



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

**EFEECTO ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *Escherichia coli* PRODUCTORAS DE
BACTERIOCINAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES**

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

**ALUMNO: KARINA FALCÓN GONZÁLEZ
PROFESOR GUÍA: Mg. OLGA LOBOS GILABERT**

TALCA-CHILE

2019

**AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN
DE MEMORIAS DE PREGRADO Y TESIS DE POSTGRADO**

Yo, Karina Falcón González, cédula de Identidad N° 18.118.856-1 autor de la memoria o tesis que se señala a continuación, si autorizo a la Universidad de Talca para publicar en forma total o parcial, tanto en formato papel y/o electrónico, copias de mi trabajo.

Esta autorización se otorga en el marco de la Ley N° 20.435 que modifica la Ley N° 17.336 sobre Propiedad Intelectual, con carácter gratuito y no exclusivo para la Universidad.

Título de la memoria o tesis:	EFFECTO ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES
Unidad Académica:	Facultad de Ciencias de la Salud
Carrera o Programa:	Tecnología Médica
Título y/o grado al que se opta:	Licenciado en Tecnología Médica
Nota de calificación	6,7



Firma de Alumno	
Rut:	18.118.856 - 1
Fecha:	05 / 03 / 19

INDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
5. MATERIALES Y METODOS	23
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIONES.....	42
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	44

1. RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar el efecto antimicrobiano de cepas de *Escherichia coli* productoras de bacteriocinas sobre cepas bacterianas resistentes.

Para esto, se realizó la recuperación e identificación de cepas bacterianas de desecho provenientes del Hospital de Constitución y del Laboratorio Clínico Alexander Fleming de Talca, causantes de infección del tracto urinario, las cepas testeadas no contaban con ningún tipo de identificación.

El estudio comprendió la recuperación y aislamiento de las cepas de *E. coli* en un medio de cultivo nutritivo. Se realizaron pruebas bioquímicas de identificación bacteriana, para corroborar la presencia de *E. coli*; pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* con el método de difusión en disco; identificación de fenotipos de resistencias; y estudio de actividad antimicrobiana de cepas con mayor susceptibilidad a los antimicrobianos frente a cepas resistentes para lo cual se realizaron ensayos microbiológicos que consistieron en poner a prueba la capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de una cepa de *E. coli* productora de bacteriocina frente a cepas que presentan una alta resistencia a los antimicrobianos.

2. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, con el creciente aumento de resistencia bacteriana que ha surgido mundialmente debido al uso y abuso de los antimicrobianos, es que se hace importante la búsqueda de nuevas sustancias o agentes con capacidad de combatir bacterias que presenten resistencia a los antibióticos que habitualmente se utilizan en la clínica para su tratamiento.

Hoy en día, existe una gran diversidad de antibióticos capaces de erradicar distintas cepas bacterianas productoras de infecciones en humanos. La resistencia bacteriana radica en el abuso de estos agentes antimicrobianos por parte de los pacientes, lo que provoca un aumento rápido en la capacidad de las bacterias para adquirir nuevos mecanismos de resistencia. Lo anterior, ha provocado un aumento en el número de cepas que presentan algún tipo de resistencia, con implicancia e importancia en la salud y tratamiento adecuado de pacientes infectados.

La resistencia bacteriana, que se traduce en la capacidad de algunas cepas de contrarrestar los efectos bacteriostáticos y bactericidas de los antibióticos, constituye un problema mundial de salud pública, ya que afecta directamente el tratamiento de pacientes ambulatorios y hospitalizados. Este fenómeno, que ha ido en aumento produce mayores tasas de morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas, tanto en países subdesarrollados como en aquellos que son más avanzados en aspectos de salud.

La resistencia bacteriana es una cualidad particular de la evolución natural de las bacterias, seleccionada bajo la presión de los antimicrobianos, tanto de antibióticos como de antisépticos o desinfectantes.

En países en vías de desarrollo se potencian factores que agravan la situación debido a que, una vez aparecidas las bacterias resistentes, éstas se multiplican y se diseminan en la comunidad, y al faltar tratamientos apropiados, se vuelven endémicas. Aunque la resistencia afecta también a los países desarrollados, los efectos son variables, ya que existen distintos hábitos de prescripción de antibióticos, tratamiento y prácticas de higiene.

Se ha demostrado en diversos estudios, que la rápida progresión de la resistencia bacteriana aparece cada vez que se emplea un nuevo antibiótico. Las bacterias se adaptan a él con mayor rapidez, generalmente, en un periodo de dos a cuatro años desarrollando nuevos mecanismos de defensa. Aunque para cada nueva forma de resistencia ha sido posible que la industria farmacéutica proporcione un nuevo antibiótico, actualmente se ha llegado a una situación en que no se comercializa ninguna nueva clase de antibióticos, es decir, ninguna capaz de atacar una nueva bacteria, aun cuando se siguen realizando modificaciones estructurales en moléculas de las diversas familias de estos fármacos. A pesar de ello, nuestra reserva de antibióticos no es suficiente, ya que se presentan cepas capaces de resistirlos todos.

En el contexto anterior, es de vital importancia buscar constantemente nuevas sustancias o productos antimicrobianos complementarios a lo existente y que estos puedan acompañar un tratamiento en pacientes con infecciones causadas por cepas resistentes a los tratamientos convencionales.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1 Resistencia bacteriana:

“La resistencia puede definirse como el proceso por el cual un microorganismo de determinada especie puede vivir en concentraciones de antimicrobiano que destruirían a otro de la misma especie” (1)

La resistencia bacteriana es un fenómeno biológico natural, que puede estar dado de manera intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es inherente a cada familia, especie o grupo de bacterias, situación que es invariable y heredable, que se desarrolla en forma natural (2), es el resultado de una carencia estructural o química del microorganismo sobre el cual debería actuar el antimicrobiano. Esta es una resistencia predecible, de manera tal que al identificar el microorganismo también se conoce un perfil de resistencia asociado a ese microorganismo, estos perfiles de resistencia intrínseca son útiles al momento de realizar un antibiograma en la clínica, ya que entregan las directrices para decidir que antimicrobianos probar contra cada tipo específico de microorganismo (3). Mientras que la resistencia de tipo adquirida es variable y es adquirida por una cepa de una especie bacteriana a la cual normalmente no se le asocia, puede ser producto de una mutación cromosómica espontánea o puede ocurrir por la adquisición de material genético extracromosómico (1). Este tipo de resistencia es importante en la clínica, debido a que cuando se encuentran cepas con resistencias adquiridas en muestras de pacientes infectados, es difícil establecer un tratamiento efectivo, eficaz y rápido, ya que se requerirán estudios adicionales con los cuales poder establecer el tratamiento más apropiado.

3.1.1 La resistencia adquirida cromosómica es provocada por una mutación que para que sea manifestada por la bacteria es necesario que exista exposición al antimicrobiano. Es de muy baja frecuencia, heredable, permanente y espontánea. Puede expresarse en una sola generación bacteriana cuando se adquiere de manera brusca o en varias generaciones cuando la sensibilidad disminuye de manera progresiva (4).

3.1.2 La resistencia adquirida extracromosómica puede ser mediada por plásmidos: estructuras genéticas no vitales para la célula que junto con el cromosoma bacteriano constituyen el genoma bacteriano (5) (6), los plásmidos son vehículos de diseminación de genes de resistencia entre poblaciones bacterianas independiente de la especie, son autorreplicativos, por consiguiente pueden ser mantenidos en las nuevas generaciones originadas luego de la división celular (difusión vertical). Otros poseen la capacidad de replicarse y transferirse al mismo tiempo, a otra célula vecina (difusión horizontal) (5). Causan un tipo de resistencia transferible y que puede ser múltiple. Existen dos mecanismos a través de los cuales se realiza la transferencia 1) Conjugación, realizada por plásmidos conjugativos, este tipo de transferencia se observa en bacterias grampositivas y gramnegativas, sobre todo en enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa* (4), se denomina plasmido R, y 2) Transducción, realizada por plásmidos no conjugativos, este es un mecanismo de transferencia realizado por un fago bacteriano, el cual transfiere ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra (4) (7).

