



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Revisión bibliográfica: Estudio de los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.

Revisión bibliográfica: Estudio dos mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos.

Literature review: Study of mechanisms of bacterial resistance to antibiotics.

David Carballo Beltrán

Julio, 2018

Director Académico:

José Enrique Torres Vaamonde

Don José Enrique Torres Vaamonde, profesor contratado doctor (PC-CR) de la Universidad de A Coruña en el Departamento de Biología, Área de Microbiología,

INFORMA,

Que el Trabajo de Fin de Grado presentado por David Carballo Beltrán y con título “Estudio de los mecanismos de resistencia a antibióticos” ha sido realizado bajo su dirección y, considerándolo finalizado, autoriza su envío y presentación al tribunal calificador correspondiente.

Y para que así conste, expide el presente informe en

A Coruña a 17 de Julio de 2018

Fdo: José Enrique Torres Vaamonde

ÍNDICE

Resumen/ Resumo/ Summary

Palabras clave

1. Introducción.....	5
2. Resistencia natural y adquirida.....	5
3. Tipos de mecanismos de resistencia.....	6
3.1 Primera barrera: Biopelículas.....	7
3.2 Segunda barrera: Envoltura celular.....	11
3.2.1 Modificaciones de la pared celular: Resistencia a glucopéptidos.....	11
3.2.2 Acción enzimática contra antibióticos a nivel de la envoltura celular.....	12
3.2.3 Modificaciones en la membrana celular: Las porinas y bombas de expulsión.....	15
3.3 Tercera barrera: Intracelular.....	18
3.4 Cuarta barrera: Genética.....	19
4. Objetivos.....	20
5. Conclusiones.....	20
6. Bibliografía.....	20

RESUMEN

Desde el descubrimiento de la Penicilina, la lucha por encontrar antibióticos más efectivos contra las nuevas cepas bacterianas llega hasta nuestros días. Este trabajo abarca los estudios más recientes sobre los mecanismos de resistencia y multiresistencia de estas nuevas cepas. Existen 4 tipos de barreras, todas ellas reguladas a nivel genético mediante expresión de genes, plásmidos, operones, casetes génicos...etc. La primera barrera de resistencia son las biopelículas, que crean un ambiente más favorable para la transmisión de posibles mutaciones, así como de una defensa física contra la penetración del fármaco. La segunda barrera se encuentra en la envoltura celular, varían su permeabilidad modificando el peptidoglucano de la pared y las porinas y bombas de expulsión de la membrana plasmática. A este nivel también actúan enzimas hidrolizantes de β -lactámicos y carbapenémicos, destruyen el antibiótico antes de que actúe. Ya en el interior celular destacan las modificaciones en los ribosomas y en el material genético como la DNA girasa para rescatarlos de la inhibición.

PALABRAS CLAVE: Antibióticos, resistencias, multiresistencias, bacterias

RESUMO

Desde o descubrimento da penicilina, a loita por atopar antibióticos máis efectivos contra as novas cepas bacterianas chega aos nosos días. Este traballo abarca os estudos máis recentes sobre os mecanismos de resistencia e multiresistencia destas novas cepas. Existen catro tipos de barreiras, todas elas reguladas a nivel xenético a través da expresión de xenes, plásmidos, operóns, casetes de xenes...etc. A primeira barreira de resistencia son os biofilms, que crean un ambiente máis favorable para a transmisión de posibles mutacións, así como tamén unha defensa física contra a penetración da droga. A segunda barreira atópase no sobre da célula, varía a súa permeabilidade, modifica o peptidoglicano da parede, e as porinas e as bombas de expulsión da membrana plasmática. As enzimas de hidrólisis de β -lactamas e carbapenemas tamén actúan a este nivel destruíndo o antibiótico antes de que actúe. Xa no interior celular destacan as modificacións nos ribosomas e no material xénico coma a DNA xirasa para rescatalos da inhibición.

PALABRAS CHAVE: Antibióticos, resistencias, multiresistencias, bacterias

SUMMARY

Since the discovery of Penicillin, the struggle to find more effective antibiotics against the new bacterial strains reaches our days. This work covers the most recent studies on the mechanisms of resistance and multiresistance of these new strains. There are 4 types of barriers, all of them regulated at the genetic level through expression of genes, plasmids, operons, gene cassettes... etc. The first resistance barrier is biofilms, which create a more favorable environment for the transmission of possible mutations, as well as a physical defense against the penetration of the drug. The second barrier is found in the cell envelope, its permeability varies, modifying the peptidoglycan in the wall, and the porins and efflux pumps of the plasma membrane. Hydrolysing enzymes of β -lactams and carbapenems also act at this level, destroying the antibiotic before it acts. Inside the cell, It include modifications in ribosomes and genetic material such as DNA gyrase to rescue them of the inhibition.

KEYWORDS: Antibiotics, resistance, multiresistance, bacteria

1. INTRODUCCIÓN

La batalla entre bacterias y humanos es un hito histórico que comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928 (1). Desde entonces y hasta nuestros días, las investigaciones han ido dando a luz nuevas terapias y nuevos fármacos contra estos organismos, pero también se han ido descubriendo nuevas formas de resistirlos. Una de ellas es la formación de una matriz extracelular denominada "biopelícula", observada por primera vez por Antonie Van Leeuwenhoek a finales del siglo XVI y acuñada con ese termino por Bill Costerton en 1978 (2). A partir de entonces comenzaron las investigaciones detectándose entre otras, sus propiedades antimicrobianas. Posteriormente, casi entrado en este siglo XXI, se descubrió que la envoltura celular bacteriana, compuesta por membrana y pared, tenía un papel importante en la resistencia a ciertos antibióticos, la célula era capaz de modificar su permeabilidad mediante porinas y bombas de expulsión. El pionero en este ámbito fue el japonés Hiroshi Nikaido, cuyo trabajo se extiende hasta nuestros días (3). Hoy en día hay más de 100 antibióticos que afectan a todos los niveles de la estructura bacteriana, aunque no todos están en uso. En este trabajo he recogido los principales mecanismos de resistencia centrándome en aquellas especies que mayor interés tienen en un ámbito clínico y cuáles son las investigaciones más actuales para combatirlas.

2. Resistencia natural y adquirida

La resistencia natural es única de cada familia, especie o grupo bacteriano, es permanente, determinada genéticamente y no se correlaciona con la cantidad de antibiótico administrado. Por ejemplo, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* presentan una resistencia natural a glucopéptidos. La resistencia adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana mediante modificaciones genéticas, ya sea por mutaciones o genes móviles como transposones, integrones y plásmidos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* con una resistencia inducida a meticilina (4)(5)

3. Tipos de mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencia se agrupan en 4 grandes grupos en función del lugar donde se produce, es decir, si la resistencia viene mediada por la formación de una biopelícula, estaremos hablando de una resistencia extracelular, sin embargo, si se da en la propia célula bacteriana podemos distinguir 3 tipos: a nivel envoltura celular, a nivel intracelular, y por último a nivel genético. Cada uno de estos niveles integra diversos mecanismos de acción dependiendo de la especie y del agente antimicrobiano tal y como se muestra en la FIGURA 1 (6)

