



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**Efecto bactericida de la luz azul en bacterias Gram negativas con resistencia extensiva a los antibióticos (XDR) de origen intrahospitalario**

Trabajo Especial de Grado para optar por el Título de Licenciado en Biología

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Bachiller: Gamal El Hindawi Delgado.

Tutora: María del Carmen Araque de Della Prugna.

Diciembre, 2022.

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi tutora la Doctora María del Carmen Araque de Della Prugna por su trabajo consistente y gran paciencia durante este arduo proceso, a la profesora Yinec Varela por su gran humanidad, humildad y disposición para con colegas y futuros colegas, su humanidad, su paciencia y su guía fueron fundamentales en cada paso de este proyecto; por último, pero no menos importante al Profesor Franco de Della Prugna, por su increíble amabilidad, buen trato, gran sentido de humor y orientación en muchos de los pasos a seguir durante el proceso. Gracias a todos, por darme la oportunidad de ahondar en este tema de investigación, guiándome en cada paso de este arduo camino, además de permitirme exponer mis ideas e inquietudes libremente.

A los profesores de la Universidad de Los Andes, quienes con esmero se dedican día a día a formar nuevos profesionales. Especialmente, a los profesores: Wilfredo Quiñones, Mariana Muñoz-Romo, Gustavo Fermín, Ana Caceres Nicollielly, Hector del Castillo y Balmore Guerrero, gracias a su insistencia en el ámbito académico se renueva constantemente la motivación para continuar en el área y sentirse parte de ella.

Un agradecimiento especial a la familia de amigos que se va armando tras los procesos en los que en conjunto la vida nos reúne: Kleidy Betania Quintero Molina, Mary Selva Cuiñas, José Armando S. López, Jesús Briceño, Roger Dávila, Yuliana Guédez Forgiarini, Erlyn Del Valle Senra Naar, Giovanna Rojas La Mantia, Vanessa Varillas, Gina Ascanio, Ioannis Malaver, Jhoan Sifuentes, José Vicente González, José Manuel Hoyos, Pedro Julio Cedeño Aristimuño, Carlos E. Lyon V. y a la comunidad de COES que me ha ayudado en pormenores del momento y su unión ha sido fortaleza en muchos momentos.

Un agradecimiento a mis familiares, principalmente a mi hermano mayor, Said El Hidanwi, a mis dos hermanos pequeños Anuar y Mustafa El Hindawi, que en paz descansen María del Pilar Delgado y a mi Padre El Hindawi Mohammad Fawaz.

Por último, quisiera agradecer a mis héroes de la literatura, David Hume, Albert Camus, Søren Kierkegaard, Mary Shelley, Simone de Beauvoir, Patti Smith, Kimberlé, Crenshaw, Emil Cioran, Neil Gaiman y Carl Gustav Jung, que me inspiraron a cuestionar mi entorno y a hacerme preguntas cada vez más densas sobre la naturaleza de mi realidad, motivándome a querer indagar sobre la misma desde un aspecto empírico y científico.

# ÍNDICE GENERAL

## Contenido

AGRADECIMIENTOS .....	3
ÍNDICE GENERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS.....	5
ÍNDICE DE TABLAS .....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT .....	7
Palabras claves .....	7
1. INTRODUCCIÓN .....	7
2. Marco teórico .....	10
2.1 Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas .....	10
2.2 Importancia clínica y epidemiológica de las bacterias Gram negativas con amplios niveles de resistencia .....	13
2.2 Antibióticos aprobados por la FDA para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes (MDR).....	16
2.3 Alternativas terapéuticas novedosas para el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o con resistencia extensiva a los antibióticos (XDR) .....	17
2.4 Uso de la luz azul como posible alternativa desinfectante y terapia alternativa para infecciones no sistémicas causadas por microorganismos con resistencia extensiva a antibióticos .....	18
3. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	21
4. OBJETIVOS GENERALES .....	21
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
6.1 Cepas bacterianas a estudiar.....	21
6.2 Unidad de Irradiación y especificaciones técnicas .....	22
6.3. Modelo biológico.....	24
6.3.1 Etapa de estandarización del protocolo de irradiación .....	24
6.3.1.2. Inóculo bacteriano.....	24
6.3.1.4 Irradiación .....	25
6.3.1.5 Lectura de la prueba.....	25
6.3.1.6 Determinación del umbral de inhibición.....	26
6.4 Etapa de evaluación de los umbrales de inhibición sobre cepas XDR de origen intrahospitalarios.....	26