Los transposones son elementos génicos que pueden provocar resistencia adquirida extracromosómica. Transposón es un elemento genético transportable, una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, mediante un fenómeno conocido como transposición. En este proceso, se pueden causar mutaciones y cambio en la cantidad de ADN del genoma. Es capaz de realizar la transferencia de material genético de un plásmido a otro, de ADN cromosómico a un plásmido, de un plásmido a un bacteriófago, etc (4).

Otros elementos causantes de este tipo de resistencia son los Integrones estos actúan de manera natural como sistema de recombinación, facilitando la ganancia y expresión de determinantes de resistencias. Pueden contener genes de resistencia de diferentes familias de antimicrobiano, “incluyendo sulfamidas, aminoglucósidos, β -lactámicos, trimetroprima, cloranfenicol, rifampicina y eritromicina” (5). Habitualmente se encuentran integrados en plásmidos que comúnmente están asociados a transposones, lo cual favorece su diseminación. La presencia de integrones se asocia con el creciente aumento de la resistencia a los antimicrobianos y con multirresistencia tanto en infecciones nosocomiales como de origen comunitario.

Una vez adquirida la información genética, la resistencia bacteriana se verá expresada por un fenotipo de resistencia el cual aparece por cuatro mecanismos, que pueden expresarse de manera aislada o en conjunto (8).

3.2 Mecanismos de resistencia antimicrobiana:

3.2.1 Mecanismos enzimáticos de inactivación:

Muchas enzimas son capaces de modificar los antimicrobianos provocando que este pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes (9), estas son enzimas hidrolíticas que destruyen la unión peptídica endocíclica del anillo beta-lactámico (10) lo que les confiere a los microorganismos bacterianos resistencia a antibióticos betalactámicos. Estas enzimas pueden ser codificadas desde plásmidos o desde un origen cromosómico y de producción inducible o constitutiva. La cantidad y naturaleza de la enzima va a influir en el fenotipo de resistencia que presente el microorganismo (11). Muchos microorganismos poseen genes intrínsecos para estas enzimas, en los estafilococos estas enzimas se originan a

partir de plásmidos, son inducibles y frecuentemente extracelulares. Mientras que en bacterias gramnegativas se ubican en el espacio periplásmico y poseen su origen en plásmidos o transposones, generalmente son constitutivas o cromosómicas inducibles (4), estas últimas pueden desreprimirse y transformarse en constitutivas por efecto de alguna mutación.

3.2.2 Cambios en los puntos de acción:

“La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano (10).”

La modificación de PBP (*penicillin-binding-protein*), el cual es un complejo enzimático implicado en la síntesis del peptidoglicán en bacterias grampositivas, se ve afectado por mutaciones a nivel bacteriano, lo que va a provocar modificación en el sitio de unión y por ende el antimicrobiano, no podrá actuar ni generar su efecto bactericida o bacteriostático, generando resistencia a ellos.

La resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus* (SAMR), es uno de los problemas de resistencia antimicrobiana más importantes a nivel mundial en la actualidad. Es causada por una PBP con muy baja afinidad por los betalactámicos (PBP2a), esta proteína está codificada por un gen *mecA* que constituye uno de los integrantes de un casete cromosómico denominado SCC (*staphylococcal chromosomal cassette*), que podría incluir otros genes de resistencia lo que explicaría la multiresistencia que habitualmente presentan los SARM (11).

En cuanto a la resistencia a quinolonas, el principal y mejor estudiado mecanismo de resistencia en cepas obtenidas en la clínica, corresponde a alteraciones de la ADN-girasa y

de la topoisomerasa IV, en consecuencia a mutaciones en las regiones QRDR (*quinolone-resistance determining region*) en los genes a nivel cromosómico que codifican topoisomerasas de tipo II (*gyrA* y *gyrB* para la ADN-girasa, y *parC* y *parE* para la topoisomerasa IV) (12).

3.2.3 Alteración en la permeabilidad de la pared celular:

Este mecanismo de resistencia se da principalmente en gramnegativos, ya que su membrana externa es rica en lípidos lo que la hace impermeable a sustancias hidrofílicas, por lo cual dichas sustancias solo podrán penetrar el microorganismo a través de proteínas transmembrana con función de porinas.

Las porinas son proteínas formadoras de canales llenos de agua que se encuentran embebidos en la membrana externa de las bacterias y que regulan la entrada de ciertos elementos, entre ellos, los antibióticos (9). Cambios conformacionales en estas proteínas conllevan a que no ingresen los antimicrobianos al espacio periplásmico.

3.2.4 Bombas de eflujo:

Este tipo de resistencia es de tipo inespecífico y que afecta a diferentes grupos de antibióticos como betalactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (13).

En gramnegativos estos sistemas en general se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, una con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa.

Dentro de los múltiples sistemas de eflujo, los más conocidos son Mex AB-Opr M, Mex CD-Opr J y Mex EF-OprN. Siendo Mex A, Mex C y Mex E proteínas homólogas de aproximadamente 110 kD asociadas a la membrana citoplasmática; Mex B, Mex D y Mex F proteínas de aproximadamente 40 kD, responsables de la fusión de ambas membranas y por último Opr M, J y N porinas de membrana externa de aproximadamente 50 kD. Estos sistemas así constituidos exportan moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa. En grampositivos se trata de una proteína transmembrana con función ATPasa que actúa como bomba de eflujo (9).

3.3 Resistencia en bacilos gramnegativos:

3.3.1 Modificación enzimática del antibiótico:

Debido a que el mecanismo de resistencia a los antibióticos, más prevalente en las bacterias gramnegativas es la producción de β -lactamasas, es importante mencionar las más prevalentes:

3.3.2 Beta-lactamasas:

Los antibióticos betalactámicos presentan en su estructura un anillo betalactámico, el cual es responsable, en gran medida, de su efecto antimicrobiano.

Las betalactamasas son enzimas que poseen la capacidad de hidrolizar el anillo betalactámico y por ende inactivar el efecto de esto antimicrobianos.

Los genes que codifican estas enzimas se pueden encontrar a nivel cromosomal y plasmidial, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, y representa un reto para la salud pública en el control de las infecciones (9).

3.3.3 Betalactamasas tipo AmpC:

Son enzimas codificadas por cromosomas en una amplia variedad de gramnegativos (*Aeromonas spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.* y *Serratia spp.*) (9). También se ha encontrado AmpC mediada por plásmidos en *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp.* Estas betalactamasas hidrolizan cefalosporinas de espectro reducido, cefalosporinas de tercera generación, aztreonam e inhibidores de betalactamasas. Las bacterias con AmpC cromosómico, en condiciones normales, producen esta enzima en bajas cantidades sin alterar significativamente la sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, pueden ocurrir mutaciones espontáneas en los genes que regulan la producción de AmpC, lo cual lleva a la producción constitutiva de esta enzima, en suficiente cantidad como para hidrolizar los antibióticos antes mencionados (9).

3.3.4 Betalactamasas de espectro extendido (BLEE):

Las BLEE han sido identificadas en una gran variedad de especies de bacterias gramnegativas, dentro de estas, *Klebsiella spp.* y *Escherichia coli* son las mayormente implicadas. Estas enzimas entregan resistencia a las oximino-cefalosporinas, aztreonam,

penicilas y cefalosporinas de espectro reducido, pero son incapaces de hidrolizar Carbapenem y Cefamicinas, como cefoxitina y cefotetán.

Estas enzimas son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, el sulbactam y tazobactam a diferencia de las enzimas de tipo AmpC que son capaces de hidrolizar a los antibióticos antes mencionados (13).

3.3.5 Carbapenemasas:

Este tipo de enzimas son infrecuentes en las cepas hospitalarias y se caracterizan por ser capaces de hidrolizar todos los betalactámicos incluyendo Carbapenémicos. Estas enzimas pertenecen al grupo molecular B (metaló betalactamasas) y también hay algunas pertenecientes al grupo A (betalactamasas plasmidiales).