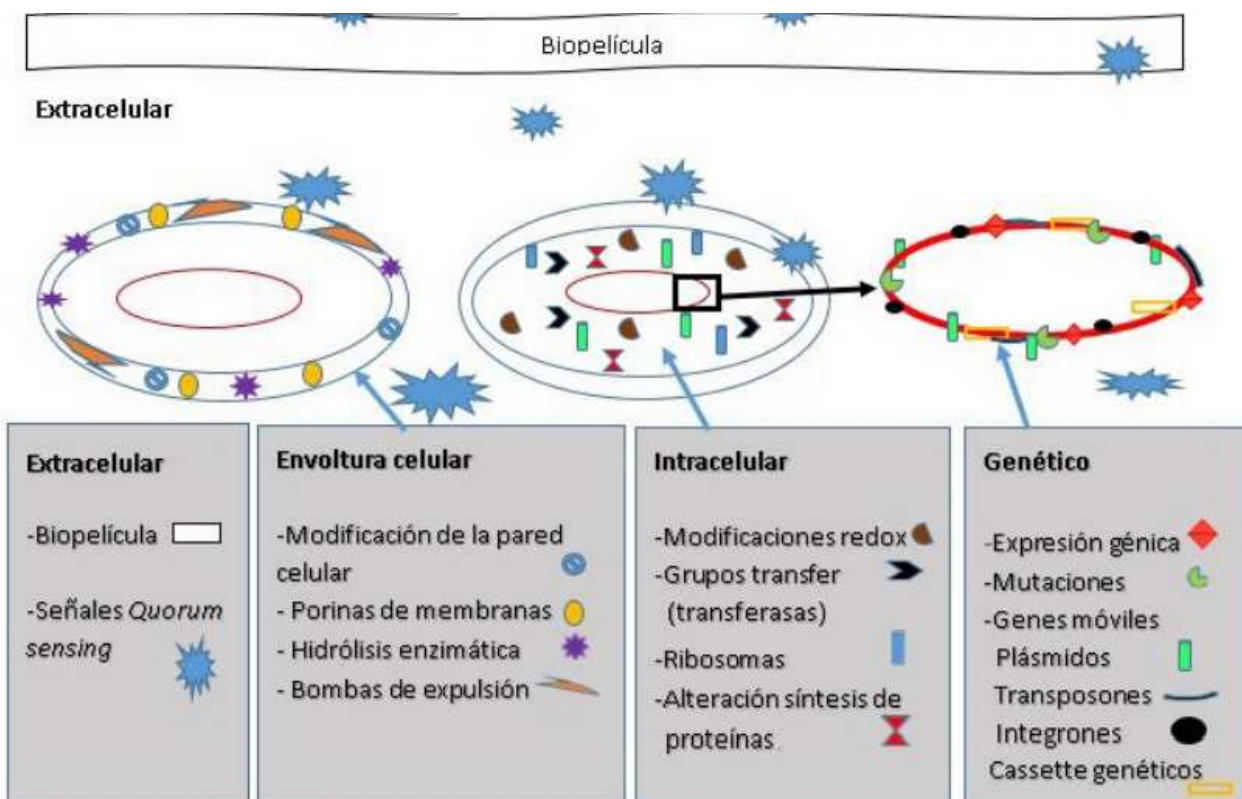


FIGURA 1: Esquema de los tipos de mecanismos de resistencia según el nivel celular al que se encuentren. Imagen extraída de (Troncoso et al.,2017) (6)

3.1 Primera barrera: Biopelículas

En el nivel más externo tenemos la primera barrera de defensa contra los agentes antimicrobianos, las biopelículas. Las biopelículas se definen como agregaciones estructuradas de células bacterianas englobadas en una matriz extracelular sintetizada por ellas mismas. Esta capa adyacente, principalmente compuesta por sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (EPSs) tales como polisacáridos, ácidos nucleicos y proteínas le confiere una naturaleza viscosa dificultando la penetración de las moléculas antibióticas. Según un estudio clínico, el 72% de las cepas identificadas como *Staphylococcus aureus* tenían la capacidad de formar biopelículas que les confería en todas la resistencia a ciertos antibióticos como erytromicin, gentamicin, ciprofloxacina y levofloxacina, siendo por tanto más resistente que el control negativo que no formaba esta matriz extracelular (7).

Estas resistencias vienen mediadas por la aparición de nuevas mutaciones. El ratio de mutaciones es mayor que en las formas libres o planctónicas cuando los tratamientos se producen de forma intermitente y retardada según un estudio realizado con *Escherichia coli* (8) o cuando las bacterias crecen dentro de una matriz común. Este aumento es debido principalmente a la transmisión horizontal de genes entre los distintos individuos de la colonia. Se sincronizan por tanto para la producción de enzimas hidrolíticas de antibióticos, síntesis de proteínas que bombeen las sustancias antimicrobianas desde el interior o la disminución de canales, entre otros (FIGURA 3). Esta sincronización permite que la respuesta por parte de las bacterias en un contexto colectivo sea mayor que si lo hacen de forma individual, siendo más difícil encontrar un tratamiento efectivo (9). Los Institutos Nacionales de la Salud (NIH) determinaron que el 65% de las infecciones son relacionadas con la formación de biopelículas (10) y en un 85% de los casos esta enfermedad se vuelve crónica. Los daños crónicos se traducen en una inflamación y un daño tisular persistente a pesar del tratamiento antibiótico y las respuestas inmunes.

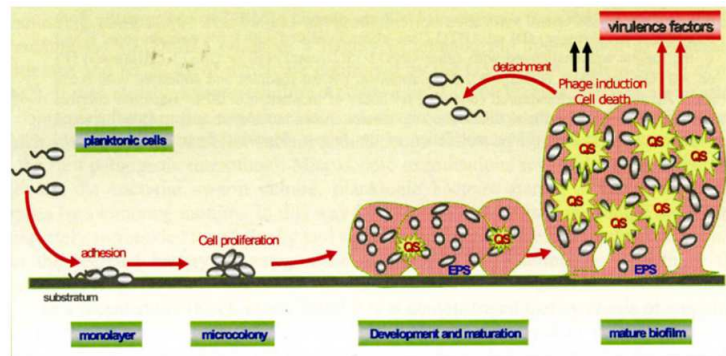


FIGURA 2: Esquema de la evolución de una biopelícula. Las bacterias en estado planctónico o libre se adhieren a una superficie y proliferan. Mediante señales químicas (Quorum sense) se comunican para excretar sustancias poliméricas extracelulares hidratadas (EPSs), factores de virulencia o resistencia a antibióticos. El proceso se hace cíclico cuando se liberan células libres con capacidad de colonizar nuevas superficies. Esquema extraído de (Høiby et al., 2010) (9)

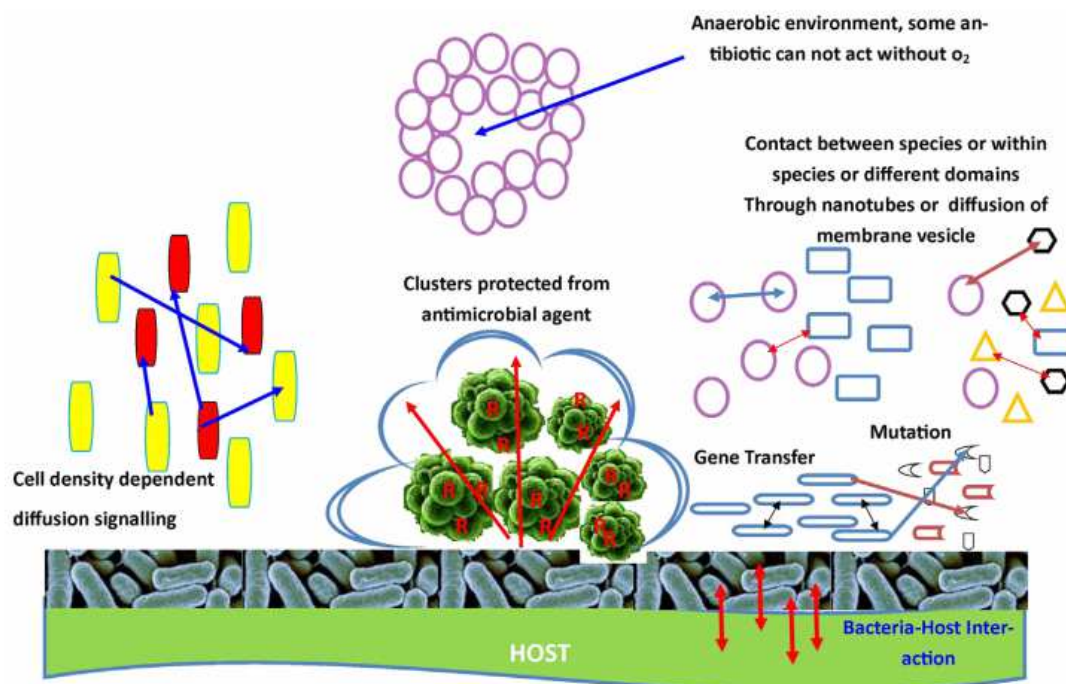


FIGURA 3: Esquema de las relaciones intraspecíficas e interespecíficas de bacterias formadoras de biofilm: Transferencia de genes, mutaciones, interacciones con el hospedador, Quorum Sense, nanotubos o difusiones de membrana. Para protegerse de los antibióticos emplean aglomerados y ambientes anaerobios. Imagen extraída de (Satpathy et al., 2016) (54)

Para que se llegue a formar una biopelícula, las células deben comunicarse entre sí y llegar a una densidad mínima para comenzar a excretar este polipéptido. A esto se le conoce como Quorum Sense (QS) (FIGURA 2). El QS es activado por ciertas moléculas que actúan como señales químicas y su secreción es dependiente de la densidad celular. Estas moléculas varían dependiendo del grupo bacteriano siendo por ejemplo, acilhomoséinlactonas (AHLs) y quinolonas comunes en Gram negativas, oligopéptidos autoinducidos característicos de Gram positivas (AIP) (11) y AI-2 presente en ambos desempeñando el papel de lenguaje universal intraespecífico (TABLA 1). Aún así, este tipo de señalización (química) no es el único medio que permite la comunicación entre bacterias, las señales eléctricas mediante canales iónicos también están presentes y son comparadas por algunos científicos con una red neuronal, considerándolos como organismos inteligentes (12) (13).