6.4.1.1 Cepas Bacterianas .....	26
6.4.1.2 Condiciones para los ensayos de irradiación .....	26
6.5 Análisis estadístico .....	26
7. RESULTADOS .....	27
7.1 Estandarización del protocolo de irradiación. ....	27
7.2 Evaluación de los umbrales de inhibición en las cepas XDR de origen intrahospitalarios.....	28
8. DISCUSIÓN.....	34
9. CONCLUSIONES .....	35
10. RECOMENDACIONES .....	36
11. OTRAS PERSPECTIVAS A SEGUIR.....	36
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana comparada con otras enfermedades para el 2050. Fuente: OMS Plan de Acción Global contra la resistencia Antimicrobiana. 2017. ....	8
Fig. 2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana y ejemplo de antibióticos. ....	11
Fuente: Jansen Cilag, modificado por el autor .....	11
Fig. 4. Representación esquemática de las bombas de eflujo en bacterias Gram negativas. ....	12
Fuente: Munita y Arias, 2016.....	12
Fig. 5. Mecanismos de adquisición de resistencia asociada a mutaciones en las porinas y/o en su expresión (antibiótico en azul). Fuente: Fernandez y col. 2012, modificado .....	12
Fig. 6. Modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina PBP (del inglés Penicillin binding Protein). Fuente: Gestal, Monica y Villacís, José, 2014 .....	13
Fig. 7. Alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacteria MDR, XDR y PDR. (Fuente: Taconelli y cols., 2017; modificado).....	18
Fig. 8: Mecanismo de acción de terapia fotodinámica (Fuente: Robres y col. 2015). ....	19
Fig. 9: Fuente de luz azul basada en un LED con una potencia de 50W que emite en la longitud de onda de $405\pm 10\text{nm}$ (Fuente: este estudio) .....	22
Fig. 10: Componentes de la unidad de irradiación, con un valor máximo de $0,19 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ en el centro de la placa de Petri (Fuente: este estudio) .....	23
Fig. 11: Iluminación vs Tiempo de exposición (Fuente: este estudio).....	23
Fig. 12: Gradiente de irradiación (Fuente: este estudio) .....	24
Fig. 13: Inhibición de cepas bacterianas Gram negativas por efecto de la luz azul a $405\text{nm}$ . La escala a la izquierda indica la distancia en milímetros desde el centro de la placa de Petri. La escala a la derecha indica la irradiación relativa correspondiente. (Fuente: este estudio). ....	25

Fig. 14: Umbral de inhibición de la luz azul (405nm) establecidos por especie XDR estudiada y separados por orden. (Fuente: este estudio). .....	29
Fig. 15. A: Análisis de diferencias entre los halos de inhibición (mm) presentados por los grupos Enterobacteriales y Pseudomonadales; barras representadas por el error estándar. Significancia según prueba U de Mann-Whitney con un valor de $p < 0,01$ . B: dispersión que explica la correlación entre la variable independiente (Energía de irradiación J·cm <sup>-2</sup> ) y la variable dependiente (Halo de inhibición mm). (Fuente: este estudio). .....	31

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de multiresistencia, resistencia extendida y panresistencia en bacterias Gram negativas. ....	14
Tabla 2. Características farmacológicas, espectro de acción e indicaciones de los principales antibióticos utilizados en bacterias MDR, XDR y PDR. ....	16
Tabla 3. Algunas sustancias fotosensibilizantes para uso exógeno .....	20
Tabla 4. Parámetros evaluados para la estandarización del protocolo de la fotoinactivación con luz azul (405nm) en cepas de referencia internacional y XDR seleccionadas .....	27
Tabla 5. Determinación del umbral de inhibición de la luz azul (405nm) en cepas de referencia internacional y XDR seleccionadas.....	28
Tabla 6. Determinación del umbral de inhibición de la luz azul (405nm) en cepas XDR* .....	30
Tabla 7. Distribución de las cepas XDR de acuerdo a los rangos de umbral de inhibición.....	31
Tabla 8. Relación del tamaño del halo de inhibición y umbral de inhibición de la luz azul (405nm) determinados para cada especie bacteriana estudiada.....	31
Tabla 9. Resultados del cálculo del porcentaje de supervivencia a partir del halo de inhibición para cada una de las cepas estudiadas .....	32
Tabla 10. Patrones de resistencia de las cepas XDR y el umbral de inhibición J·cm <sup>-2</sup> .....	33

**RESUMEN:** La resistencia antimicrobiana es un fenómeno en constante evolución y de vital importancia para los sistemas de salud pública a nivel mundial. La presencia de  $\beta$ -lactamasas de espectro extensivo (BLEE) y las carbapenemasas en bacterias Gram negativas con resistencia extensiva a antibióticos (XDR), dificultan las rutas terapéuticas para tratar infecciones intrahospitalarias, esto insta a la necesidad de explorar nuevas rutas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este trabajo, se realizó un ensayo de terapia fotodinámica con luz azul a 405nm, para esto, se utilizó una fuente de luz basada en un LED con una potencia de 50W y una lente condensadora con la finalidad de crear un gradiente de irradiación coincidente con un máximo en el centro de la placa de Petri ( $0,19 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Se evaluaron los umbrales de inhibición de 40 cepas bacterianas; 27 Enterobacterales y 13 Pseudomonadales. El 82,50% de las cepas fueron fotoinactivadas. Una distribución de los rangos del umbral de inhibición permitió agrupar la mayoría de las Enterobacterales en rangos inhibitorios entre 86 y  $126 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , mientras que los bacilos Gram negativos no fermentadores (Pseudomonadales) estuvieron por debajo  $86 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . El 17,50% de las cepas no fueron inhibidas demostrando tolerancia a umbrales de irradiación  $\geq 171 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Los hallazgos obtenidos demostraron que la luz azul tiene un efecto inhibitorio contra bacterias Gram negativas XDR de origen intrahospitalario, pudiéndose considerar como alternativa terapéutica futura en la lucha contra el fenómeno de la resistencia antimicrobiana.