Carbapenemasas grupo B (metaló β -lactamasas); estas enzimas no pueden ser antagonizadas por sulbactam, tazobactam o ácido clavulánico. Aztreonam es el único antimicrobiano que mantiene actividad contra cepas portadoras de esta enzima. Las enzimas del grupo B pueden ser encontradas habitualmente en la especie *Stenotrophomonas maltophilia* donde es codificada a nivel cromosomal y en forma constitutiva. Este tipo de enzimas se han detectado ocasionalmente en plásmidos de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* y *Klebsiella pneumoniae* y puede ser detectado fenotípicamente mediante la adición de EDTA al medio de cultivo, compuesto que permite la quelación de zinc, un cofactor importante en su funcionamiento. Algunas denominaciones conocidas son VIM, IMP y GIM.

Carbapenemasas grupo A: Son ocasionales, han sido descritas en *K. pneumoniae* y denominadas por ello KPC. Aparecieron en Chile el año 2012. Otros exponentes conocidos son las enzimas IMI, NMC y SME. Pueden ser inhibidas por avibactam (13).

3.3.6 Resistencia a aminoglucósidos:

En bacilos gramnegativos este tipo de resistencia es mediado por enzimas que modifican químicamente el antimicrobiano, entre ellas se encuentran adenilación, fosforilación o acetilación. El espectro de acción de este tipo de enzimas es limitado y específico, pudiendo inactivar gentamicina, pero solo unas pocas serán activas contra amikacina, lo anterior explicaría porque este tipo de resistencia no se da de forma cruzada, y de la misma forma se explica que la multiresistencia ante aminoglucósidos está dada por la presencia de varias enzimas con diferentes mecanismos de acción de manera simultánea (13). La suma de diferentes genes permite la expansión del espectro de resistencia ante los aminoglucósidos, lo que contrasta con el modelo de las beta-lactamasas, donde el aumento de espectro se da por cantidad o por cambios evolutivos en el sitio activo de la enzima.

3.3.7 Resistencia a sulfonamidas y cloranfenicol:

La resistencia a sulfonamidas es producida ya sea por: a) un aumento de la síntesis del ácido para-aminobenzoico; b) mutaciones en la dihidropteroato sintetasa o; c) la existencia de enzimas alternativas codificadas en plasmidios que hacen inefectiva la acción de las sulfonamidas. La resistencia a las sulfonamidas es de tipo cruzada. El compuesto trimetoprim actúa en la etapa metabólica posterior al lugar de acción de las sulfonamidas inhibiendo la dihidrofolato reductasa bacteriana. La resistencia a este compuesto puede ser cromosomal o plasmidial. En el primer caso por mutaciones en la enzima que hacen inefectiva la acción de

trimetoprim o por hiperproducción de la misma enzima sin mutaciones. En el segundo caso por la expresión de enzimas alternativas codificadas en plasmidios, las que no son inhibidas por este compuesto. La resistencia ante cloranfenicol es mediada generalmente por un mecanismo enzimático (acetilación). Se han descrito variantes de esta enzima y los genes respectivos pueden residir a nivel cromosomal o plasmidial (13).

3.4 *Escherichia coli*:

Escherichia coli es uno de los microorganismos más estudiados y más ampliamente conocido dentro de las enterobacterias. Su distribución es ubicua, encontrándose en suelo, agua y tracto intestinal de animales y el hombre (14), siendo la bacteria mayormente aislada en procesos infecciosos en las laboratorios de microbiología.

E. coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, (15) sus principales características bioquímicas se indican en la Tabla N°1. Este microorganismo está presente en intestino del hombre desde su nacimiento, colonizándolo como parte de su microbiota normal, pero existen cepas patógenas capaces de provocar distintos cuadros clínicos.

E. coli es un patógeno que puede estar involucrado en cuadros de diarrea, y en infecciones extraintestinales entre las que se incluyen infecciones de las vías urinarias. Existen diferentes patotipos los cuales se clasifican según las características clínicas y sitio de infección de la bacteria, entre ellos se encuentran: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), con adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC). Además se incluyen aquellas cepas que producen infecciones extraintestinales como las septicemias (ExEC) y las de vías urinarias (UPEC) (16).

TABLA N°1: IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *Escherichia coli*.

Prueba bioquímica	% de positividad
Oxidasa	0
Producción de indol	98
Rojo de metilo	99
Voges-Proskauer	0
Citrato de Simmons	1
H ₂ S (TSI)	1
Hidrólisis de urea	1
Utilización de malonato	0
Acido de glucosa	100
Gas de glucosa	95
Fenilalanina desaminasa	0
Lisina descarboxilasa	90
Arginina dihidrolasa	17
Ornitina descarboxilasa	65
Movilidad a 36 °C	95
Hidrolisis de gelatina a 22 °C	0
Crecimiento en KCN	3
Fermentación de lactosa	95
Fermentación de sacarosa	50

(Rodríguez, 2002) (15)

TABLA N°1: CONTINUACIÓN IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *E. coli*

Fermentación de D-manitol	98
Fermentación de D-sorbitol	94
Fermentación de mucato	95
Fermentación de dulcitol	60
Fermentación de salicina	40
Fermentación de adonitol	5
Fermentación de inositol	1
Fermentación de L-arabinosa	99
Fermentación de rafinosa	50
Fermentación de L-ramnosa	80
Fermentación de maltosa	95
Fermentación de D-xilosa	95
Fermentación de trealosa	98
Fermentación de celobiosa	2
Fermentación de α -metil-D-Glucósido	0
Fermentación de eritritol	0
Hidrólisis de la esculina	35
Fermentación de melobiosa	75
Fermentación de D-arabitol	5
Fermentación de D-manosa	98

(Rodríguez, 2002) (15)

TABLA N° 1: CONTINUACIÓN IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE *E. coli*

Fermentación de glicerol	75
Nitrato a nitrito	100
Tartrato de Jordán	95
Utilización de acetato	90
Lipasa (aceite de maíz)	0
DNasa a 25 °C	0
ONPG	95

(Rodríguez, 2002) (15)

E. coli posee una gran capacidad para adquirir y transferir material genético por vía horizontal, así como, a la presencia de genes cromosomales que permiten la inserción y expresión de genes adquiridos, algunos de los cuales se consideran como responsables de la virulencia del microorganismo (17).

E. coli tiene implicancia en la transferencia de resistencia antimicrobiana tanto en la comunidad como a nivel nosocomial. Principalmente se encuentra el mecanismo de resistencia AmpC, el cual es natural en *E. coli*, pero actualmente estas cepas de patógenas han adquirido otros mecanismos de resistencia como Betalactamasas de amplio espectro (BLEA), las cuales se encuentran intrínsecamente en *Klebsiella*, y también Betalactamasas de espectro extendido (BLEE), lo cual le ha entregado un espectro de resistencia aumentado (16).

3.5 Bacteriocinas:

Otra característica que considerar en *E. coli* es la capacidad que poseen la mayoría de sus cepas de producir bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal y son segregadas por un gran número de bacterias para inhibir el crecimiento de otros microorganismos competidores (18). Frecuentemente este tipo de sustancias actúan frente a bacterias estrechamente relacionadas entre sí, sin embargo se ha demostrado que podrían tener actividad sobre otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos (19). Estas proteínas tienen muchas características que las convierten en alternativas a los antibióticos convencionales ya que presentan un estrecho espectro de actividad, por lo que podrían utilizarse contra ciertas bacterias específicas patógenas o no-beneficiosas sin afectar la microbiota normal.

Las bacteriocinas fueron detectadas por primera vez por André Gratia en 1925, quien observo la inhibición del crecimiento de algunas cepas de *E. coli* por la acción de un compuesto antibacteriano liberado al medio por la cepa *E. coli* V, a este compuesto lo denominó colicina V, sin embargo el primer investigador en acuñar el término bacteriocina fue Jacob en el año 1952 (20).

Estos péptidos frecuentemente actúan sobre la membrana celular y existe una gran variedad de bacteriocinas encontradas en una gran cantidad de especies bacterianas, e incluso podrían existir distintos tipos de bacteriocinas dentro de una misma especie (21).