El sistema de Quorum activa una serie de genes que entre otras funciones, participan en procesos de virulencia y producción de antibióticos. El sistema del QS en Gram negativos es análogo al encontrado en *Vibrio fischeri* a principio de la década de los 80. Presenta 2 unidades: LuxI y LuxR, encargada de la síntesis y recepción, respectivamente. Hoy en día se sabe que existen más de 50 especies (entre las que destaca, a nivel clínico *Pseudomonas aeruginosa*) que utilizan este complejo para regular la transferencia de plásmidos, síntesis de polisacáridos, exoenzimas relacionadas con la virulencia, biopelículas y producción de antibiótico. En Gram positivas la expresión de estos genes vienen inducidos por una cascada de

fosforilaciones activadas por la unión del autoinductor y unas proteínas localizadas en la membrana. El primer paso para la formación de una biopelícula es la adhesión a una superficie viva o no viva ayudados de flagelos y pili en Gram negativas y proteínas superficiales en Gram positivas. (14)

TABLA 1: Lista de las principales moléculas señal de detección del Quorum en función de si la relación es interespecífica o intraespecífica, de los organismos más representativos y de sus propiedades, tales como la virulencia, bioluminiscencia o tolerancia a antibióticos. Tabla extraída de (Torreon et al., 2011) (52)

QS Signaling Type	Structure	Representative Microorganisms	Associated Phenomena
Intraspecies Communication Signals			
"Traditional" AHL	C4-C18, 3OC4-3OC18 and 3OHC4-3OHC18	Various Gram-negative bacteria; only one Gram-positive bacteria: <i>Exiguobacterium</i> sp. MPO	Virulence, biofilm, swarming and bioluminescence
"Noncanonical" AHL	<i>p</i> -Coumaroyl-HSL	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	Global gene expression
	Cinnamoyl-HSL	<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Not identified
	Isovaleryl-HSL	<i>B. japonicum</i> USDA110	Not identified
	<i>N</i> -Carboxyl-acyl-HSL	Archaeum <i>Methanotherix harundinacea</i>	Filamentous growth
DSF family	<i>Cis</i> -unsaturated fatty acid	<i>Xanthomonas</i> spp., and <i>Burkholderia cenocepacia</i>	Virulence, biofilm and antibiotic tolerance
CAI-1 family	α -Hydroxyketones	<i>Vibrio</i> spp. and <i>Legionella pneumophila</i>	Virulence and biofilm
AIP family	Linear or cyclized oligopeptide	Many Gram-positive bacteria; only one Gram-negative bacterium: <i>Thermotoga maritima</i>	Virulence, biofilm, sporulation and exopolysaccharide production
PQS or IQS	Quinolone or thiazole compounds	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Virulence and biofilm formation
Pyrones	α -Pyrones	<i>Photobacterium luminescens</i>	Virulence
Interspecies and Interkingdom Communication Signals			
AI-2	<i>S</i> -THMF-borate <i>R</i> -THMF	Many Gram-negative and Gram-positives bacteria	Virulence and biofilm formation
AI-3	Unknown	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (EHEC)	Virulence
Indole	2,3-Benzopyrrole	Many Gram-negative and Gram-positives bacteria	Virulence and biofilm formation

La capacidad de adherirse a una superficie puede ser un problema sanitario si esta superficie es la de las propias células humanas como es el caso de un estudio realizado por (Szcuka et al.)(15). Se escogió un grupo de *Staphylococcus spp.* Coagulasa negativa (CoNS) que tenían esta particularidad y se determinó la capacidad invasiva en líneas celulares humanas HeLa y los mecanismos que emplean para evitar el sistema inmune. Uno de estos mecanismos es la adhesión a las células mediada por los genes

icaADBC que codifican para un polisacárido intercelular (PIA). Entre las cepas testadas, algunas CoNS producen una adhesina (AtIE) que le permite unir fibrinógeno, fibronectina y vitronectina en el hospedador formando una matriz extracelular. A mayores también se observó que sintetizaban proteasas, metaloproteasas, lipasas y esterases y una toxina denominada PSM δ . Todas ellas le permiten a la bacteria destruir tejidos facilitando así su penetración y su huida del sistema inmune. La familia CoNS es de las más frecuentes en infecciones sanguíneas, de hueso, pudiendo causar endocarditis, peritonitis, osteomielitis...etc, asociadas en la mayoría de las veces a una mala esterilización de instrumental quirúrgico y son además uno de los principales reservorios de genes de resistencia.

Las principales dianas contra este tipo de resistencia son tanto la inhibición de las moléculas señal (Quorum Quenching) como la destrucción de la propia matriz celular. Ante esta última situación surgen una serie de problemas como puede ser la presencia de "células durmientes" protegidas por una capa externa de células activas productoras de biopelícula. En condiciones extremas, estas células "despiertan" de su estado latente y se produce una nueva invasión (16). Aunque las investigaciones se centren más en tratamientos preventivos, existen algunos estudios centrados en el uso a posteriori como nanopartículas de plata o de hierro recubiertas con quitosano para reducir la biopelícula en *S. aureus* (17) (18) o inhibidores de las proteínas autoinducidas como las furanonas, que son metabolitos secundarios principalmente extraídos de algas como *Delisea pulchra*. Las furanonas brominadas de esta alga favorecen la desactivación de LuxS, gen necesario para la expresión de AI-2 (19) (20) en patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio spp.*, *Erwinia carotovora*, *Burkholderia spp.*, entre otros.

Muchos inhibidores son también producidos por las propias células bacterianas. Son por ejemplo, la Dispersina B producida por *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* o la Alginato liasa por *P. aeruginosa*. La función en la propia célula es degradar la matriz para iniciar la liberación y dispersión de las células con finalidad infectiva y de supervivencia. Son por tanto usados como posibles agentes terapéuticos, siendo efectivos contra especies como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Yersinia pestis*, *E. coli* o *P. aeruginosa*. Las matrices extracelulares tienen a parte de glucopéptidos, DNA como componente principal. El uso de nucleasas como ADNasas termonucleadas de *S. aureus* o NucB de *Bacillus licheniformis* son otro tratamiento con resultados positivos contra *B. subtilis*, *E. coli* y *Micrococcus luteus*. La metaloproteasa serratopeptidasa (SPEP) es producida por *Serratia marcescens*, y está ampliamente utilizada como antiinflamatorio terapéutico. Inhibe la formación de biofilm y mejora la actividad de ofloxacina contra *P. aeruginosa* y *S. epidermidis* (21) Otras estrategias se enfocan en el uso de anticuerpos monoclonales y bacteriófagos. Los anticuerpos monoclonales de plomo inhiben la unión de *P. aeruginosa* a la célula huésped y los bacteriófagos son altamente específicos, no son tóxicos, controlan la formación de biopelícula y sobre todo muy manipulables, por lo que se usan potencialmente en biotecnología e investigación terapéutica. Los resultados del trabajo de (Dickey et al., 2018) (22) testaron que el tratamiento con fagos en una cepa de *S. aureus* ayudó a frenar el aumento de resistencias y sugieren que el uso de fagos permitiría disminuir la dosis de antibiótico suministrado ya que éstos tienen la

particularidad de que rescatan la baja eficacia del antibiótico. Este descubrimiento podría ser crucial para evitar las toxicidades y efectos secundarios de muchos antibióticos.

2.2 Segunda barrera: Envoltura celular

Ya en la propia célula tenemos una primera barrera, la envoltura celular, formada por membrana y pared celular (si la presentan) y que modifican para evitar que los antibióticos penetren al interior celular. Estas modificaciones se centran en hacer a la envoltura menos permeable expulsando los antibióticos desde el interior gracias a bombas, o bien destruyéndolos antes de que penetre por acción enzimática. En la membrana plasmática destacan las modificaciones en canales proteicos como las porinas, que impiden que las moléculas antimicrobianas se introduzcan por ellas y lleguen al interior celular. Los antibióticos más conocidos y más utilizados contra este primer muro son los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams) y glucopéptidos. Entre las resistencias de mayor riesgo son las que modifican las proteínas PBP, que son un punto de anclaje de los β -lactámicos y es típico de Gram positivos como por ejemplo *Staphylococcus aureus*. Quiero destacar que este último mecanismo lo agrupo dentro de los mecanismos a nivel de envoltura celular pero no se trata de modificaciones en ella sino una acción enzimática que ocurre a este nivel.

2.2.1 Modificaciones de la pared celular: Resistencia a glucopéptidos

Enterococcus faecalis y *Enterococcus faecium*s grupo también importante por su capacidad de adquirir y transmitir genes que codifican para resistencia a glucopéptidos mediante 9 operones Van. Los glucopéptidos truncan la formación de la pared celular uniéndose al dímero terminal D-alanina-D-alanina del proteoglicano e inhiben la transpeptidación y la transglucosilación. Los *Enterococcus spp* sustituyen D-Al-D-Al por D-Al-D-lactosa o D-Al-D-Serina provocando que no se produzca el enlace con el antibiótico. El conjunto de genes que codifican para estas ligasas están dentro del operón Van, que presenta tanto genes compartidos como diferentes, lo que le permite tener diferentes grados de resistencia o susceptibilidad a los distintos tipos de glucopéptidos. Los operones Van A y B son los más comunes, pueden encontrarse tanto en el cromosoma como en el plásmido Tn1545 y generan el dímero Al-D-lactosa. VanA le confiere una alta resistencia a teicoplanina y Vancomicina. Van B le confiere una alta o moderada resistencia a vancomicina pero se mantiene susceptible a teicoplanina. En ambos el mecanismo es similar y se basa en la presencia de un sistema regulador con 2 componentes (VanR y VanS), genes de resistencia (VanH, VanA y VanB) y genes accesorios (VanX, VanY) que hidrolizan el dímero. VanZ es exclusivo del operón VanA y VanW del VanB (su función es desconocida) (4) (23).

