseudomonas aeruginosa**. Department of Molecular Genetics. University of Toronto. 2016.
176. Tanhaeian, A., Sadegh, M., Mansruy, D., Ghaznini, K. *Expression in eukaryotic cells and purification of synthetic gene encoding enterocin P: a bacteriocin with broad antimicrobial spectrum*. AMB Expr. 2019.
177. Pirkhezranian, Z., Tanhaeian, A., Mirzaii, M., Hadi, M. *Expression of enterocin-P in HEK platform: evaluation of its cytotoxic effects on cancer cell lines and its potency to interact with cell-surface glycosaminoglycan by molecular modeling*. Internatinoal Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2019.

178. Criado, R., Gutiérrez, J., Martín, M., Herranz, C., Hernández, P., Cintas, L. *Immunochemical characterization of temperature-regulated production of enterocin L50 (EntL50A and EntL50B), enterocin P, and enterocin Q by Enterococcus faecium L50*. Applied and Environmental Microbiology. 2006. 7634 – 7643.
179. Kadhum, M., Ismeel, M., Jabbar, F., Mohammed, S., Nayyef, H. *Antimicrobial effect of probiotic Lactobacillus spp. on Pseudomonas aeruginosa*. J. Contemp. Med. Sci. 2017. Vol 3. No 10. 218 – 223.
180. Jovicic, B., Lepsanovic, Z., Suljagic, V., Rackov, G., Begovic, J., Topisirovic, L., Kojic, M. *Emergence of NDM-1 metallo- β -lactamase in Pseudomonas aeruginosa clinical isolates from Serbia*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011. 3929 – 3931.
181. Hamied, L., Satar, H., Ghadban, I. *Antibacterial immunomodulatory and antibiofilm triple effect of salivaricin LHM against Pseudomonas aeruginosa urinary tract infection model*. International Journal of Biological Macromolecules. 2019. 1132 – 1144.
182. Therdtatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S., Nitilsinprasert, S. *Characterization of antimicrobial substance from Lactobacillus salivarius KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling*. SpringerPlus. 2016. 5:1060.
183. Barbour, A., Wescombe, P., Smith, L. *Evolution of lantibiotic salivaricins: new weapons to fight infectious diseases*. Trends in Microbiology. 2020.
184. Barletta, R., Pérez, L., Castro, G., Pérez, M., Barletta, J., Pérez, Y. *Acinetobacter baumannii multirresistente: un reto para la terapéutica actual*. Medisur. 2018. Vol 16. No 185.
185. Saavedra, C., Arias, G., Gualtero, S., Leal, A., Saavedra, S., Murcia, M. *Factores de riesgo para infección o colonización por Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos en pacientes adultos hospitalizados en unidades de cuidado intensivo, Bogotá, Colombia*. Infectio. 2016. Vol 20. No 4. 238 – 249.
186. Barboza, L., Fernández, H., Chacín, L., Briceño, P., Salas, J., Ortiz, J. *Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis aguda en pacientes críticos*. Redieluz. 2017. Vol 7. No 1.
187. Alcántar, M., Rosales, R., Jarillo, M., Gayosso, C., Fernández, J., Toledano, J., Giono, S., Garza, P., López, A. *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in three tertiary care hospitals in Mexico: virulence profiles, innate immune response and clonal dissemination*. Front Microbiol. 2019.
188. Zhao, Y., Hu, K., Zhang, J., Guo, Y., Fan, X., Wang, Y., Divine, S., Zhang, X. *Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii carrying the carbapenemase OXA-23 in ICU of the eastern Heilongjiang Province, China*. BMC Infectious Diseases. 2019.
189. Li, S., Duan, X., Peng, Y., Rui, Y. *Molecular characteristics of carbapenem-resistant Acinetobacter spp. from clinical infection samples and fecal survey in Southern China*. BMC Infectious Diseases. 2019.
190. Wang, T., Leu, Y., Wang, N., Liu, C., Yan, T. *Prevalence of different carbapenemase genes among carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii blood isolates in Taiwan*. Antimicrobial resistance and Infection control. 2018.
191. Yasdansetad, S., Najari, E., Allah, E., Javid, N., Hashemi, A., Ardebili, A. *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates carrying blaOXA genes with upstream ISAbal: First report of a novel OXA subclass from Iran*. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2019. 18: 95 – 99.
192. Royer, S., Amaral, P., Fuga, B., Lorraine, M., Rossi, I., Fonseca, D., Tavares, R. *Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial blaOXA-23 producing XDR Acinetobacter baumannii*. Plos One. 2018.

193. Khurshid, M., Hidayat, M., Ali, U., Aslam, B., Waseem, M. *Emergence of ISabA1 harboring carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates in Pakistan*. Future Microbiology. 2017. 12(14): 1261 – 1269.