La producción de las bacteriocinas está relacionada de manera dependiente al crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora, correlacionándose la biomasa obtenida con la cantidad de bacteriocina producida (22).

Las bacteriocinas se pueden clasificar en dos grandes grupos aquellas que son producidas por bacterias grampositivas y las producidas por bacterias gramnegativas (23).

En el caso de las bacteriocinas producidas por bacterias gramnegativo se clasifican en base a su masa molecular, definiendo dos grupos: aquellas que poseen una masa molecular mayor a 10 kDa se denominan colicinas y aquellas que poseen una masa molecular menor a 10 kDa se denominan microcinas. Las colicinas tienen como característica poseer un espectro de acción acotado y por tener una actividad mediada por unión a receptores específicas de membrana. Además, la síntesis de estas colicinas, está regulada por un mecanismo dependiente del sistema SOS. Por otro lado, las microcinas son sintetizadas principalmente durante la fase estacionaria y no son reguladas por el sistema SOS (24).

Entre las principales características de patogenicidad que se han encontrado en cepas de *E. coli*, se encuentran su relación con el antígeno O y la presencia de factores extra cromosómicos como la producción de aerobactinas, factor R, colicinas y hemolisinas. En los últimos 30 años se ha visto un mayor interés en el estudio y aplicación de bacteriocinas en el sector industrial, específicamente en la industria alimentaria, donde se han desarrollado diversas investigación en torno a su detección, producción, purificación, mecanismo de acción, características bioquímicas, propiedades bactericidas, microorganismos inhibidos o sensibles y su exitosa aplicación en la bioconservación de los alimentos (25).

Las colicinas producidas por algunas cepas de *E. coli* son proteínas antibacterianas codificadas genéticamente por plásmidos que les confieren ventajas de supervivencia a las cepas portadoras(26), estas proteínas se han estudiado y clasificado desde 1948 por Frédériq (27).

Las colicinas se clasifican en base a que la cepa productora es resistente a su propia colicina, propiedades físicas y propiedades antigénicas. Una de las clasificaciones más aceptadas ha sido la de Davies y Reeves en 1975 (28) donde se consideran dos grupos: Colicinas A: que consideran el subgrupo E (colicinas inactivas en mutantes *btuB*); A, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, K, L, N, S4 y X. Y un segundo grupo de Colicinas B: donde se encuentran los tipos B, D, G, H, Ia, Ib, m, Q y V que tienen como característica que las mutantes resistentes a colicinas de este grupo no presentan daños severos en la pared externa, pero tienen alteraciones en algunos elementos de transporte.

Dentro de las colicinas mayormente aisladas en cepas de *E. coli* se encuentran la tipo E1 en sujetos sanos y la colicina V en sujetos enfermos (29). Es por esto que se ha postulado a la colicina V como un posible factor de virulencia ya que se ha demostrado que las cepas que portan el plásmido que codifica para este tipo de colicina presentan una mejor adherencia (30).

Los mecanismos de acción implicados en la capacidad bactericida de las colicinas son variados y poco conocidos, y dependen del tipo de colicina presente en la cepa productora. Dentro de los mecanismos de acción de las colicinas se encuentran aquellas que son capaces de degradar ADN o ARN, aquellas que inhiben las síntesis de peptidoglicanos y aquellas que forman poros de membrana. Independientemente de su mecanismo de destrucción definitivo, todas las colicinas deben cruzar al menos la membrana externa para alcanzar sus objetivos. (31) (32). Para realizar lo anteriormente mencionado, las colicinas poseen una estructura de domino bien definida, un dominio de eliminación, catalizador o formador de canales ubicado en el extremo C-terminal, un dominio de unión a receptor (R) en la parte central de la molécula y un dominio de translocación (T) ubicado en la parte N-terminal de la proteína (33) (34) (35) (36).

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis:

Cepas de *Escherichia coli* que producen bacteriocinas poseen efectos antimicrobianos eficaces contra cepas de bacterias resistentes.

Objetivo General:

Determinar el efecto antimicrobiano de las cepas de *Escherichia coli* productoras de bacteriocinas sobre cepas bacterianas resistentes.

Objetivos específicos:

1. Evaluar e identificar fenotipos de resistencia a antibióticos de las cepas testeadas.
2. Identificar cepas productoras de bacteriocinas con efecto antimicrobiano.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano de cepas de *Escherichia coli* productoras de bacteriocina sobre cepas resistentes a antimicrobianos de uso frecuente.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Obtención de cepas bacterianas:

Las cepas fueron donadas por el Laboratorio Clínico Alexander Fleming de Talca identificadas con números (serie 1 a 7; serie 36 a 47 y 51 a 52), y por el Hospital de Constitución las cuales contenían un código de identificación de su procedencia H: Hospital de Constitución; CA: Cerro Alto, PA: Policlínico Adulto Hospital de Constitución; y E: Empedrado. Las cepas tienen como característica común producir infecciones del tracto urinario (ITU).

5.2. Recuperación y aislamiento de las cepas bacterianas:

Las cepas fueron transportadas en tubos Eppendorf, con un medio sólido nutritivo (agar soya tripticasa), el cual permitió que la bacteria pudiera crecer y mantenerse viable hasta llegar al laboratorio.

Una vez en el laboratorio se realizó el aislamiento de la bacteria en placas de Agar Soya Tripticasa, se procedió a tomar una muestra desde el tubo Eppendorf con el asa bacteriológica y se sembró en la placa de manera tal de obtener colonias aisladas. Luego éstas, se incubaron en la estufa a 37 °C durante 24 horas lo que permitió el crecimiento de la bacteria.

5.3. Identificación bioquímica:

Para la identificación bacteriana se utilizaron pruebas bioquímicas que permiten detectar familia y nombre específico de la bacteria. Para ello se utilizaron los siguientes medios diferenciales: Agar-hierro-triple azúcar (TSI), Agar lisina hierro (LIA), Medio motilidad indol ornitina (M.I.O), Agar Citrato de Simmons y Agar Urea de Christensen. Estos fueron inoculados según protocolo establecido para cada uno de ellos, y luego incubados a 37 °C por 24 horas.

Al día siguiente se observaron y registraron los resultados para ser analizados y determinar nombre y familia de la bacteria contenida en el tubo de transporte.

5.4. Prueba de susceptibilidad a antibióticos:

Para este paso se realizó una prueba de difusión en disco por el método de Kirby-Bauer (37) (38), para la cual se utilizaron placas de Agar Müller-Hinton, sensidiscos de antibióticos y la colonia bacteriana aislada en la placa de Agar Soya Tripticasa.

Para esto, primero se realizó un caldo Müller-Hinton para resuspender la colonia bacteriana aislada desde la placa de Agar Soya Tripticasa, para ello se tomaron 2 mL de caldo Müller Hinton y con una torula estéril se tomó aproximadamente de una a dos colonias desde el cultivo mono-microbiano, logrando una turbidez equivalente a 0.5 de la escala de McFarland lo cual corresponde aproximadamente a 10^8 microorganismos viables por mL (38), la cual fue corroborada por espectrofotometría, luego se realizó una siembra en césped

en la placa de Agar Müller Hinton y se dispusieron los sensidiscos de antibióticos con pinza estéril sobre la placa a una distancia entre ellos de 2,5 cm.

Como cepa control del método se utilizó la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 (38).

5.4.1 Detección fenotípica de BLEE:

Método de sinergia de doble disco: Se utilizaron discos de cefotaxima (CTX 30 µg), Ceftazidima (CAZ 30 µg) y Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC 20/10 µg) dispuestos en una placa de agar Müller-Hinton de acuerdo con lo descrito en la literatura (39). Luego las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C en atmósfera aeróbica.

Los aislados que presentaron un ensanchamiento en la zona de inhibición comprendida entre los discos de CTX o CAZ y AMC se consideraron positivos para la presencia de BLEE.

5.5. Screening cualitativo para detección de bacteriocinas:

Para esto se desarrollaron 5 ensayos microbiológicos, con el objetivo de determinar cepas de *Escherichia coli* con actividad antimicrobiana frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

La cepa *E. coli* ATCC 25922 fue utilizada como cepa blanco en todos los ensayos posteriores.