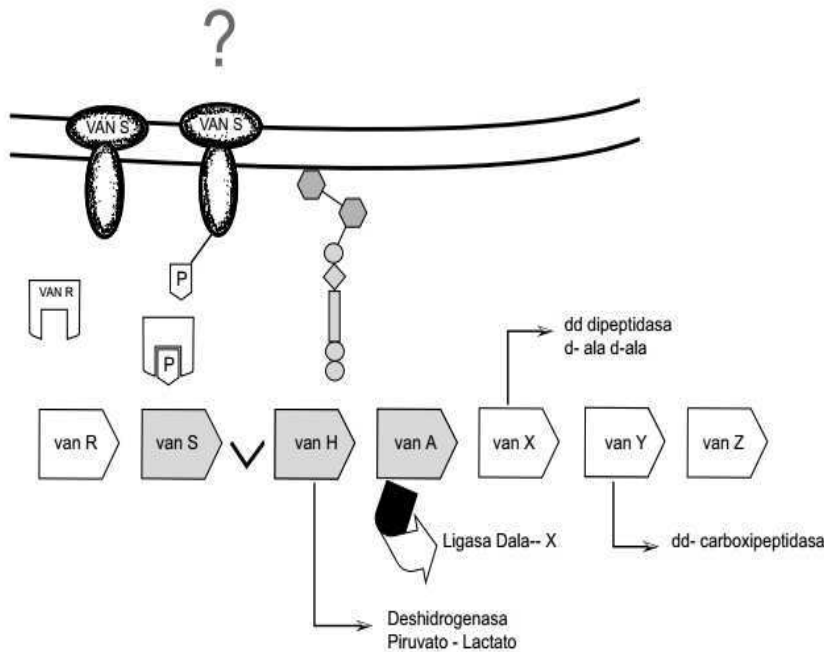


FIGURA 4 . Esquema de los genes responsables de fenotipo Van A y sus funciones. Figura extraída de (Vignoli et al., 2000) (4)

2.2.1 Acción enzimática contra antibióticos a nivel de la envoltura celular

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (MRSA) tiene como mecanismo principal de defensa contra antibióticos la síntesis de una proteína denominada PBP2a codificada por el gen *mecA*. Esta proteína se une a los antibióticos β -lactámicos como la meticilina impidiendo así que éstos hagan su efecto lisante contra la pared bacteriana. No obstante, son vulnerables a una nueva clase de cefalosporinas en la que se encuentra Ceftalorine o Ceftobiprole, siendo así un tratamiento efectivo, en principio, contra este tipo de MRSA. Otra familia, las Enterobacterias, pueden tener la capacidad de producir enzimas que hidrolizan la molécula antibiótica. Estas enzimas pueden ser: β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), β -lactamasas plasmídicas de tipo AmpC y carbapenemasas. Entre los grupos de organismos que las presentan destacan, *E. coli*, *K. Pneumoniae* y *P. mirabilis*. Según los datos que aportan los autores (Oteo et al., 2015) (24) en España el 15% de las muestras analizadas presentan este tipo de resistencias, entre las cuales priorizan las cepas CTX-M-15 Y SHV12 de *E. coli* y *K pneumoniae*, siendo menos comunes las plasmídicas de tipo AmpC como CIT y DHA en *E. coli*, *K pneumoniae* y *P. mirabilis*.

Las β -lactamasas se pueden clasificar según el sistema Amber. La clasificación Amber distingue 4 grupos de la A a la D según la secuencia de aminoácidos. Las SBLs, clase Amber A, C y D, usan una serina nucleofílica en la catálisis y las metallo- β -lactamasas (MBLs) de la clase Amber B usan 1 o 2 iones de zinc en la catálisis. Existen 4 inhibidores para SBL entre los que se incluyen el ácido clavulánico, sulbactam y

tazobactam siempre combinados con antibióticos β -lactámicos. Sin embargo, no ocurre lo mismo con los inhibidores de MBL. Las MBLs pueden hidrolizar prácticamente todos los β -lactámicos a excepción del aztreonam. Los carbapenémicos son considerados como el “último recurso” contra éste grupo. Las MBLs son producidas por la mayoría de bacterias Gram negativas de mayor relevancia clínica, tales como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Enterobacteriaceae* y *Serratia marcescens*. Hay una gran abundancia de especies en el ambiente que presentan este tipo de resistencia, lo que se traduce en un preocupante reservorio de genes que codifican para dicha resistencia (25)

En particular, las carbapenemasas de clase D, principalmente OXA-48, hidrolizan también carbapenémicos como el ceftazidime, pudiendo además afectar a cefalosporinas de amplio espectro como cefotaxime. Sin embargo, en *K. Pneumoniae*, aunque no es el único, presenta además una alta producción de ESBL con enzimas sin inhibidores específicos y alta resistencia a termocillin y piperacillin/tazobactam. Esta mezcla entre ESBL y CPE dificulta tanto su identificación mediante técnicas fenotípicas como la búsqueda de un antibiótico efectivo. En un trabajo realizado por (Hilliquin et al., 2017) (26) se identificaron 3 factores de riesgo asociados a *K. Pneumoniae* OXA-48, la transmisión a través de reservorios ambientales, el número y duración de la exposición a antibióticos y al menos un proceso invasivo.

Siguiendo con esta especie, según (DiMento et al., 2018) (27) se ha encontrado recientemente por primera vez una cepa productora de KPC-3 denominada *Klebsiella pneumoniae* ST392 resistente a todos los β -lactámicos y carbapenemasas (cefalosporinas, fosfomicun, gentamicin) con resistencia intermedia a amikcacin y tigercyclin y sensibilidad a la colistin. *Klebsiella pneumoniae* pertenece al grupo de las Gram negativas colonizadoras de superficies mucosas, los cuales usa como vía para atravesar a otros tejidos y desencadenar la infección. La cepa ST392 fue encontrada en Italia en un paciente transplantado de riñón-páncreas ingresado por una episodio de infección urinaria. La resistencia fue inducida por genes codificantes para KPC-3, CTX-M-15, SHV-11, TEM-1 y los genes *aac(6')lb-cr*, *aac(3)-iia*, *aph(3')lb* y *qnrB1*. De entre los cuales, el gen *bla-KPC-3* se encuentra en un plásmido y su transmisión es horizontal dado que se había encontrado previamente en otra cepa, *Klebsiella pneumoniae* ST, que hasta entonces no tenía relevancia en cuanto a resistencia. La transmisión de genes en plásmidos es un problema grave en hospitales donde se concentran más bacterias, habiendo así más probabilidades de que se produzca dicha transmisión.

Las MBLs están subdivididas en 3 subclases: B1, B2, B3 y B4 basadas en homologías de secuencia, en el ión metálico y en el sustrato selectivo. B1 es la más relevante clínicamente. Las más importantes son, “Verona integron-encoded MBL” (VIM), “New Delhi MBL (NDM) e Inimpenemasa (IMP). (28)

En Malasia se detecta por primera vez *P.aureginosa* NDM-1 e IMP además de la ya conocida VIM-2. En el estudio llevado a cabo por (29) se identificaron 3 cepas como productoras MBL, de esas, 2 eran resistentes a todos los antimicrobianos testados. Se concluye por tanto que la emergencia de estos dos tipos de multirresistencia en esa zona (Malasia) es debido a una transmisión provocada por viajes internacionales, como puede

ser el turismo. El contacto directo entre extranjeros y nativos promueve la aparición y extensión de nuevas resistencias.

A día de hoy, los inhibidores que han sido estudiados son: Tioles, Ácidos carboxílicos, “Rhodanines”, “Tryazolylthioacetamides”, Boronatos cíclicos...etc. El modo de activación es mediante quelación de metales en los sitios activos de la enzima. Por ejemplo, un antiguo fármaco para el control de la presión sanguínea, el L.captopril, ahora es un inhibidor de MBL de amplio espectro, quela los sitios activos de los iones de Zinc con los grupos tiol además potenciar la acción del Meropenem. Otro fármaco como el “Carboxylodithioate” combinado con Meropenem restaura la actividad de éste contra *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*. Recientemente se ha encontrado actividad inhibitoria en derivados del 3-oxoisindoline-4-carboxylate con selectividad reducida para VIM-2. Sin embargo, un nuevo descubrimiento parece solventar esta selectividad reducida, ya que un derivado del ácido acético ((S)-3-Mercapto-2-methylpropanamida actúa como un potente inhibidor para los subtipos tanto de este grupo como en el de NDM-1(28)(30). También se ha descubierto recientemente que el Ácido rosmarínico y salvionílico inhibe tanto a MBL como a SBL(31) y que el 6-fosfonometilpiridina-2-carboxilato, además de inhibir a MBL B1 también lo hace contra B3(32).