194. Eyram, E., Govinden, U., Kader, A., Osei, J., Yusuf, A. *ISAbA1 regulated OXA-23 carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii strains in Durban, South Africa*. Microbial Drug Resistance. 2018.
195. Rezaee, D., Zarrini, G., Ahangarzadeh, M. *Correlation between ISAbA1 upstream ampC gene and resistance to cefotaxime in Acinetobacter baumannii: a serious threat to nosocomial infections*. Avicenna J Clin Microb Infec. 2016. 3(1): e32417.
196. Zhu, L., Chen, X., Hou, P. *Mutation of CarO participates in drug resistance in imipenem-resistant Acinetobacter baumannii*. Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2019. Vol 33. No 8.
197. Tohidinia, M., Mohammad, S., Sefid, F., Falahati, A. *Functional exposed amino acids of CarO analysis as a potential vaccine candidate in Acinetobacter baumannii*. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2019.
198. Zhang, L., Liang, W., Xu, S., Mei, J., Di, Y., Lan, H., Wang, Y., Wang, H. *CarO promotes adhesion and colonization of Acinetobacter baumannii through inhibiting NF- κ B pathways*. Int J Clin Exp Med. 2019. 12(3): 2518 – 2524.
199. Simo, P., Noah, M., Kowalewicz, C., Herilalaina, V., Rakotondrasoa, A., Andrianirina, Z., Enouf, V. *Phenotypic and molecular characterizations of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii strains isolated in Madagascar*. Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2019.
200. Chakravarty, B. *Genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in Acinetobacter baumannii: background, challenges and future prospects*. Molecular Biology Reports. 2020. 47: 4037 – 4046.
201. Zhang, Y., Li, Z., He, X., Ding, F., Wu, W., Luo, Y., Fan, B., Cao, H. *Overproduction of efflux pumps caused reduced susceptibility to carbapenem under consecutive imipenem-selected stress in Acinetobacter baumannii*. Infection and Drug Resistance. 2018. 11: 457 – 467.
202. Javad, M., Zamani, S., Fardsanei, F., Arshadi, M., Bigverdi, R., Hajikhani, B., Goudarzi, H., Tabarsi, P., Dabiri, H., Mehdi, M. *Prevalence and mechanisms of carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: a comprehensive systematic review of cross-sectional studies from Iran*. Microbial Drug Resistance. 2019.
203. Naser, S., Ghotaslou, R., Ganbarov, K. Mobed, A., Tanomand, A., Yousefi, M., Asgharzadeh, M., Samadi, H. *Acinetobacter baumannii efflux pumps and antibiotic resistance*. Infect Drug Resist. 2020. 13: 423 – 434.
204. Zhang, T., Wang, M., Xie, Y., Li, X., Dong, Z., Liu, Y., Wang, L., Yang, M., Song, H., Cao, H., Cao, W. *Active efflux pump adeB is involved in multidrug resistance of Acinetobacter baumannii induced by antibacterial agents*. Exp Ther Med. 2017. 13(4): 1538 – 1546.
205. Xu, C., Bilya, S., Xu, W. *adeABC efflux gene in Acinetobacter baumannii*. New Microbes and New Infections. 2019. Vol 30.
206. Isler, B., Doi, Y., Bonomo, R., Paterson, D. *New treatment options against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii infections*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2019. Vol 63. No 1.
207. Lerner, A., Abu, J., Carmeli, Y., Schechner, V. *Environmental contamination by carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: the effects of room type and cleaning methods*. Infection Control and Hospital Epidemiology. 2019. 1 – 6.

208. Niu, T., Xiao, Y., Guo, L., Yu, W., Chen, Y., Zheng, B., Huang, C., Yu, X., Xiao, Y. *Retrospective comparative analysis of risk factors and outcomes in patients with carbapenem resistant Acinetobacter baumannii bloodstream infections: cefoperazone-sulbactam associated with resistance and tigecycline increased the mortality.* Infection and Drug Resistance. 2018. Vol 11. 2021 – 2030.
209. Villanueva, X. *Efecto antibacteriano de compuestos derivados de líquenes antárticos sobre Acinetobacter baumannii.* Tesis Magíster. Universidad de Concepción. 2016. Disponible en http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/2222/3/Tesis_Efecto_Antibacteriano_de_compuestos.pdf
210. Higueta, L., Jiménez, J. *Brotos hospitalarios de bacterias resistentes a colistina: revisión sistemática de la literatura.* Infectio. 2017. 21(4): 214 – 222.
211. Villatoro, E., Cardoza, R., Fuentes, Z., Hernández, C. *Identificación de bacterias resistentes a antibióticos carbapenémicos en hospitales de El Salvador.* Alerta. 2018.