5.5.1 Método de difusión en placa con pocillos y cultivo bacteriano sin centrifugar:

- a) En 2 mL de caldo soya se inoculó cantidad suficiente de la bacteria en estudio para obtener un estándar de 0,5 McFarland, luego se incubó durante 18-24 horas a 37 °C.
- b) En una placa de agar soya se procedió a realizar 15 pocillos de aproximadamente 5 mm de circunferencia, luego sobre la misma placa se procedió a sembrar en césped la cepa blanco.
- c) Luego se procedió a introducir 20 µl de caldo bacteriano, de cada una de las cepas en estudio, en uno de los pocillos de la placa previamente sembrada con la cepa blanco. Esto se lleva a incubar por 18-24 horas a 37 °C.
- d) Leer halo de inhibición de crecimiento si corresponde, observando presencia o ausencia de éste.

5.5.2 Método caldo directo sin centrifugar:

- a) En 2 mL de caldo soya se inoculo cantidad suficiente de la bacteria en estudio para obtener un estándar de 0,5 McFarland, luego se incubo durante 18-24 horas a 37 °C.
- b) En una placa de agar soya se sembró en césped la cepa blanco, y sobre esta se agregó 1 µl de caldo bacteriano, de las distintas cepas en estudio, a una distancia mínima de 1 cm entre cada una de las cepas y se incubó de 18-24 horas a 37 °C.
- c) Se observó la presencia de halo de inhibición de crecimiento si correspondía, observando presencia o ausencia de éste.

5.5.3 Método de difusión en placa con pocillos y cultivo bacteriano centrifugado:

- a) En 2 mL de caldo soya se inoculó cantidad suficiente de la bacteria en estudio para obtener un estándar de 0,5 McFarland, luego se incubó durante 18-24 hrs a 37 °C.
- b) Se centrifugó el cultivo bacteriano a 3500 rpm por 10 a 15 minutos, para obtener un sobrenadante limpio.
- c) En una placa de agar soya se procedió a realizar 15 pocillos de aproximadamente 5mm de circunferencia, luego sobre la misma placa se procedió a sembrar en césped la cepa blanco.
- d) Luego se procedió a introducir 20 µl de cultivo bacteriano, de cada una de las cepas en estudio, en uno de los pocillos de la placa previamente sembrada con la cepa blanco. Esto se lleva a incubar por 18-24 hrs a 37 °C.
- e) Se observó la presencia de halo de inhibición de crecimiento si correspondía, observando presencia o ausencia de este.

5.5.4 Método caldo directo centrifugado:

- a) En 2 mL de caldo soya se inoculó cantidad suficiente de la bacteria en estudio para obtener un estándar de 0,5 McFarland, luego se incubó durante 18-24 horas a 37 °C.
- b) Se centrifugó el cultivo bacteriano a 3500 rpm por 10 a 15 minutos, para obtener un sobrenadante limpio.

- c) En una placa de agar soya se sembró en césped la cepa blanco y sobre esta se agregó 1 µl de caldo bacteriano, de las distintas cepas en estudio, a una distancia mínima de 1 cm entre cada una de las cepas y se incubó de 18-24 horas a 37 °C.
- d) Se observó la presencia de halo de inhibición de crecimiento si correspondía, observando presencia o ausencia de éste.

5.5.5 Método inoculación bacteriana directa:

- a) En una placa de Agar Soya Tripticasa se inocularon las cepas bacterianas en estudio obtenidas directamente desde el cultivo bacteriano, el inóculo se dispuso en forma horizontal en la placa con un espacio entre cada una de las cepas, mínimo de 1 cm, en total se inocularon 15 cepas por placa. Luego, se incubó por 18-24 horas a 37°C hasta obtener desarrollo microbiano.
- b) Con un asa bacteriológica o pipeta Pasteur de vidrio, se retiró el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas y se añadió cloroformo a la tapa de la placa Petri. El cloroformo se dejó evaporar sobre el medio de cultivo, para esto la placa con el medio de cultivo se colocó sobre la tapa, para eliminar los restos bacterianos que pudieron haber quedado en el medio de cultivo.
- c) Luego sobre la misma placa antes inoculada con las cepas en estudio y luego tratada con cloroformo, se sembró en césped la cepa blanco y se dejó incubar en la estufa a 37 °C por 18-24 horas.
- d) Se observó la presencia de halos inhibitorios.

5.6. Determinación de efecto antimicrobiano de cepas de *Escherichia coli* productoras de bacteriocinas sobre cepas bacterianas resistentes:

5.6.1 Método inoculación bacteriana directa:

- a) En dos placas de Agar Soya Tripticasa se inocularon las cepas bacterianas productoras de bacteriocinas, previamente seleccionadas por el método de screening, obtenidas directamente desde el cultivo bacteriano, el inóculo se dispuso en forma horizontal en la placa con un espacio entre cada una de las cepas, mínimo de 1 cm, en total se inocularon 3 cepas por placa. Luego, se incubó por 18-24 horas a 37 °C para observar crecimiento.
- b) Con un asa bacteriológica o pipeta Pasteur de vidrio, se retiró el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas y se añadió cloroformo a la tapa de la placa Petri. El cloroformo se dejó evaporar sobre el medio de cultivo, para esto la placa con el medio de cultivo se colocó sobre la tapa, para eliminar los restos bacterianos que pudieron haber quedado en el medio de cultivo.
- c) Luego en una de las placas antes inoculada con las cepas en estudio y luego tratada con cloroformo, se sembró en césped la cepa blanco y en otra placa las cepas que presentaron mayor resistencia antimicrobiana previamente determinada mediante las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, luego se incubó en la estufa a 37 °C por 18-24 horas.
- d) Posteriormente se observó la presencia de halo de inhibición en cada una de las placas.

6. RESULTADOS

TABLA N°2: IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS HOSPITALARIAS.

CC	TSI	Gas	H ₂ S	LIA	Gas	H ₂ S	MIO	Citrato	Urea	Microorganismo
1	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
2	Cepas positivas para <i>E. coli</i> en Agar Cromo UTI									<i>E. coli</i>
3										<i>E. coli</i>
4	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
5	Cepas positivas para <i>E. coli</i> en Agar Cromo UTI									<i>E. coli</i>
6										<i>E. coli</i>
7										<i>E. coli</i>
H1	A/A	-	-	K/K	-	-	---	+	+	<i>Klebsiella spp</i>
H2	A/A	+++	-	K/N	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H3	A/A	-	-	K/A	-	-	---	-	-	<i>E. coli</i>
H4	K/K	-	-					+	+	<i>Pseudomonas spp</i>
H5	A/A	+++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H6	A/A	+++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H7	A/A	++	-	K/K	-	-	+++	+	-	<i>E. coli</i>
H8	A/A	+++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H9	A/A	+++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H10	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H11	A/A	-	-	K/A	-	-	---	-	-	<i>E. coli</i>
H12	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H13	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H14	A/A	-	-	K/A	-	-	---	-	-	<i>E. coli</i>
H15	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H16	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H17	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H18	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H19	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H20	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H21	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>

CC= código de cepa; H= Hospital de Constitución; CA= Cerro Alto; PA= Policlínico Adulto Hospital de Constitución; E= Empedrado.

TABLA N°2: CONTINUACIÓN IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS HOSPITALARIAS.