**ABSTRACT:** The antimicrobial resistance is a natural phenomenon in exponential growth over the years and with great importance for the public health system around the globe. The presence of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases in Gram-negative bacteria with Extensively drug-resistant (XDR), make difficult the treatment of intrahospitalary infection, making the urges of finding and research new therapeutic approaches more appropriate for the treatment of infectious diseases. In this work a photodynamic therapy test was carried out with blue light at 405nm, using a light source based on an LED with 50W of power and a condenser lens in order to create an irradiation gradient coinciding with a maximum in the center of the Petri dish ( $0,19 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). The inhibition thresholds of 40 bacterial strains were evaluated; 27 Enterobacterales y 13 Pseudomonadales. The 82,50% of the strains have been photoinactivated. A distribution in the inhibition threshold allow us to group up the majority of Enterobacterales in range of inhibition among 86 and  $126 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , while non-fermenting Gram-negative bacilli (Pseudomonadales) were below of  $86 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ; 17.50% of the strains were not inhibited, demonstrating tolerance to irradiation thresholds  $\geq 171 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . The findings obtained in this assay demonstrated that the blue light has an inhibitor effect over the Gram-negative XDR bacteria of intrahospitalary origin, being able to be considered as a future therapeutic alternative in the fight against the phenomenon of antimicrobial resistance.

**Palabras claves:** Luz azul, resistencia extensiva a los antimicrobianos, bacterias Gram negativas, infecciones intrahospitalarias.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos, tras su descubrimiento en 1928, han ocupado una posición imprescindible para proteger la salud de los seres vivos, sin embargo, su uso abusivo e indebido ha creado una situación de riesgo mundial (Araque, 2018). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia antimicrobiana (RAM) se define como: el fenómeno por medio del cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. En otras palabras, es la capacidad que tienen las bacterias de sobrevivir a los efectos de los antibióticos o biocidas destinados a eliminarlas o controlarlas. Este fenómeno ha sido considerado una amenaza global para la red de salud pública, de

manera que la prevalencia de infecciosas que no pueden ser tratadas efectivamente con antibióticos, marca un futuro incierto con respecto a las rutas terapéuticas que deben aplicarse (Llor y Bjerrum 2014).

Es conocido que las infecciones causadas por microorganismos resistentes conllevan a un incremento del tiempo de hospitalización, un coste cada vez más alto en inversión sobre infraestructura hospitalaria y en investigación para la producción de drogas y tratamientos efectivos (Llor y Bjerrum 2014). La medicina moderna depende en gran medida de la efectividad de los antibióticos, es por ello que los pacientes sometidos a quimioterapias para tratamientos del cáncer, terapias contra el SIDA o personas VIH<sup>+</sup>, los trasplantes de órganos, cirugías en general y cuidados neonatales, no pueden ser realizados sin el uso de antibióticos. Por otra parte, la creciente presencia de infecciones de origen intrahospitalario ha hecho de la RAM un problema para el desarrollo de tareas intrahospitalarias (Llor y Bjerrum 2014).

En Europa se ha asociado la carga económica debido al incremento de aparición de RAM con alrededor de 900 millones de euros correspondientes solamente a costos hospitalarios, a su vez un decaimiento en la productividad laboral debido a un 40% de morbilidad asociado a este tipo de infecciones. No obstante, estos datos pueden subestimar la estimación real y actual de dichos costos, debido a que este es un fenómeno en constante evolución (Prestinaci, y col. 2015).

La RAM, reconocida por la OMS como uno de los diez problemas de salud pública más graves a los cuales se enfrenta la humanidad, actualmente causa aproximadamente 700 mil muertes anuales en todo el mundo, pero para el 2050, se prevé que las infecciones producidas por bacterias multirresistentes podrían ocasionar 10 millones de fallecimientos por año, desplazando al cáncer como primera causa de muerte (OMS, 2017). Sin embargo, preocupa que en un informe recientemente publicado en “*The Lancet*” señalara que, en el 2019, 1.27 millones de personas murieron por infecciones atribuidas a bacterias resistentes (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

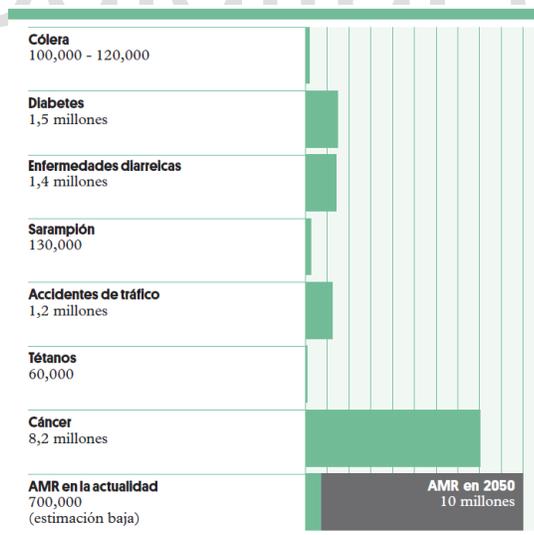


Fig. 1 Muertes atribuibles a la resistencia antimicrobiana comparada con otras enfermedades para el 2050. Fuente: OMS Plan de Acción Global contra la resistencia Antimicrobiana. 2017.