212. Ramadan, R., Gebriel, M., Kadry, H., Mosallem, A. *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: characterization of carbapenemase genes and E-test evaluation of colistin-based combinations.* Infect Drug Resist. 2018. 11: 1261 – 1269.
213. Vanegas, J., Higueta, L., Vargas, C., Cienfuegos, A., Rodríguez, É., Roncancio, G., Jiménez, J. *Acinetobacter baumannii resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia.* Biomédica. 2015. 35: 522 – 30.
214. Gómez, R., Castillo, A., Chávez, M. *Characterization of multidrug-resistant Acinetobacter spp. Strains isolated from medical intensive care units in Cali – Colombia.* Colomb Med (Cali). 2017. 48(4): 183 – 190.
215. Novovic, K., Mihajlovic, S., Vasiljevic, Z., Filipic, B., Begovic, J., Jovcic, B. *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii from Serbia: revision of CarO classification.* Plos One. 2015.
216. Delpech, G., Lissarrague, S., Ceci, M., Allende, G., Lallee, A, Baldaccin, B., Sparo, M. *One enterocin AP-7121: combination with colistin against human multi-drug resistant Gram-negative pathogens.* Journal of Integrated Omics. 2019. Vol 9. No 2.
217. Delpech, G., Hebert, E., Sparo, M., Saavedra, L. *Draft genome sequence of Enterococcus faecalis strain CECT7121, a corn silage isolate with antibacterial activity against Gram-positive pathogens.* American Society for Microbiology. 2019. Vol 8. No 20.
218. Delpech, G., Sparo, M., García, C., Lissarrague, S., Ceci, M. *Encapsulación del péptido antimicrobiano AP7121 para su administración por vía oral.* 2020.
219. Thomas, V., Brown, R., Ashcraft, D., Pankey, G. *Synergistic effect between nisin and polymyxin B against pandrug-resistant and extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii.* Internatinoal Journal of Antimicrobial Agents. 2019. 663 – 668.
220. Melano, R. *Detección y notificación de patógenos multi-resistentes, con resistencia extrema o pan-resistentes.* Public Health Ontario. 2017.
221. Manchanda, V., Sanchaita, S., Singh, NP. *Multidrug resistant Acinetobacter.* J Glob Infect Dis. 2010. 2(3): 291 – 304.
222. Spohn, R., Daruka, L., Lázár, V., Martins, A., Vidovics, F., Grézal, G. *Integrated evolutionary analysis reveals antimicrobial peptides with limited resistance.* Nature Communications. 2019. 10:4538.
223. Martínez, B., García, P., Rodríguez, A. *Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology.* Current Opinion in Biotechnology. 2019. 56: 1 – 6.

224. Schofs, L., Sparo, M., Sánchez, S. *Gram-positive bacteriocins: usage as antimicrobial agents in veterinary medicine*. Veterinary Research Communications. 2020.
225. Bhattacharya, A., Stacy, A., Bashey, F. *Suppression of bacteriocin resistance using live, heterospecific competitors*. Evolutionary Applications. 2019. 12: 1191 – 1200.
226. Yadav, A., Espaillet, A., Cava, F. *Bacterial strategies to preserve cell wall integrity against environmental threats*. Frontiers in Microbiology. 2018.
227. Martínez, B., Rodríguez, A., Kulakauskas, S., Chapot, M. *Cell wall homeostasis in lactic acid bacteria: threats and defences*. FEMS Microbiology Reviews. 2020.
228. Baindara, P., Ghosh, A., Mandal, S. *Coevolution of resistance against antimicrobial peptides*. Microbial Drug Resistance. 2020.
229. Cole, J., Nizet, V. *Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses*. Microbiol. Spectr. 2016. 4(1).
230. Cunha, N., Cobacho, N., Viana, J., Lima, L., Sampaio, K., Dohms, S., Ferrerira, A., Fuente, C., Costa, F., Franco, O., Dias, S. *The next generation of antimicrobial peptides (AMPs) as molecular therapeutic tools for the treatment of diseases with social and economic impacts*. Drug Discovery Today. 2017. Vol 22. No 2.
231. Abdi, M., Mirkalantari, S., Amirmozafari, N. *Bacterial resistance to antimicrobial peptides*. Journal of Peptide Science. 2019.
232. Nuri, R., Shprung, T., Shai, Y. *Defensive remodeling: how bacterial surface properties and biofilm formation promote resistance to antimicrobial peptides*. Biochimica et Biophysica Acta 1848. 2015. 3089 – 3100.