Otro tipo de tratamiento según (Holloway et al., 2017) (33) podría ser la inmunoterapia, se determinó que las proteínas cistatinas 9 y C, inhibitorias de cisteín-proteasas y que participan en la inflamación hematopoyética, podrían ser una nueva inmunoterapia contra NDM-1 en *Klebsiella pneumoniae*. Los recombinantes de CST9 y C trabajan de forma simultánea para modular la inflamación contra *Klebsiella pneumoniae* NDM-1. Sin embargo, no todos los estudios son tan prometedores, según una revisión realizada por (Castaneda et al., 2016) (34). A nivel mundial, *Klebsiella pneumoniae* NDM-1 es la más encontrada seguida por *Escherichia coli* y advierten que la presencia de este gen codificante para la enzima NDM-1 puede llevar con una alta probabilidad otros mecanismos de resistencia (betalactamasas CTX-M, TEM o genes aac que provocan resistencia a aminoglucósidos), lo que hace más difícil todavía poner un tratamiento efectivo (resistencia a carbapenémicos, aminoglucósidos y cefalosporinas de 3ª y 4ª generación). Este mismo año, 2018, se ha reportado una nueva variante de NDM en *Escherichia coli*, denominada NDM-20 en un cerdo para alimentación humana en China (35), exhibía un alto nivel de resistencia a todos los β- lactámicos y carbapenémicos. NDM-20 presenta 3 mutaciones puntuales en comparación al más común NDM-1, lo que le confiere una mayor resistencia a ertapenem y aumenta la actividad catalítica contra penicilinas y cefalosporinas. Se demuestra por tanto que los animales también son una fuente importante de aparición y extensión de multirresistencias bacterianas, por lo que se convierte por tanto en otro punto a controlar. La reducción en el consumo de antibióticos por parte de animales disminuiría la transmisión animales-humanos decreciendo consecuentemente los niveles de resistencia en humanos según (VanBunnik et al., 2017)(36)

Acinetobacter baumannii multirresistente, es un patógeno oportunista que se transmite con facilidad siendo altamente contagioso. De las cepas descritas, las nuevas de la

clase, OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 y OXA 253 son las mayores de impacto clínico (En España, OXA-23, OXA-24, OXA-58) , reducen la permeabilidad, sobreexpresan sistemas de bombeo activo, transforman aminoglucósidos y cloranfenicol mediante metilasas y modifican el sitio de unión. También pueden producir carbapenemasas. Se encuentra entre las principales causas de infección en unidades de cuidados intensivos. Referente a esto, se ha realizado un estudio por parte de (Maciel et al., 2017) (37) acerca de las resistencias a carbapenémicos en *A. baumannii* (CRAB) en una UCI de un hospital público de Brasil entre 2013 y 2015. Se aislaron CRABs de muestras rectales y puntas de catéter en 21 recién nacidos y se compararon con un control, que este caso fueron recién nacidos carbapenem sensibles. La colonización fue relacionada principalmente con síndromes respiratorios y su prematuridad. Los resultados muestran una clara correlación entre la resistencia a carbapenémicos y el uso de catéteres y ventilación asistida, además de otros tipos de contaminación por contacto como puede ser a través de manos por parte del personal hospitalario. Es responsable de ésto la presencia de ISAb₁, que le proporciona un promotor a bla-23 (38). Nuevamente, hay que destacar la importancia de la higiene tanto dentro como fuera de los hospitales, pero sobretodo dentro, dado que se encuentran personas más sensibles a contraer una infección por contagio, como por ejemplo los neonatos.

2.2.3. Modificaciones en la membrana celular: Las porinas y bombas de expulsión

Las porinas pueden participar como vehículo para la entrada de moléculas que no son apropiadas para la célula, por tanto esta regula su expresión evitando así su efecto tóxico. Las porinas por tanto regulan la permeabilidad de membrana, y lo hacen de 3 formas, mediante porinas no específicas: OmpF. Ompc, PhoeE, OmpD y Omp36 y las específicas, LambB o FhuA para azúcares y OmpA y TolC para proteínas. La resistencia a los antibióticos sigue 3 procesos que incluyen mutaciones en las porinas, alteraciones y degradaciones de la misma. A este proceso se le suman las bombas de expulsión que eliminan las moléculas intercelulares. Juntos forman una barrera casi infranqueable contra β -lactámicos y quinolonas (39) (FIGURA 5)

Pseudomonas aeruginosa es considerada la causa más común de infecciones nosocomiales e infecciones crónicas respiratorias en pacientes con fibrosis quística. El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos es debido a la combinación de 2 factores, como son la inactivación de la porina OprD que le confiere resistencia a imipenem y un decrecimiento de la

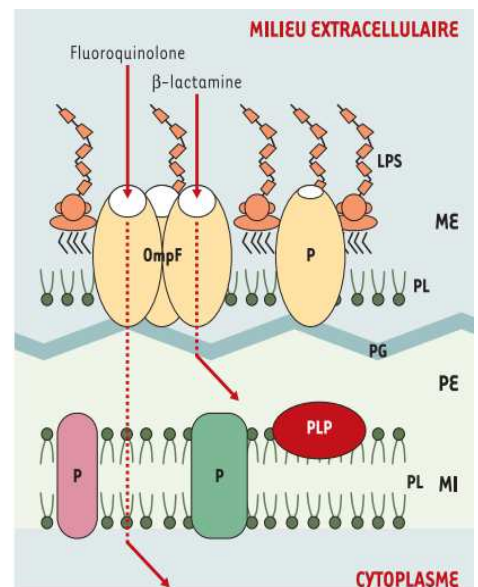


FIGURA 5: Esquema de la doble membrana de *E. Coli*. Las Fluoroquinolonas y β -lactámico penetran por la porina OmpF de la membrana externa (ME), atraviesan la pared de proteoglucanos, el espacio periplásmico y finalmente la membrana interna (MI) donde las fluoroquinolonas penetraran a través de la capa de fosfolípidos(PL), mientras que los β -lactámicos se unirán a proteínas de unión a penicilinas (PLP). Figura extraída de (Pages et al., 2004) (39)

sensibilidad a meropenem sumado a una sobreproducción de la cefalosporinasa AmpC y la sobreexpresión de bombas de expulsión tales como MexAB-OprM , MexXT-OprM , MexcCD-OprJ o MexXY-OprM (24) (40). *Pseudomonas aeruginosa* también es causa de infecciones sanguíneas asociadas a morbilidad y mortalidad, tal y como muestra el estudio realizado por (Estepa et al., 2017) (41) en el Hospital Universitario de Birmingham (Reino Unido).

El medio de transmisión de este patógeno es mediante el agua entre pacientes de esta unidad de Hematología. Los casos aumentaron hasta un 25% en 2016 siendo en 2010 un 8,6% el porcentaje de infectados. La mortalidad entre estos años aumentó también, de un 9% a un 36%. Se incrementó el uso de meropenem como tratamiento paliativo entre 2013 y 2015 hasta un 17% más, disminuyendo considerablemente su recetado en 2016 dado que el porcentaje de meropenem resistente ascendió de un 17% en 2010 a un 38% en 2016. Los datos muestran que el uso prolongado de meropenem hasta 2015 indujo consecuentemente un aumento de resistencia en 2016 a dicho antibiótico. Además de controlar los medios de propagación, es necesario disminuir el consumo excesivo de antibióticos, añadiéndose por tanto a la lista de factores potenciales de riesgo, entre los que se encuentran los materiales hospitalarios, el contagio directo y el turismo.

Se han hechos estudios sobre esta misma especie, *Pseudomonas aeruginosa* en Irán, Turquía y España con resultados muy similares (42) (43) (44). El principal mecanismo de resistencia a carbapenémicos surge de una pérdida considerable de porinas OprD mediante deleciones, mutaciones o inserciones en su gen codificante como las secuencias de inserción (IS). En Irán, el estudio demuestra que todos los antibióticos empleados (β -lactámicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos) no tienen efecto contra esta cepa, a excepción de la colistina. En un 10% aproximadamente de los casos estas resistencias vienen mediadas por la presencia de genes oprD y no por carbapenemasas, especialmente cuando el antibiótico suministrado es imipenem.