Sin duda, la prescripción abusiva de antibióticos sumado a la fácil accesibilidad de estos se ha convertido en una de las causas principales asociadas a la aparición de las RAM (Prestinaci, y col. 2015); el reporte anual de la Red de Vigilancia Europea para el Consumo de drogas Antimicrobianas (ESAC-Net por sus

siglas en inglés *European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network*) en el año 2012, estimó que el consumo sistemático de antibióticos en 26 países de Europa, fue de aproximadamente 2.0 dosis diarias definidas por cada 1000 habitantes. La creciente prevalencia de la vigilancia asociada a las infecciones de salud pública, permitió a la ESAC-Net estimar también, que un 35% de los pacientes hospitalizados en el año 2011 se encontraban bajo tratamientos con antibióticos (Prestinaci, y col. 2015).

Una de las causas de mayor impacto a la creciente problemática del uso inadecuado de antibióticos, está relacionada con la industria de alimentos de origen animal para consumo humano (Prestinaci, y col. 2015); el crecimiento animal y la prevención de enfermedades ha inducido a la industria ganadera a abusar de forma significativa del consumo de antibióticos. El cuarto reporte realizado por la organización de vigilancia europea sobre el consumo de antimicrobianos de uso veterinario (ESVAC por sus siglas en inglés *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*) que incluyó datos de 26 países dentro de la unión europea, mostró que la venta de antibióticos para la producción de animales de consumo humano durante el año 2012, alcanzaban las 8000 toneladas, siendo tetraciclinas, penicilinas y sulfonamidas los grupos de antibióticos más vendidos.

La creciente resistencia bacteriana a los antibióticos se ha convertido en una de las principales preocupaciones en el ámbito de la salud a nivel mundial (Leanse, y col. 2018); nuevas epidemias causadas por patógenos con fenotipos emergentes resistentes siguen apareciendo en todo el mundo (Leanse, y col. 2018). El uso indebido de antibióticos tanto en el ámbito médico (prescriptivo) como en la industria alimentaria y la medicina veterinaria, ha ejercido una presión selectiva sobre la población bacteriana, forzándola a evolucionar al desarrollo de nuevos mecanismos de resistencia que garanticen su supervivencia y propagación (Leanse, y col. 2018). Por lo tanto, es necesario intensificar las investigaciones en la búsqueda de alternativas novedosas anti-infecciosas, así como el uso de agentes con actividad y mecanismos de acción antimicrobiana diferentes a los ya conocidos (Leanse, y col. 2018).

En febrero de 2017, la OMS divulgó un listado de las 12 bacterias que deben ser consideradas prioritarias para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos, debido a las escasas opciones de tratamiento disponibles y su impacto en la salud pública. La lista de la OMS se divide en tres categorías considerando la urgencia con la cual se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, elevada o media.

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos o unidades de larga estancia y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Son bacterias con demostrada resistencia a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemos, y que pueden provocar infecciones graves a menudo con desenlaces fatales como septicemias y neumonías.

#### ***Prioridad N° 1: Crítica***

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenemos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a carbapenemos
- *Enterobacteriaceae*, resistentes a carbapenemos y productoras de BLEEs

El segundo y tercer nivel de la lista –*las categorías de prioridad elevada y media*– contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente:

#### ***Prioridad N° 2: Elevada:***

- *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina
- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina

- *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina
- *Campylobacter* spp. resistente a fluoroquinolonas
- *Especies de Salmonella* resistentes a fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas y fluoroquinolonas

### **Prioridad N° 3: Media**

- *Streptococcus pneumoniae* sin sensibilidad a penicilina
- *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina
- *Shigella* spp. resistente a fluoroquinolonas

La RAM es un extraordinario modelo de evolución biológica que atenta la salud mundial. Sin embargo, es probable convertir esta amenaza creciente en un problema manejable con la participación conjunta de los actores nacionales e internacionales en todos los niveles y con la implementación de acciones contundentes dirigidas a impulsar la investigación en nuevas alternativas terapéuticas contra microorganismos resistentes, disminuir la prescripción inadecuada de antimicrobianos, incrementar la inmunización y fortalecer la vigilancia patógenos resistentes en la medicina humana, veterinaria y en el ambiente (Araque, 2018).