H22	A/A	-	+++	R/A	-	+	+++	+	+	<i>Proteus spp.</i>
H23	A/A	-	-	K/K	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
H24	A/A	+	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
H25	A/A	+	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
H26	A/A	+	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
H27	A/A	-	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
H28	K/A	-	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
H29	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
H30	A/A	++	-	K/K	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
H31	A/A	-	-	K/K	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
H32	A/A	+	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA1	A/A	+	-	K/K	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA2	A/A	++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA3	K/A	-	+++	R/A	-	+	+--	+	+	<i>Proteus mirabilis</i>
CA4	A/A	+++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA5	A/A	+++	-	K/A	-	-	+++	+	+	<i>E. coli</i>
CA6	A/A	+++	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA7	A/A	++	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
CA8	A/A	++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA9	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA10	A/A	-	-	K/A	-	-	-+-	+	-	<i>E. coli</i>
CA11	A/A	++	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA12	A/A	+	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA13	A/A	+++	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA14	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA15	A/A	++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA16	A/A	-	-	K/A	-	-	--+	-	-	<i>E. coli</i>
CA17	K/A	-	-	K/K	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA18	A/A	+	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA19	A/A	-	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
CA20	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA21	A/A	++	-	K/K	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA22	K/A	-	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA23	A/A	-	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA24	A/A	-	-	K/A	-	-	--+	-	-	<i>E. coli</i>

CC= código de cepa; H= Hospital de Constitución; CA= Cerro Alto; PA= Policlínico Adulto Hospital de Constitución; E= Empedrado.

TABLA N°2: CONTINUACIÓN IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS HOSPITALARIAS.

CA25	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA26	A/A	+++	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA27	A/A	-	-	K/K	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
CA28	A/A	+	-	K/K	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA29	A/A	+	-	K/K	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA30	K/A	-	-	K/K	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA31	A/A	+	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA32	A/A	-	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA33	A/A	-	-	K/K	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
CA34	A/A	+++	-	K/K	+	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA35	A/A	-	+++	K/A	-	++	+++	+	+	<i>Citrobacter spp.</i>
CA36	A/A	-	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA37	A/A	-	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA38	A/A	-	-	K/K	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
CA39	A/A	+++	-	K/K	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
CA40	K/A	-	-	K/K	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA41	A/A	+	-	K/K	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA42	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA43	A/A	++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA44	A/A	+	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
CA45	A/A	+	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
CA46	A/A	+	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
PA1	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
PA2	A/A	++	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
PA3	A/A	+++	-	K/A	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
PA4	A/A	++	-	K/A	-	-	++-	-	-	<i>E. coli</i>
PA5	A/A	++	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
E1	A/A	++	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
E2	A/A	++	-	K/K	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
36	A/A	++	-	K/K	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
37	A/A	++	-	K/K	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
38	A/A	++	-	K/K	+	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>
39	A/A	++	-	K/K	-	-	-+-	-	-	<i>E. coli</i>
40	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
41	A/A	-	-	K/A	-	-	-++	-	-	<i>E. coli</i>

CC= código de cepa; H= Hospital de Constitución; CA= Cerro Alto; PA= Policlínico Adulto Hospital de Constitución; E= Empedrado.

TABLA N°2: CONTINUACIÓN IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS HOSPITALARIAS.

42	A/A	++	-	K/A	-	-	- + -	-	-	<i>E. coli</i>
43	A/A	-	-	K/A	-	-	- + +	-	-	<i>E. coli</i>
44	A/A	+++	-	K/A	+	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
45	A/A	+	-	K/A	-	-	- + +	-	-	<i>E. coli</i>
46	A/A	+	-	K/A	-	-	++ -	-	-	<i>E. coli</i>
47	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
51	A/A	-	-	K/A	-	-	+++	-	-	<i>E. coli</i>
52	A/A	-	-	K/A	-	-	- + +	-	-	<i>E. coli</i>

CC= código de cepa; H= Hospital de Constitución; CA= Cerro Alto; PA= Policlínico Adulto Hospital de Constitución; E= Empedrado.

TABLA N°3: RESULTADOS CUALITATIVOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS.

Antibiótico	Sensible	Intermedio	Resistente
GE	95,05%	0%	4,95%
DXS	73,27%	10,89%	15,84%
AM	43,56%	8,91%	47,52%
SAM	91,09%	2,97%	5,94%
CTX	87,3%	12,69%	0%
TZ	91%	5%	4%
CAZ	95,18%	1,2%	3,61%
CXA	94%	0%	6%
MRP	100%	0%	0%
AMC	57,83%	30,12%	12,05%
AZ	92,75%	0%	7,25%
CIP	72,28%	0%	27,72%

Gentamicina (GE), doxiciclina (DXS), ampicilina (AM), ampicilina-sulbactam (SAM), cefotaxima (CTX), piperacilina-tazobactam (TZ), ceftazidima (CAZ), cefoxitina (CXA), meropenem (MRP), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), aztreonam (AZ), ciprofloxacino (CIP), rifampicina (R). Cepa control *E. coli* ATCC 25922.

TABLA N°4: RESULTADOS SCREENING CUALITATIVO PARA DETECCIÓN DE BACTERIOCINAS.

Ensayo	Cepas con actividad antimicrobiana
Método de difusión en placa con pocillos y cultivo bacteriano sin centrifugar.	CA7 – CA1 – CA45 – H2 – H32 – 1 – CA33 – CA16
Método caldo directo sin centrifugar.	1 – 7 – H2 – H10 – H24 – H29 – CA39
Método de difusión en placa con pocillos y cultivo bacteriano centrifugado.	CA33 – 32 – CA7 – H14 – H32 – CA42
Método caldo directo centrifugado.	16 – 28 – 43
Método inoculación bacteriana directa.	H32 – 1 – H2 – 45 – 14

CA= Cerro Alto; H = Hospital de Constitución.

TABLA N°5: RESULTADOS DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIMICROBIANO DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS SOBRE CEPAS BACTERIANAS RESISTENTES.

Cepas seleccionadas con actividad bactericida	Cepas testeadas sensibles	Cepas testeadas resistentes
H32	CA11 – H5 – CA9 – H27 – H28 – H29 – H30 – 44	-
H2	CA11 – H5 – CA9 - H27 – H28 – H29	H30 – 44
1	CA11 – H5 – H27 – H28 – H29	CA9 – H30 – 44

CA= Cerro Alto; H = Hospital de Constitución.

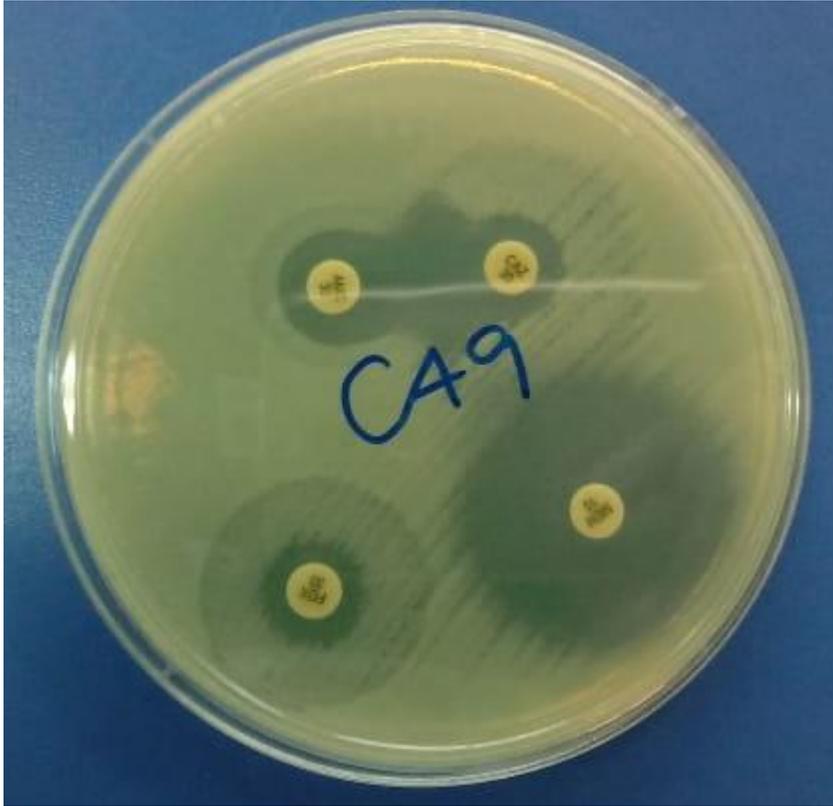


FIGURA N°1: IDENTIFICACIÓN CEPA PRODUCTORA DE BLEE.