En este caso se han identificado, tal y como comenté antes, elementos IS. Los elementos IS introducen repeticiones de secuencias cortas en los extremos del gen. El reportado en Irán, ISpu21, inserta secuencias repetidas de 6 pares de bases (TCTGAA) en cada uno de los extremos, llegando a formar un inserto de 1179 pb (42). En Turquía, este estudio detalla que el 25% de los aislados redujo la expresión de porinas y el 47,6 % incrementa la expresión de bombas de expulsión de tipo MexAB-OprM y MexXY-OprM relacionada con la resistencia a meropenem. Sólo un 5% como máximo presentan ambos mecanismos (43).

En un hospital español (San Pedro, Logroño) se encontró una cepa multirresistente (ST175) que presentaba una mutación en la porina D, genes truncados por las secuencias ISp4 y ISPa1328 que inactivan la expresión de los genes para dicha porina y relacionada nuevamente con la resistencia a carbapenémicos (44)(FIGURA 6)

En *Salmonella typhimurium* la resistencia a β -lactámicos es mediado también por bombas y porinas según los datos testados por (Uddin et al., 2018) (45). Se trabajó con 3 cepas diferentes, una salvaje (WT-ST) y las otras dos mutantes, una con resistencia inducida por ciprofloxacina (CI-ST) y otra con resistencia adquirida clínicamente (CA-ST).

La actividad de las bombas de expulsión fue determinada por la expresión relativa de fluorescencia residual usando un método de acumulación de un sustrato, que en este caso se trata de Bromuro de Etidio (EtBr) (FIGURA 7). El resultado es un incremento en la actividad β -lactamasa en los 2 mutantes junto con un aumento también de las bombas de expulsión en comparación a la cepa salvaje cuando hay ceftriaxone en el medio. Esta diferencia es debida a una sobreexpresión de genes que puede llegar a alcanzar el triple que WT-ST. Por ejemplo, los genes *marA*, *soxS* y *ramA* regulan los niveles de expresión de *acrAB*, *tolC* y *ompF*. En CA-ST, la sobreexpresión de *marA* y *ramA* está relacionada con la supresión de *ompF* (porina responsable de la regulación de la permeabilidad). Si a mayores se sobreexpresa también *soxS*, no solo se inactiva la transcripción para la porina *ompF* sino que también se potencia la expresión de los genes *AcrAB-TolC* codificantes para bombas de expulsión de β -lactámicos, cloranfenicol, sulfonamidas, tetraciclinas, macrólidos...etc. En conclusión, existen diversos tipos de bombas con actividades diferentes que regulan la permeabilidad y actuando como una barrera contra los antibióticos

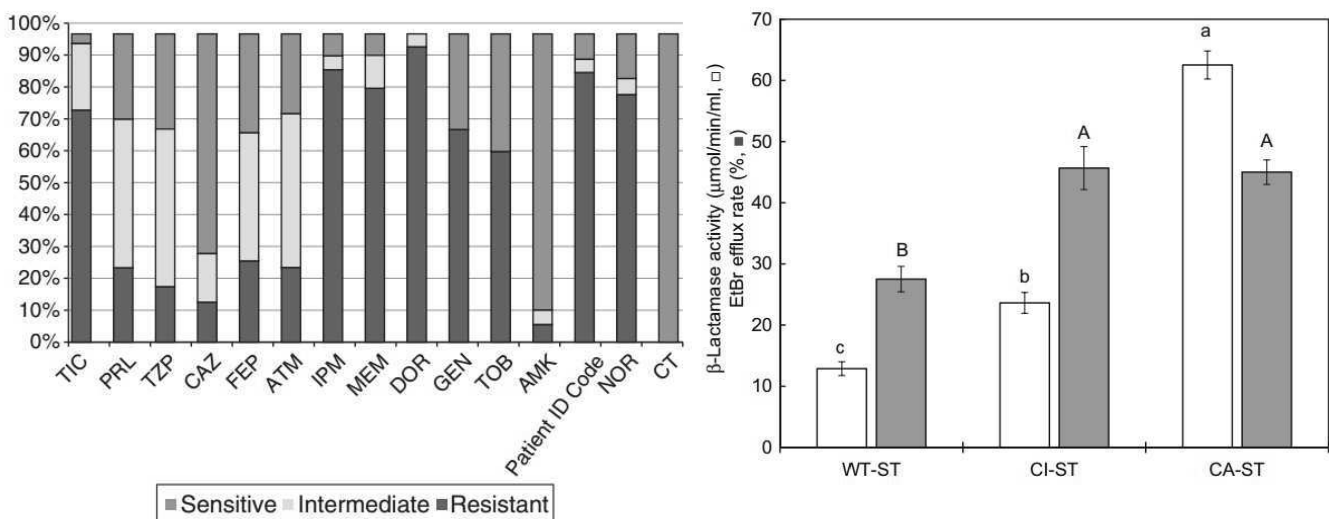


FIGURA 6 y 7: La Figura 6 corresponde al antibiograma de las muestras de *P. aeruginosa* cabapenem resistentes extraídas de 60 pacientes de un hospital español (San Pedro, Logroño). Se observan resistencias en más de un 60% de las muestras analizadas a 8 de los 15 antibióticos suministrados. Sin embargo la sensibilidad no supera un 40% en 12 de los 15 antibióticos. *P. aeruginosa* cabapenem resistentes es completamente sensible a colistin, en un 90% de los casos amikacin y en un 70% a ceftadime. Figura extraída de (Estepa et al., 2017) (44). En la Figura 7 se observa un diagrama de barras, las blancas corresponden a la actividad β -lactamasa en micromoles/min/ml y las oscuras al flujo de EtBr en %. Las letras (A-C y a-c) representan las diferencias que hay entre los 3 ensayos con la cepa salvaje WT-ST, la inducida por ciprofloxacina (CI-ST) y otra con resistencia adquirida clínicamente (CA-ST). Se observa que la actividad β -lactamasa es considerablemente menor en la cepa salvaje (B) que en los mutantes, cuya actividad es similar (A). El % de EtBr, que mide la actividad de las bombas de expulsión, es bastante superior en las cepas mutantes CI-ST y CA-ST (a y b) que en la salvaje WT-ST (c). Por tanto según este ensayo, CA-ST es la cepa que más resistencia presenta. Figura extraída de (Uddin et al., 2018) (45).

La resistencia o sensibilidad puede venir mediada por la presencia o ausencia de inhibidores de β -lactamasas o inhibidores de bombas como fenilalanina-arginina- β -Naftilamida (PA β N). Sin embargo, hay datos que revelan que la presencia de PA β N puede ocasionar igualmente una resistencia a carbapenémicos, tal y como muestra el estudio realizado por (Vera-Leiva et al., 2018) (46) sobre *Klebsiella pneumoniae*

productora de KPC. Esto ocurre porque el sitio de unión de PA β N a la bomba de expulsión no es el mismo que el de este grupo de antibióticos y éstos pueden penetrar sin ser inhibidos por competición. No obstante, se ha confirmado la presencia de bombas acrAB-tolC, que aunque no son funcionales para carbapenémicos sí los son para ciprofloxacina (igual que el caso anterior de *Salmonella typhimurium*). Ciprofloxacina y PA β N sí compiten por el mismo sitio de unión por lo que este sistema puede ser inhibido por competición.

2.3 Tercera barrera: Intracelular

La siguiente barrera se sitúa dentro de la célula, en el citoplasma y orgánulos (ribosomas). A este nivel la célula modifica la toxina mediante reacciones redox o transferencias con la finalidad de desactivarla o hacerla menos competitiva por el sitio activo de unión. El sitio activo de unión también puede ser un punto importante de regulación, la célula puede tanto alterarlo como sintetizar nuevas sustancias que compitan con el antibiótico. En cuanto a los orgánulos, los ribosomas, por su importancia en la síntesis proteica, es una de las principales dianas contra la eliminación de bacterias, por lo que éstas también han desarrollado tácticas defensivas contra estos ataques. Los antibióticos más comunes contra esta diana son los macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, clindamicina, lincomicina...etc

Algunas proteínas de la familia de casetes de unión a ATP (ABC) confieren resistencia antibiótica dirigidos a ribosomas. La subfamilia ABC-F, se ha encontrado mayormente en Gram positivos y participa en la reparación del DNA, control de traducción y la resistencia a los antibióticos que se dirigen a la síntesis de proteínas, más concretamente a la subunidad grande 50S (47) (FIGURA 8).