En este contexto, el uso de luz azul (405 nm) como tratamiento contra microorganismos infecciosos, ha sido estudiado ampliamente en diferentes grupos de bacterias, así mismo se ha propuesto su uso como desinfectante en ambientes hospitalarios (Tomb y cols, 2018). El efecto inhibitor del crecimiento bacteriano por la exposición a luz azul, está relacionado con la foto excitación de una molécula fotosensibilizadora captadas previamente por la célula y la subsecuente generación de moléculas reactivas al oxígeno, las cuales tienen un efecto tóxico en la célula bacteriana (Maclean, y col. 2014). La luz azul a 405 nm específicamente ya ha sido usada en tratamientos para infecciones a nivel de la piel causadas por cepas multirresistentes como es el caso de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, y probada en modelos animales, específicamente en ratón, logrando resultados inhibitorios satisfactorios sin daño sobre las células del hospedador (Dai, y col. 2013). Es por ello, que el estudio del efecto bactericida de la luz azul en bacterias Gram negativas con resistencia extensiva a los antibióticos (XDR) de origen intrahospitalario podría proporcionar una alternativa terapéutica, principalmente en infecciones de piel y tejidos blandos producidos por estos microorganismos.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 Mecanismos de resistencia en bacterias Gram negativas**

La resistencia bacteriana continúa en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en los hospitales (Araque, 2018). Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a falla terapéutica, es importante conocer los mecanismos de resistencia más frecuentes en estas bacterias (Breijyeh, y col. 2020). Estos mecanismos de resistencia podrían resumirse en cuatro categorías (Fig. 2):

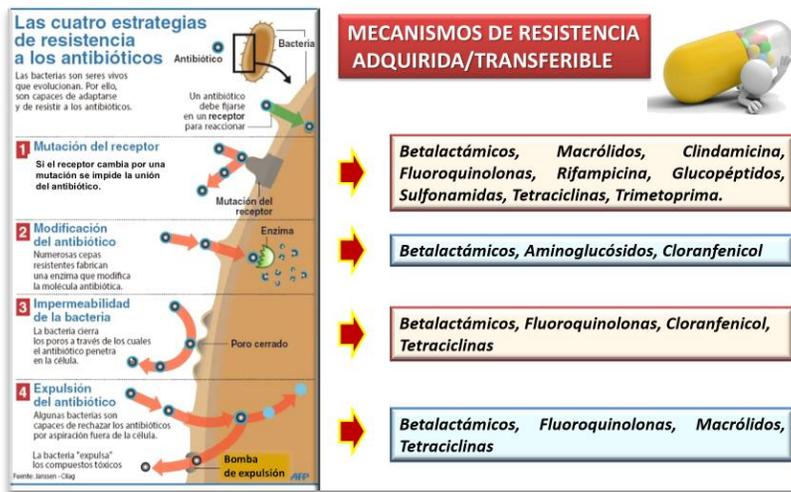


Fig. 2. Mecanismos de resistencia antimicrobiana y ejemplo de antibióticos.

Fuente: Jansen Cilag, modificado por el autor

**1. Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las  $\beta$ -lactamasas son las más prevalentes (Fig. 3). Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Munita y col., 2016).