7. DISCUSIÓN

En Chile las infecciones del tracto urinario (ITU), tanto comunitarias como hospitalarias, constituyen un gran problema de salud pública, por ser una afección de alta frecuencia en la clínica, donde el aumento en la resistencia antimicrobiana ha afectado el manejo y tratamiento de estos cuadros.

En más del 95% de los casos el agente causal de la ITU es un único microorganismo, siendo el agente etiológico más frecuente, en ambos sexos, *Escherichia coli*, siendo responsable de un 75% a 80% de los casos; el otro 20% a 25% corresponde a diversos microorganismos como son: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* (40). De las 106 cepas obtenidas para la realización de este estudio, 101 de ellas corresponde al género *Escherichia coli* lo que representa un 95% del total de las cepas, mientras que se obtuvieron solo dos cepas de *Proteus sp.*, una cepa de *Klebsiella sp.*, una cepa de *Pseudomonas sp.* Y una cepa de *Citrobacter sp.* Como se observa en la Tabla N°2, lo que se corresponde con la literatura actual donde se indica que los principales agentes de ITU pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (41).

Para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana se seleccionaron solo las cepas de la especie *Escherichia coli* debido a su importancia en la clínica y su capacidad de producir bacteriocinas.

La selección de los antimicrobianos utilizados para este estudio tiene como base su uso en la clínica y su acción sobre la familia *Enterobacteriaceae*. En general se observa que dentro de las cepas estudiadas se destaca un alto porcentaje de resistencia frente a ampicilina y un alto porcentaje de susceptibilidad intermedia frente a amoxicilina-ácido clavulánico.

Un análisis particular de cada uno de los antimicrobianos muestra patrones de susceptibilidad variado, específicamente frente a gentamicina se obtuvo un bajo porcentaje de cepas resistentes como se observa en la Tabla N°3 mientras que las cepas susceptibles representaron un 95% del total, otros estudios han demostrado un porcentaje de resistencia mayor siendo hasta de un 15% (42). La gentamicina es el principal antimicrobiano empleado en ITU que requieren antibioterapia parenteral generalmente de uso en pediatría, siendo el tratamiento empírico de elección en ITU en pacientes pediátricos. Por ende, es de impacto en la clínica un aumento en la resistencia a gentamicina en cepa de *E.coli* aislada de ITU en paciente pediátrico ya que se indica que para seleccionar un tratamiento empírico frente a un agente etiológico estos no deben presentar una resistencia al antimicrobiano superior al 10-20% (42).

Otro antibiótico ampliamente empleado en la clínica es el ciprofloxacino para el cual en este estudio se observó una resistencia de un 27%, en otros estudios se ha visto que existen valores similares de resistencia en *E. coli* aisladas desde ITU tanto complicada como no complicada (43).

Otro resultado destacable es el 100% de sensibilidad a meropenem obtenido desde las cepas en estudio, lo que indica ausencia de carbapenemasas, enzimas de alto impacto en la clínica ya que los carbapenémicos han sido la principal opción terapéutica frente a infecciones graves por microorganismos gramnegativos multirresistentes.

La resistencia a ampicilina en *E. coli* a nivel mundial presenta tasas elevadas, en este estudio se observó una resistencia de 47,52% lo que se condice con otros estudios donde también se observa un alto nivel de resistencia frente a este antimicrobiano (44) (45). Lo cual implicaría desestimar este antibiótico como tratamiento empírico.

En general, la susceptibilidad a cefalosporinas es buena, en este estudio se utilizó CTX y CAZ ambas cefalosporinas de 3° generación para las cuales se observó un porcentaje de susceptibilidad de 87% y 95% respectivamente. Lo que se correlaciona con otros estudios y estadísticas en Chile (45).

Otro hallazgo que destacar fue la detección de una cepa de *E. coli* productora de BLEE como se observa en la Figura N°1. Este hallazgo representa menos del 1% de las cepas estudiadas y por ende no representa un valor significativo.

El objetivo principal de este estudio fue determinar cepas productoras de bacteriocinas con actividad sobre cepas resistentes de la misma especie. Como ya se mencionó anteriormente, en la revisión bibliográfica, las bacteriocinas específicamente las colicinas presentes en *E. coli*, poseen un espectro de acción estrecho generalmente delimitado a microorganismos de la misma especie, por lo que se realizó la evaluación de actividad antimicrobiana frente a cepas de la misma especie, pero que presentaron un grado de resistencia ampliado con al menos la presencia de resistencia a 4 antibióticos de importancia en la clínica.

Para la búsqueda de cepas productoras de bacteriocinas se utilizó como cepa susceptible la *E. coli* ATCC 25922, por ser esta una cepa susceptible a los antimicrobianos en estudio. Luego de obtener un screening cualitativo de aquellas cepas que presentaron algún grado de

inhibición en el crecimiento de la *E. coli* ATCC 25922 como se observa en la Tabla N°4, se seleccionaron aquellas cepas con mayor actividad antimicrobiana en base a la ausencia o presencia de halo de inhibición como se indicó en la metodología descrita, seleccionando aquellas cepas que presentaron un mayor halo de inhibición del crecimiento bacteriano y que se observaron actividad en más de 1 método de screening (Tabla N°4). Teniendo como resultado que las cepas H32, H2 y 1, fueron aquellas en las que se observó mayor actividad. Posteriormente se probó la capacidad de inhibición de crecimiento bacteriano de parte de estas cepas con posible presencia de bacteriocinas sobre cepas resistentes como se observa en la Tabla N°5.

Al analizar los resultados obtenidos por el método de inoculación directa (Tabla N°5) se puede destacar que de las 3 cepas seleccionadas H32 es la que presentó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano, aunque de todas maneras las cepas H2 y 1 también demostraron un patrón de inhibición importante sobre algunas cepas resistentes.

Debido al método utilizado para la evaluación de la actividad de las cepas, descrito previamente, es que se puede inferir que el efecto antimicrobiano de las cepas productoras sobre las cepas resistentes, podría corresponder a producción de bacteriocinas ya que se ha descrito en la literatura como método aceptable el uso de la inoculación directa (26).

La presencia de colicinas en cepas *E. coli* aisladas de ITU es frecuente, se ha observado un 72,9% de cepas productoras en aislados de pacientes embarazadas con ITU sintomática, mientras que en pacientes asintomáticas el porcentaje es menor con solo un 29,26% (26). Esto podría indicar que las cepas productoras de colicinas son aquellas con mayor efecto patológico, en este caso cepas *E. coli* uropatógenas, ya que estas serían las que presentan mayores factores de virulencia y por ende mayor manifestación clínica de la infección.

En un estudio reciente del año 2018 Sharp et al. (46) indicaron que existe resistencia no específica (insensibilidad) de cepas de *E. coli* hacia las colicinas lo cual está asociado a la estructura del lipolisacarido de la membrana externa bacteriana y es independiente de la inmunidad específica a colicinas, lo cual explicaría porque entre los resultados obtenidos se detectaron cepas con actividad antimicrobiana sobre la *E. coli* ATCC 25922 (Tabla N°4) pero no así sobre las cepas resistentes (Tabla N°5).

8. CONCLUSIONES

Las bacteriocinas poseen una serie de propiedades que las hacen futuros antimicrobianos con efectos prometedores. Son extremadamente potentes, son activas en muy bajas concentraciones y son altamente específicas de especie, lo que reduce significativamente posibles efectos fuera del objetivo en su utilización.

Los hallazgos obtenidos en este estudio representan un gran impacto en la clínica, ya que se sabe que el número de cepas resistentes a los antimicrobianos clásicos de elección ha ido en constante aumento en el último tiempo y no existen nuevos trabajos o investigaciones que apunten a la creación de nuevos antibióticos en la industria farmacéutica y por lo tanto es de vital importancia buscar opciones disponibles para establecer nuevas directrices en la búsqueda de alternativas a los antimicrobianos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Es importante destacar la relevancia en la búsqueda de bacteriocinas presentes en los aislados de *E. coli* uropatogena, ya que se ha evidenciado que la presencia de bacteriocinas tendría implicancia en la manifestación de la infección, siendo estas cepas más patógenas.