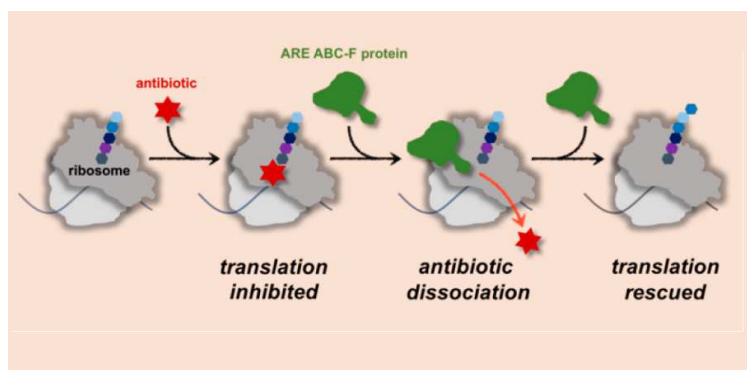


FIGURA 8: Efecto rescate de la proteína ABC-F sobre la inhibición del ribosoma por parte del antibiótico. Esquema extraído de (Sharkey et al., 2018) (47)

Estas proteínas se unen al ribosoma para rescatarlo de la inhibición. MrsE es una proteína unida a este casete que participa en la resistencia a macrólidos. Se une al sitio de salida del ribosoma donde sufre varios cambios conformacionales que no solo impiden que se una el antibiótico al ribosoma sino que también favorecen su expulsión por transportadores de bombeo. (48)

Así como los macrólidos inhiben la subunidad ribosomal 50S, los aminoglucósidos afectan a la subunidad pequeña 30S. Las modificaciones en el ribosoma pueden ser por metilaciones gracias a la presencia de genes como armA, rmtA o rmtB, o bien por mutaciones puntuales. *Mycobacterium tuberculosis* presenta resistencia a estreptomycin

ya que presenta una única copia del operón rRNA. Cuántas más copias haya del mismo operón en la célula, menos probabilidades de que las mutaciones afecten a todas es muy baja, sin embargo con una única copia la probabilidades aumentan. (49)

2.4 Cuarta barrera: Genética

Por último, a nivel genético, las bacterias regulan todos los mecanismos anteriores, por lo que se convierte en el principal objetivo de los investigadores. Además de regular la expresión génica con mutaciones, las bacterias pueden transmitir horizontalmente esos genes mediante plásmidos. También son importantes los integrones, transposones y cassetes génicos. Todos ellos, junto con los plásmidos, forman parte de un grupo denominado genes móviles. Entre los antibióticos más usados contra la barrera genética de la resistencia son las quinolonas, ácido fusídico, rifampicinas, sulfonamidas...etc

Las quinolonas son un grupo de antibióticos que bloquean la replicación del DNA uniéndose a la enzima DNA girasa causante de deshacer el superenrollamiento del DNA. En Reino Unido, el Hospital Universitario de Nottingham se utilizaron fluoroquinolonas como tratamiento para las bacteriemias de Enterobacterias. Desde 2002 hasta 2006 se ha usado en todos los casos. Sin embargo desde 2006 hasta 2016 el uso ha ido decreciendo a causa de la aparición de resistencias (50) Estas resistencias pueden venir como resultado mutaciones en los genes que codifican la DNA girasa (51)

TABLA 2: Tabla que muestra la evolución de las resistencias de bacteriemias de Enterobacterias a 3 antibióticos desde 2000 hasta 2016 en el Hospital Universitario de Nottingham (Reino Unido). El uso de quinolonas fue máximo en el período de 2006-2013 con un 20% de resistencia, sin embargo esto causó el aumento de resistencias. En los años 2014 y 2015 el % ascendió al 53% de las bacteriemias totales. En 2016 se redujo el uso a sólo 9 casos y el porcentaje de resistencias también bajó. Tabla extraída de (Mahida et al., 2017) (51)

Enterobacteriaceae that were:	No. (%) of isolates during time-periods:			
	2000–2002	2006–2013	2014–2015	2016
Fluoroquinolone resistant	22 (65)	60 (20)	48 (53)	9 (16)
Piperacillin/tazobactam resistant	8 (24)	28 (9)	16 (18)	6 (10)
Gentamicin resistant	7 (21)	31 (10)	13 (14)	7 (13)
Total	34 (100)	305 (100)	91 (100)	56 (100)

4. Objetivos

Los principales objetivos del presente trabajo es destacar cuáles son los principales mecanismos de resistencia que presentan las bacterias contra los antibióticos y cuáles son las terapias más actuales para combatirlas.

5. Conclusiones

Las bacterias son organismos sociales e “inteligentes” que han aprendido a defenderse de nuestros ataques a través de diversos mecanismos. Las previsiones a nivel mundial según la ONU es que en 2050 el número de muertes sea de 10 millones al año, superior al número de vidas que actualmente arrebatada el cáncer (53). Actualmente, tal y como refleja mi trabajo, las resistencias pasaron de ser únicamente naturales, es decir, intrínsecas de la propia familia a adquirir unas nuevas de otras cepas o familias mediante transmisión del material genético entre ellas (plásmidos). La relevancia de este trabajo por tanto, radica no sólo en las diferentes barreras que dispone una bacteria para resistir los ataques de moléculas antibióticas, sino en su combinación, convirtiendo así la tarea de búsqueda de antibióticos casi en una misión imposible. Estas multiresistencias pueden venir promovidas por una serie de malos hábitos como pueden ser el consumo excesivo de antibióticos por parte del ser humano y de los animales destinados a alimentación, las malas praxis relacionadas con la higiene en ambientes hospitalarios, y éstas, son extendidas por el turismo y comercio entre países. No obstante, no todo son malas noticias, aunque la amenaza es importante, las investigaciones no cesan y son prometedoras, con buenos resultados, aparecen nuevas sustancias con un gran potencial antimicrobiano, técnicas contra la formación y eliminación de biopelículas...etc. Pero no sirven de nada si como bien dije antes, nuestros hábitos no son los adecuados. Debemos avanzar de la mano de los investigadores y ayudarlos a que su trabajo sea más eficaz, ya que trabajan para nuestro bienestar.

6. Bibliografía

(1) Alexander Fleming. Biografía. [Internet]. [cited 2018 Jul 14]. Available from: <https://www.biografiasyvidas.com/monografia/fleming/>

(2) Chandki R, Banthia P, Banthia R. Biofilms: A microbial home. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2011; 15(2):111-114. doi:10.4103/0972-124X.84377.

(3) Klebba PE. The Porinologist. *Journal of Bacteriology*. 2005; 187(24):8232-8236. doi:10.1128/JB.187.24.8232-8236.2005.

(4) Vignoli R, Seija V. Principales mecanismos de resistencia antibiótica. En: Universidad de la República, Facultad de Medicina, Departamento de Bacteriología y Virología, Instituto de Higiene. *Temas de bacteriología y virología médica*. 2ª ed. Montevideo: Oficina del Libro FEFMUR; 2006. p. 649–62.

- (5) Pérez-Cano, Héctor Javier, Robles-Contreras, Atzín. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Rev médica MD*. 2013; 4(04):186–91.
- (6) Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L. Implicancias estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *Int J Morphol*. 2017; 35(4):1214–23. doi:10.4067/S0717-95022017000401214
- (7) Sklyar TV, Lavrentieva KV, Alyonkina YA, Kolomoets AM, Vinnikov AI. Resistance of nosocomial strains to antibacterial drugs and its link to biofilm formation. *Regul Mech Biosyst*. 2017; 8(4):540–6. doi:10.15421/021783
- (8) Levin-Reisman I, Ronin I, Gefen O, Braniss I, Shoshani N, Balaban NQ. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance. *Science*. 2017; 355(6327): 826–30. doi:10.1126/science.aaj2191
- (9) Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(4):322–32. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011
- (10) Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*. 2018;81(1):7–11. doi:10.1016/j.jcma.2017.07.012
- (11) Majumdar S, Mondal S. Conversation game: talking bacteria. *J Cell Commun Signal*. 2016; 10(4):331–5. doi:10.1007/s12079-016-0333-y
- (12) Majumdar S, Pal S. Bacterial intelligence: imitation games, time-sharing, and long-range quantum coherence. *J Cell Commun Signal*. 2017; 11(3):281–4. doi:10.1007/s12079-017-0394-6
- (13) Majumdar S, Pal S. Cross- species communication in bacterial world. *J Cell Commun Signal*. 2017; 11(2):187–90. doi:10.1007/s12079-017-0383-9
- (14) Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(10):981–90. doi:10.1111/1469-0691.12651
- (15) Szczuka E, Krzysińska S, Bogucka N, Kaznowski A. Multifactorial mechanisms of the pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* isolated from bloodstream infections. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(7):1259–65. doi:10.1007/s10482-017-1007-3
- (16) Hebrew University of Jerusalem. Bacteria 'sleep', then rapidly evolve, to survive antibiotic treatments: biophysicists use quantitative approaches from physics to understand biology. *ScienceDaily*. 2017 Feb 09. Disponible en <https://www.sciencedaily.com/releases/2017/02/170209142558.htm>
- (17) Shi S, Jia J, Guo X, Zhao Y, Chen D, Guo Y, et al. Reduced *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the presence of chitosan-coated iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2016; 11:6499–506. doi:10.2147/IJN.S41371