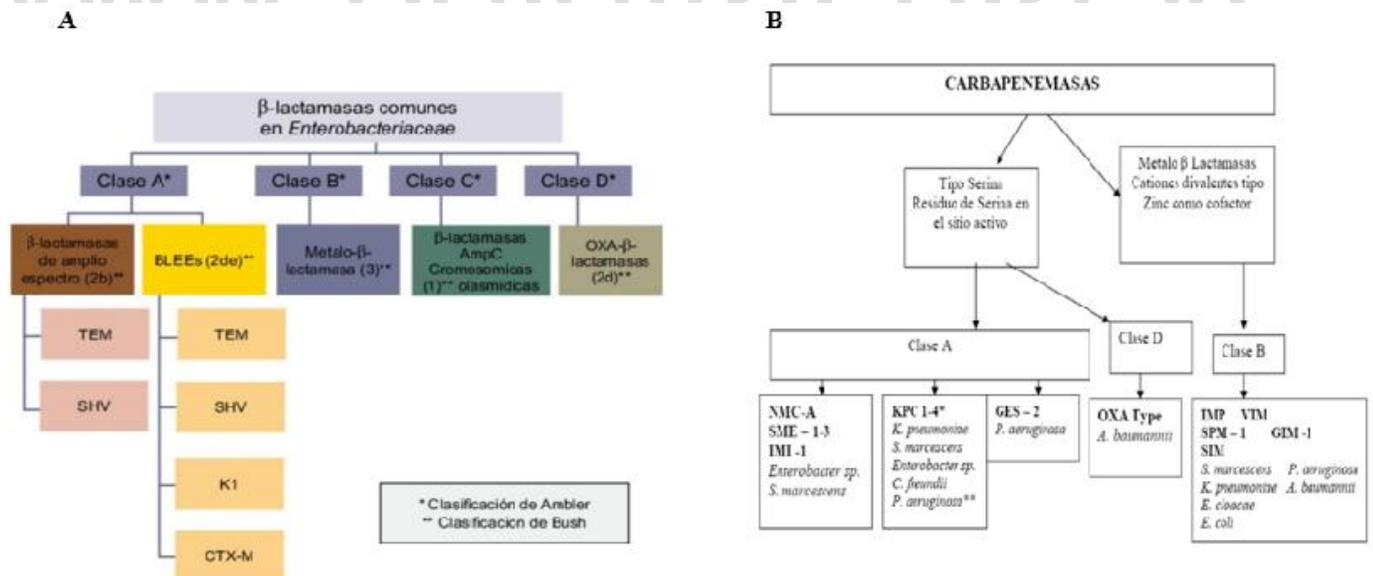


Fig. 3. A: Clasificación general de las betalactamasas en Enterobacteriales. B: Clasificación de las carbapenemasas más frecuentes encontradas en bacterias Gram negativas (Tafur y col, 2008)

**2. Bombas de eflujo o expulsión:** operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas (Fig. 4).

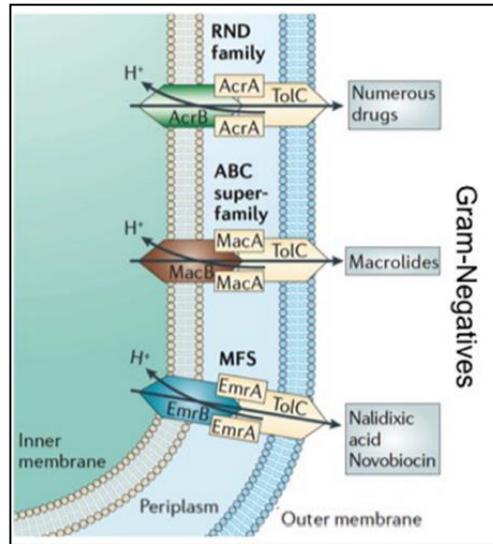


Fig. 4. Representación esquemática de las bombas de eflujo en bacterias Gram negativas.

Fuente: Munita y Arias, 2016

**3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa:** las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico (Munita y col., 2016).

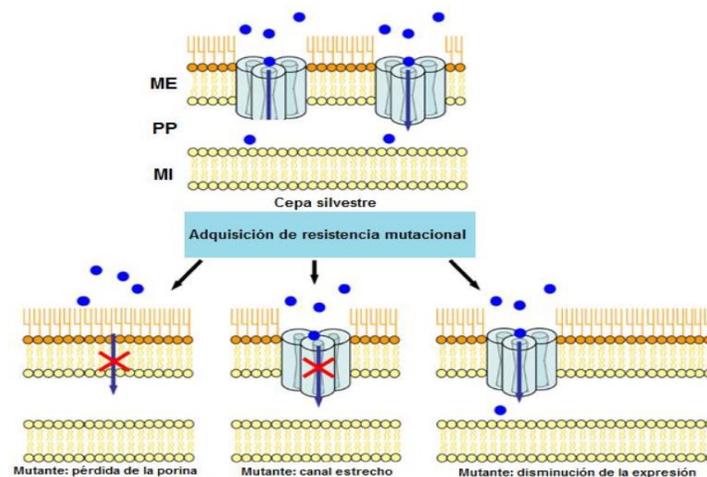


Fig. 5. Mecanismos de adquisición de resistencia asociada a mutaciones en las porinas y/o en su expresión (antibiótico en azul). Fuente: Fernandez y col. 2012, modificado

**4. Alteraciones del sitio de acción:** las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo genera cambios estructurales en los

sitios de acción de los antibióticos, por ejemplo, alteraciones en las proteínas de unión a la penicilina (Munita y col., 2016).

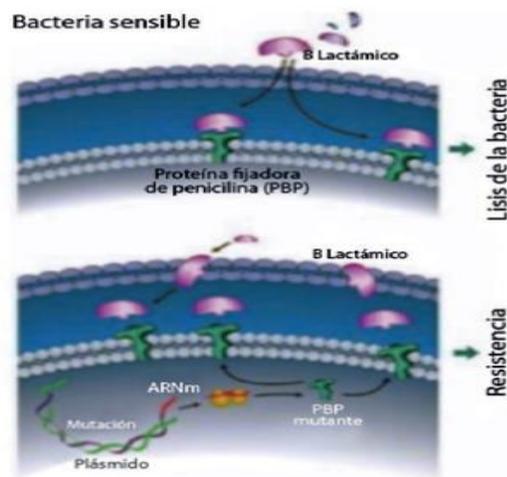


Fig. 6. Modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina PBP (del inglés Penicillin Binding Protein). Fuente: Gestal, Monica y Villacís, José, 2014

## 2.2 Importancia clínica y epidemiológica de las bacterias Gram negativas con amplios niveles de resistencia

En la última década se ha incrementado la incidencia de infecciones causadas por bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, donde están incluidas las Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Fariñas y Martínez, 2013). Estos microorganismos generalmente están implicados en infecciones graves, por lo que actualmente suponen un gran problema de salud pública mundial. Las infecciones que causan tienen un peor pronóstico que las debidas a patógenos sensibles, debido en parte a que los tratamientos antimicrobianos instaurados no son efectivos en un número importante de casos (Breijyeh, y col. 2020).