233. Freire, M., Varella, M., Silva, O. *Resistance to bacteriocins produced by Gram-positive bacteria*. Microbiology. 2015. 161: 683 – 700.
234. Tierney, A., Rather, P. *Roles of two-component regulatory systems in antibiotic resistance*. Future Microbiology. 2019. 14(6): 533 – 552.
235. Yang, Y., Luo, M., Li, C., Luk, A., Zhao, G., Fung, K., Ip, M. *The role of two-component system response regulator BceR in antimicrobial resistance, virulence, biofilm formation, and stress response of group B Streptococcus*. 2018.
236. Ahmad, A., Majaz, S., Nouroz, F. *Two-component system regulate ABC transporters in antimicrobial peptide production, immunity and resistance*. Microbiology. 2020. 166: 4 – 20.
237. Dicks, L., Dreyer, L., Smith, C., Staden, A. *A review: the fate of bacteriocins in the human gastro-intestinal tract: do they cross the gut-blood barrier*. Front. Microbiol. 2018. 9: 2297.
238. Friberg, C., Haaber, J., Vestergaard, M., Fait, A., Perrot, V., Levin, B., Ingmer, H. *Human antimicrobial peptide, LL-37, induces non-inheritable reduced susceptibility to vancomycin in Staphylococcus aureus*. Scientific Reports. 2020.
239. Shriram, V., Khare, T., Bhagwat, R., Shukla, R., Kumar, V. *Inhibiting bacterial drug efflux pumps via Phyto-therapeutics to combat threatenind antimicrobial resistance*. Front. Microbiol. 2018.
240. Kawada, M., Watanabe, A., Ariei, K., Oogai, Y., Noguchi, K., Miyawaki, S., Hayashi, Y., Komatsuzawa, H. *An alternative nisin A resistance mechanism affects virulence in Staphylococcus aureus*. 2019.
241. Ariei, K., Kawada, M., Oogai, Y., Noguchi, K., Komarsuzawa, H. *Single mutation in BraRS confer high resistane against nisin A in Staphylococcus aureus*. Microbiology open. 2019.
242. Randall, C., Gupta, A., Utley, B., Lee, S., Morrison, G., O'Neill, A. *Acquired nisin resistance in Staphylococcus aureus involves constitutive activation of an intrinsic peptide antibiotic detoxification module*. MSphere. 2018. Vol 3. No 6.

243. Wu, S., Lin, K., Liu, Y., Zhang, H., Lei, L. *Two-component signaling pathways modulate drug resistance of Staphylococcus aureus*. Biomedical Reports. 2020. 13: 5.
244. Field, D., Blake, T., Mathur, H., O'Connor, P., Cotter, P., Ross, P., Hill, C. *Bioengineering nisin to overcome the nisin resistance protein*. Molecular Microbiology. 2019. 111(3): 717 – 731.
245. Khosa, S., Lagedroste, M., Smits, S. *Protein defense systems against the lantibiotic nisin: function of the immunity protein NisI and the resistance protein NSR*. Frontiers in Microbiology. 2016. Vol 7. No 504.
246. Egan, K., Ross, P., Hill, C. *Bacteriocins: antibiotics in the age of the microbiome*. Emerging Topics in Life Sciences. 2018. 1: 55 – 63.
247. Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D., Holo, H., Cintas, L., Snipen, L., Hernández, P., Nes, I., Diep, D. *Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria*. Microbiology. 2011. 157: 3256 – 3267.
248. Tymoszevska, A., Diep, D., Aleksandrak, T. *The extracellular loop of Man-PTS subunit IID is responsible for the sensivity of Lactococcus garvieae to garvicins A, B and C*. Scientific Reports. 2018. 8: 15790.
249. Ríos, N., Chalón, M., Navarro, S., Bellomio, A. *Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity*. Curr Genet. 2018. 64: 345 – 351.
250. Wang, H., Zhang, H., Zhan, H., Jin, J., Xie, Y. *Outer membrane channel protein TolC regulates Escherichia coli K12 sensitivity to plantaricin BM-1 via the CpxR/CpxA two-component regulatory system*. Probiotic and Antimicrobial Proteins. 2020.
251. Geldart, K., Kaznessis, Y. *Characterization of class IIa bacteriocin resistance in Enterococcus faecium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017. Vol 61. No 4.
252. Liu, S., Liu, Y., Zhang, P. *Properties of Listeria monocytogenes on acquisition of pediocin resistance*. Annals of Microbiology. 2019. 69: 123 – 130.
253. Liu, S., Liu, Y., Takala, T., Zhang, P., Wang, S. *Phenotypic comparison and DNA sequencing analysis of a wild-type and a pediocin-resistant mutant of Listeria ivanovii*. Research in Microbiology. 2020. 171: 115 – 121.