- (18) Franci G, Falanga A, Galdiero S, Palomba L, Rai M, Morelli G, et al. Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*. 2015;20(5):8856–74. doi:10.3390/molecules20058856
- (19) Park JS, Ryu EJ, Li L, Choi BK, Kim BM. New bicyclic brominated furanones as potent autoinducer-2 quorum-sensing inhibitors against bacterial biofilm formation. *Eur J Med Chem*. 2017; 137(8):76–87. doi:10.1016/j.ejmech.2017.05.037
- (20) Carvalho AP, Batista D, Dobretsov S, Coutinho R. Extracts of seaweeds as potential inhibitors of quorum sensing and bacterial growth. *J Appl Phycol*. 2017; 29(2):789–97. doi:10.1007/s10811-016-1014-1
- (21) Blackledge MS, Worthington RJ, Melander C. Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Curr Opin Pharmacol*. 2013; 13(5):699–706. doi.org/10.1016/j.coph.2013.07.004
- (22) Dickey JM, Perrot V. Phage to the rescue: adjunct phage treatment enhances the effectiveness of low antibiotic dose against *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *BioRxiv* 358879 [Preprint]. 2018:[23 p.]. doi:10.1101/358879
- (23) Resistencia a glucopeptidos (vancomicina y teicoplanina) en *Enterococcus spp.* Fenotipos VanA, VanB, VanD, y otros menos frecuentes (VanC, C2/3, E, F, G, L, M): Diagnóstico molecular por amplificación (PCR) y secuenciación. - IVAMI [Internet]. [cited 2018 Jul 5]. Available from: <http://www.ivami.com/es/microbiologia-clinica/371-resistencia-a-glucopeptidos-vancomicina-y-teicoplanina-por-los-fenotipos-vana-vanb-vand-u-otros-menos-frecuentes-i-vanc-e-f-g-l-y-m-i-b-diagnostico-molecular-por-ampliacion-pcr-y-secuenciacion>
- (24) Oteo J, Bou G, Chaves F, Oliver A. Microbiological methods for surveillance of carrier status of multiresistant bacteria. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017;35(10):667–75. doi:10.1016/j.eimc.2015.12.013
- (25) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969–76. doi: 10.1128/AAC.01009-09
- (26) Hilliquin D, Le Guern R, Thepot Seegers V, Neulier C, Lomont A, Marie V, et al. Risk factors for acquisition of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* among contact patients: a multicentre study. *J Hosp Infect*. 2017;98(3):253–9. doi:10.1016/j.jhin.2017.08.024
- (27) Di Mento G, Cuscino N, Carcione C, Cardinale F, Conaldi PG, Douradinha B. Emergence of a *Klebsiella pneumoniae* ST392 clone harbouring KPC-3 in an Italian transplantation hospital. *J Hosp Infect*. 2018; 98(3):313–4. doi:10.1016/j.jhin.2017.11.019
- (28) Liu S, Jing L, Yu ZJ, Wu C, Zheng Y, Zhang E, et al. ((S)-3-Mercapto-2-methylpropanamido)acetic acid derivatives as metallo- β -lactamase inhibitors: synthesis, kinetic and crystallographic studies. *Eur J Med Chem*. 2018; 145:649–60. doi:10.1016/j.ejmech.2018.01.032
- (29) Liew SM, Rajasekaram G, Puthuchery SD, Chua KH. Detection of VIM-2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Malaysia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;13:271–3. doi:10.1016/j.jgar.2018.01.026

- (30) Zhang E, Wang MM, Huang SC, Xu SM, Cui DY, Bo YL, et al. NOTA analogue: a first dithiocarbamate inhibitor of metallo- β -lactamases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(2):214–21. doi:10.1016/j.bmcl.2017.10.074
- (31) Yu ZJ, Liu S, Zhou S, Li H, Yang F, Yang LL, et al. Virtual target screening reveals rosmarinic acid and salvianolic acid A inhibiting metallo- and serine- β -lactamases. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(6):1037–42. doi:10.1016/j.bmcl.2018.02.025
- (32) Hinchliffe P, Tanner CA, Krismanich AP, Labbé G, Goodfellow VJ, Marrone L, et al. Structural and kinetic studies of the potent inhibition of metallo- β -lactamases by 6-phosphonomethylpyridine-2-carboxylates. *Biochemistry*. 2018;57(12):1880–92. doi:10.1021/acs.biochem.7b01299
- (33) Holloway AJ, Yu J, Arulanandam BP, Hoskinson SM, Eaves-Pyles T. Cystatins 9 and C as a novel immunotherapy treatment that protects against multidrug-resistant New Delhi metallo-beta-lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;62(3):e01900-17. doi:10.1128/AAC.01900-17
- (34) Castañeda J, Gómez K, Corrales L, Cortés S. Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *Nova*. 2016; 14(25):95–111. doi:10.22490/24629448.1733
- (35) Liu Z, Li J, Wang X, Liu D, Ke Y, Wang Y, et al. Novel variant of New Delhi metallo- β -lactamase, NDM-20, in *Escherichia coli*. *Front Microbiol*. 2018; 9:248. doi:10.3389/fmicb.2018.00248
- (36) van Bunnik BAD, Woolhouse MEJ. Modelling the impact of curtailing antibiotic usage in food animals on antibiotic resistance in humans. *R Soc Open Sci*. 2017; 4(4): 161067. doi:10.1098/rsos.161067
- (37) Maciel WG, da Silva KE, Croda J, Cayô R, Ramos AC, de Sales RO, et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit. *J Hosp Infect*. 2017; 98(3):300–304. doi:10.1016/j.jhin.2017.10.015
- (38) Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006; 258(1):72–7.
- (39) Pagès JM. Porines bactériennes et sensibilité aux antibiotiques. *Med Sci (Paris)*. 2004; 20(3):346–51. doi:10.1051/medsci/2004203346
- (40) Muderris T, Durmaz R, Ozdem B, Dal T, Unaldı O, Aydogan S, et al. Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J Infect Dev Ctries*. 2018; 12(1):1–8. doi:10.3855/jidc.9486
- (41) Garvey MI, Bradley CW, Biggs MJ, Holden E, Gill MJ. Selection of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a haematology unit? *J Hosp Infect*. 2018; 98(3):238–40. doi:10.1016/j.jhin.2017.10.023
- (42) Shariati A, Azimi T, Ardebili A, Chirani AS, Bahramian A, Pormohammad A, et al. Insertional inactivation of oprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Tehran, Iran. *New Microbes New Infect*. 2018; 21:75–80. doi:10.1016/j.nmni.2017.10.013

- (43) Oliver A. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*: role of high-risk clones in multidrug resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017; 35(3):137–8. doi:10.1016/j.eimce.2017.02.006
- (44) Estepa V, Rojo-Bezares B, Azcona-Gutiérrez JM, Olarte I, Torres C, Sáenz Y. Characterisation of carbapenem-resistance mechanisms in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered in a Spanish hospital. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2017; 35(3):141–7. doi:10.1016/j.eimce.2017.02.001
- (45) Uddin MJ, Ahn J. Characterization of β -lactamase-and efflux pump-mediated multiple antibiotic resistance in *Salmonella Typhimurium*. *Food Sci Biotechnol*. 2018; 27(3):921–28. doi:10.1007/s10068-018-0317-1
- (46) Vera-Leiva A, Carrasco-Anabalón S, Lima CA, Villagra N, Domínguez M, Bello-Toledo H, et al. The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide (PA β N) increases resistance to carbapenems in Chilean clinical isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018; 12:73–6. doi:10.1016/j.jgar.2017.12.003
- (47) Sharkey LKR, O'Neill AJ. Antibiotic resistance ABC-F proteins: bringing target protection into the limelight. *ACS Infect Dis*. 2018; 4(3):239–46. doi:10.1021/acsinfecdis.7b00251
- (48) Su W, Kumar V, Ding Y, Ero R, Serra A, Lee BST, et al. Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018; 115(20):201803313. doi:10.1073/pnas.1803313115
- (49) Grünbaum F. Resistencia a aminoglucósidos en *Enterobacteriaceae* [tesis doctoral]. Barcelona: Universitat Autònoma de Barcelona; 2011. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10803/42291>
- (50) Mahida N, Boswell T. Fluoroquinolone prophylaxis in haematopoietic bone marrow transplantation: a driver for antimicrobial resistance. *J Hosp Infect*. 2018; 98(3):241–2. doi:10.1016/j.jhin.2017.11.009
- (51) R. Taléns-Visconti, T.M. Garrigues EC. Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas [Internet]. [cited 2018 Jul 12]. Available from: http://seq.es/seq/html/revista_seq/ultima/rev1/rev1.html
- (52) Torreón U. Universidad Autónoma de Coahuila Facultad de Medicina. 2011; (January):1–36.
- (53) Resistencia a los antibióticos: La 'epidemia' que matará a más gente que el cáncer (si no lo remediamos) | Planeta Futuro | EL PAÍS [Internet]. [cited 2018 Jul 14]. Available from: https://elpais.com/elpais/2017/09/21/planeta_futuro/1506004048_715947.html
- (54) Satpathy S, Sen SK, Pattanaik S, Raut S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatal Agric Biotechnol*. 2016; 7:56–66. doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.002