Este aumento de la resistencia antimicrobiana, unido al poco desarrollo de nuevos antibióticos, hace que cada vez dispongamos de menos opciones terapéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades infecciosas. Recientemente se ha publicado una propuesta para la definición estandarizada de los niveles de multiresistencia adquirida en Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Jiménez, 2019). Las categorías de resistencia que un microorganismo puede expresar son: multiresistencia (MDR, del inglés *multidrug-resistance*), el cual indica que la cepa bacteriana es resistente al menos a tres grupos de antibióticos diferentes, resistencia extendida (XDR, del inglés *extensively drug-resistance*), la bacteria es resistente a todos los grupos de antibióticos excepto a uno o dos de ellos; es decir, se mantiene sensible (S) o intermedio (I) solo a uno o dos grupos de antibióticos y panresistencia (PDR, del inglés *pandrug-resistance*), la bacteria demuestra resistencia a todos los antibióticos.

**Tabla 1. Definición de multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia en bacterias Gram negativas.**

Definición	Grupos de antibióticos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amoxicilina-ácido clavulánico o ampicilina-sulbactam Piperacilina, tazobactam Ceftazidima o ceftaxima/ceftriazona o cefepima Imipenem o meropenem Aztreonam
MDR: resistente a 3 de los 12 grupos de antibióticos	
XDR: resistente a 10 u 11 de los 12 grupos de antibióticos	Gentamicina
PDR: resistente a todos los grupos de antibióticos	Amikacina  Ciprofloxacino Trimetoprima-sulfametoxazol Fostomicina Tigeciclina Colistina
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilina, tazobactam Ceftazidima Cefepima Aztreonam
MDR: resistente a 3 de los 10 grupos de antibióticos	
XDR: resistente a 8 o 9 de los 10 grupos de antibióticos	Imipenem
PDR: resistente a todos los grupos de antibióticos	Meropenem  Gentamicina Amikacina Ciprofloxacino o levofloxacino Colistina
<i>Acinetobacter spp.</i>	Ampicilina-sulbactam Piperacilina, tazobactam Ceftazidima o cefepima Imipenem o meropenem
MDR: resistente a 3 de los 11 grupos de antibióticos	
XDR: resistente a 9 o 10 de los 11 grupos de antibióticos	Gentamicina
PDR: resistente a todos los grupos de antibióticos	Amikacina  Ciprofloxacino Trimetoprima-sulfametoxazol Minociclina Tigeciclina Colistina

MDR, multirresistencia (del inglés *multi-drug resistance*); XDR, resistencia extendida (del inglés *extended drug-resistance*); PDR, panresistencia (del inglés *pan-drug-resistance*).  
Fuente: las definiciones y los antibióticos mencionados en el cuadro son el producto del consenso entre los países participantes de la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos (Red AVRA).

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Jiménez y col., 2019

La contención de la resistencia a los antimicrobianos comienza en su detección y caracterización en el laboratorio de microbiología. La vigilancia constante y unificada de microorganismos resistentes permite determinar el uso y abuso de los agentes antimicrobianos que se emplean en los diferentes escenarios, médico, veterinario, agroalimentario y ambiente (Araque, 2018; Jiménez, 2019).

Las infecciones asociadas a los cuidados de la salud (IACS) anteriormente conocidas como infecciones intrahospitalarias o nosocomiales son un problema grave y se les considera la sexta causa de muerte en Estados Unidos y Europa. Aproximadamente un tercio o más de las IACS pueden ser prevenidas (Pérez y col., 2010). Estas infecciones, por lo general, son causadas por bacterias Gram negativas las cuales tienen una elevada capacidad de adaptación o adquisición de genes que codifican los mecanismos de resistencia a los antibióticos, en especial ante la presión selectiva de los antibióticos (Jiménez, 2019). Por otra parte, tienen varios mecanismos de resistencia, ya sea contra el mismo antibiótico o afectando a múltiples grupos (Fariñas y Martínez, 2013).

Las IACS se asocian más comúnmente con la utilización de aparatos médicos invasivos o procedimientos quirúrgicos. Las más letales son las infecciones del tracto respiratorio inferior y las bacteriemias, mientras que las más comunes son las infecciones del tracto urinario asociadas a catéter. Los datos aportados recientemente por la *U.S. National Healthcare Safety Network* indican que las bacterias Gram negativas son responsables de más del 30% de las IACS y que estas bacterias predominan en los casos de neumonía asociada a la ventilación mecánica (NAVIM) (47%) y las infecciones del tracto urinario (ITU) (45%). En las unidades de terapia intensiva (UTI), las bacterias Gram negativas son las responsables del 70% de las infecciones. Estos datos son similares a los informados en otras partes del mundo (Otaiza y col., 2017). Enterobacterales y los bacilos Gram negativos no fermentadores son los agentes causales más frecuentes de las IACS. Al respecto, en los últimos años se ha incrementado la frecuencia de las infecciones por organismos resistentes a múltiples fármacos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y Enterobacterales productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y/o productoras de carbapenemasas (Pérez y col., 2010; Fariñas y Martínez, 2013).