También es importante destacar que, aunque las colicinas son potentes antimicrobianos de espectro estrecho, con un gran potencial como futuros antibióticos, existe evidencia de altos niveles de insensibilidad a colicinas que ocurre de manera natural, lo que podría limitar su eficacia.

De los resultados obtenidos se puede inferir que las cepas *E. coli* uropatógenas en su gran mayoría presentan bacteriocinas, específicamente colicinas, capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de cepas de su misma especie y que son capaces de producir enfermedad en humanos. Por lo tanto, es importante continuar los estudios de identificación de estas bacteriocinas en las cepas productoras, y realizar estudios posteriores que evidencien sus posibles usos frente a otros microorganismo patógenos.

Finalmente, y como síntesis global del trabajo realizado, es importante señalar que el estudio del efecto antimicrobiano de las bacteriocinas debe tomar un enfoque médico, para así poder desarrollar nuevas técnicas de tratamiento con alternativas diferentes a los antibióticos convencionales para aquellos microorganismos con resistencia múltiple y así reducir el futuro impacto en la mortalidad global por efecto del aumento en el desarrollo de enfermedades por microorganismos multi resistentes a los tratamientos convencionales.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Negroni M. Microbiología Estomatológica, fundamentos y guía práctica. 2 ed. Buenos Aires, Argentina 2009.
2. Pérez C. Resistencia bacteriana 2007 [Available from: https://www.susmedicos.com/art_Resistance_Bacteriana.htm].
3. Forbes B, Daniel S, Weissfeld A, Trevino E. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12 ed 2009.
4. Picazo J, Prieto J. Compendio de Microbiología. 2 ed 2016.
5. Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 1 ed 2006.
6. MacFadin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3 ed. Estados Unidos 2000.
7. Mecanismos de evolución y resistencias bacterianas. Gastroenterología y Hepatología Continuada. 2009;8(5):279-82.
8. Mosquito S, Ruiz J, Bauer JL, Ochoa T. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2011.
9. Tafur JD, Torres JA, Villegas MV. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gram negativas 2008; 12.
10. Moreno M C, González E R, Beltrán C. Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. . Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. 2011:182-92.
11. Martínez-Martínez L, Calvo J. Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2010;28:4-9.
12. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009;27(1):44-52.
13. Fica A. Resistencia antibiótica en bacilos Gram negativos, cocáceas Gram positivas y anaerobios. Implicancias terapéuticas. Revista Médica Clínica Las Condes 2014. 432-44 p.
14. Sauca G, Gallés C, Gasós MA. Evolución de la sensibilidad de *Escherichia coli* a 6 antimicrobianos durante los últimos 12 años. Atención Primaria. 1997;19(5):226-9.
15. Rodríguez G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud publica de México [Internet]. 2002; 44. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011#back1.

16. García Zúñiga C. Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*, en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala; 2014.
17. Jawets E. Microbiología médica. 25 ed 2005.
18. Monroy Dosta M, Castro Barrera T, Fernández Perrino FJ, Mayorga Reyes L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. 2009.
19. Cotter PD, Hill C Fau - Ross RP, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. (1740-1526 (Print)) 2005.
20. Ferrer Silva A. Purificación, caracterización bioquímica y evaluación de la citotoxicidad del péptido antimicrobiano gicina A: Universidad de Chile; 2011.
21. Mondragón Preciado G, Escalante Minakata P, Osuna Castro J, Ibarra Junquera V, Morlett Chávez J, Aguilar González C, et al. Bacteriocinas: Características y aplicación en alimentos. Red de Revistas científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal. 2013. p. 64 - 70.
22. Aasen IM, Moretro T Fau - Katla T, Katla T Fau - Axelsson L, Axelsson L Fau - Storro I, Storro I. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. (0175-7598 (Print)) 2000.
23. Gillor O, Kirkup Bc Fau - Riley MA, Riley MA. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. (0065-2164 (Print)) 2004.
24. Oscariz JC, Pisabarro AG. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. (1139-6709 (Print)) 2001.
25. Vásquez M S, Suárez M H, Zapata B S. Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista chilena de nutrición 2009. p. 64 - 71.
26. Arriagada-Alba M, Rivera Sánchez R, Romero Días G, Hernando Aguilar N, García Jiménez E, Flores paz R. Frecuencia de colicina y hemolisinas en *Escherichia coli* aislada de pacientes embarazadas infección de vías urinarias, sintomática y asintomática. 2000.
27. Kekessy Da Fau - Pigué JD, Pigué JD. New method for detecting bacteriocin production. (0003-6919 (Print)).
28. Davies JK, Reeves P. Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group B. J Bacteriol. 1975;123(1):96-101.
29. Davies DI Fau - Falkiner FR, Falkiner Fr Fau - Hardy KG, Hardy KG. Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. (0019-9567 (Print)).
30. Clancy J Fau - Savage DC, Savage DC. Another Colicin V phenotype: in vitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium. (0019-9567 (Print)).
31. Mills A, Duong F. Lipopolysaccharides promote binding and unfolding of the antibacterial colicin E3 rRNase domain. (0005-2736 (Print)) 1981.
32. Tello Reyes MC. La especificidad, exportación y procesamiento de la microcina E492 y colicina V dependen del dominio ABC de sus transportadores.: Universidad de Chile; 2006.
33. Jakes KS. The Colicin E1 TolC Box: Identification of a Domain Required for Colicin E1 Cytotoxicity and TolC Binding. LID - e00412-16. (1098-5530 (Electronic)) 2017.

34. Zakharov SD, Sharma O Fau - Zhalnina M, Zhalnina M Fau - Yamashita E, Yamashita E Fau - Cramer WA, Cramer WA. Pathways of colicin import: utilization of BtuB, OmpF porin and the TolC drug-export protein. (1470-8752 (Electronic)) 2012.
35. Sharp CA-O, Boinett C, Cain A, Housden N, Kumar S, Turner K, et al. O-antigen dependent colicin insensitivity of uropathogenic *Escherichia coli*. LID - e00545-18 LID - 10.1128/JB.00545-18 [doi] LID - JB.00545-18 [pii]. (1098-5530 (Electronic)) 2019.
36. Housden NA-O, Rassam P, Lee S, Samsudin F, Kaminska R, Sharp C, et al. Directional Porin Binding of Intrinsically Disordered Protein Sequences Promotes Colicin Epitope Display in the Bacterial Periplasm. (1520-4995 (Electronic)) 2018.
37. Maye Bernal R, Guzman M. El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Revista Biomedica* 1984.
38. Araya Díaz I, Prat Miranda S, Ramírez Muñoz V. recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: estudio de susceptibilidad antimicrobiana mediante difusión por disco. 2015.
39. Jarlier V, Nicolas Mh Fau - Fournier G, Fournier G Fau - Philippon A, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. (0162-0886 (Print)) 1988.
40. Durán L. Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2018;29(2):213-21.
41. Herrera C, Navarro D, Täger M. Etiología y perfil de resistencia antimicrobiana en infección del tracto urinario en niños, Valdivia 2012. *Revista chilena de infectología*. 2014;31:757-8.
42. Salas-Mera D, Sainz T, Gómez-Gil Mira MR, Méndez-Echevarría A. Resistencia a gentamicina en infecciones urinarias por *E. coli* en niños. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2017;35(7):465-6.
43. Arslan H, Azap Ok Fau - Ergonul O, Ergonul O Fau - Timurkaynak F, Timurkaynak F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. (0305-7453 (Print)) 2005.
44. Betrán A, Cortés AM, Lopez C. Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca). *Revista Española de Quimioterapia*. 2015;28:263-6.
45. Cifuentes-D M, Silva F, García P, Bello H, Briceno I, Calvo-A M, et al. Susceptibilidad antimicrobiana en Chile 2012. *Revista chilena de infectología*. 2014;31:123-30.
46. Sharp CA-O, Boinett C, Cain A, Housden N, Kumar S, Turner K, et al. O-antigen dependent colicin insensitivity of uropathogenic *Escherichia coli*. LID - JB.00545-18 [pii] LID - 10.1128/JB.00545-18 [doi]. (1098-5530 (Electronic)) 2018.