Varias Enterobacterales tienen una betalactamasa cromosómica (de las clases A o C) y expresan de forma basal o aumentada bombas de expulsión activa, lo que determina una resistencia intrínseca a múltiples antimicrobianos. Además, se pueden seleccionar con facilidad mutaciones cromosómicas en los genes que codifican las topoisomerasas (relacionadas con la resistencia a quinolonas) o las porinas (responsables de un ligero incremento del nivel basal de resistencia a diversos compuestos) (Otaiza y col., 2017, Araque, 2018). También adquieren fácilmente plásmidos que codifican otras beta-lactamasas y mecanismos de resistencia a aminoglucósidos (enzimas modificadoras y metilasas), a quinolonas (proteínas Qnr) o a otros grupos de antimicrobianos clínicamente relevantes (González y col., 2013).

En este contexto, desde hace más de una década se ha reportado un aumento de cepas de *K. pneumoniae* y otras enterobacterias multirresistentes productoras de BLEE como causantes de brotes de IACS en unidades de alto riesgo del Hospital Universitario de Los Andes (HULA), Mérida, Venezuela (Araque y col., 2000, Flores-Carrero y col., 2017). Estos brotes se han caracterizado por una situación epidemiológica compleja, en la cual se han involucrado clones diferentes, presencia de distintas BLEEs y sus combinaciones, así como diversas estructuras genéticas que portan genes *bla*<sub>BLEEs</sub> que facilitan su diseminación. Actualmente esta situación se mantiene, las cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli* aisladas en pacientes reclusos en distintas áreas de hospitalización del servicio de medicina interna del HULA, revelaron un perfil fenotípico compatible con la producción de BLEE, además de mostrar resistencia a otros grupos de antibióticos, tales como quinolonas y aminoglucósidos. Estas cepas estuvieron involucradas principalmente en pacientes con neumonía, sepsis, heridas no quirúrgicas e infecciones del tracto urinario (Araque y col., 2000, Abreu y col., 2014; Flores-Carrero y col., 2017; Varela y col. 2017)

Por otra parte, Varela y col., en el 2017 determinaron la diversidad genética de cepas extraintestinales de *Escherichia coli* productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud y reportaron por primera vez la variante *bla*<sub>CTX-M-65</sub> en Venezuela y la variante *bla*<sub>CTX-M-147</sub> en el mundo, en cepas no relacionadas genéticamente aisladas de pacientes hospitalizados en el HULA. De igual forma, Quijada y col., (2017) en el mismo año, describieron el perfil microbiológico y molecular de bacilos Gram negativos multirresistentes aislados de pacientes adultos con infección urinaria asociada a catéter reclusos en las áreas de medicina interna del HULA.

En relación al pronóstico de pacientes con IACS, Serrano y cols., en el 2016, registraron una mortalidad elevada, en el orden del 56,1% en pacientes adultos con diagnóstico de sepsis en HULA. Enterobacterias productoras de BLEE (TEM-1, SHV-2, SHV-5, CTX-M-8 y CTX-M-15) y *P. aeruginosa* portadora de genes codificantes para una metalo  $\beta$ -lactamasa tipo VIM-2, fueron los microorganismos más frecuentemente aislados.

Estos estudios son relevantes para establecer parámetros de referencia local, especialmente aquellos que permitirán mejorar la calidad de la asistencia sanitaria, así como la optimización de las conductas terapéuticas dada la importancia que tiene las IACS, en los distintos servicios de atención en el HULA.

## 2.2 Antibióticos aprobados por la FDA para el tratamiento de infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes (MDR)

La progresiva expansión de la multirresistencia bacteriana no se ha acompañado del desarrollo en simultáneo de nuevos antimicrobianos. Afortunadamente, la reciente aparición de nuevos antibióticos ofrece alternativas para algunos bacilos Gram negativos MDR, XDR y PDR, tales como: ceftazidima/avibactam para enterobacterias productoras de carbapenemasa, ceftolozano/tazobactam para *P. aeruginosa*, para *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina y otras bacterias Gram positivas MDR, oritavancina, dalbavanzina, telavancina, tedizolid, cetobiprol (Pintado y Pintado, 2019). Tabla 2.

Por otra parte, la ausencia de alternativas terapéuticas ha revelado el papel esencial de otros antibióticos más “antiguos” (fosfomicina, tigeciclina, colistina) en el manejo de las infecciones por estas bacterias. La estrecha colaboración entre las sociedades científicas, autoridades sanitarias, laboratorios de investigación y la industria farmacéutica es ahora más que nunca necesaria para afrontar el reto de esta nueva era “postantibiótica” (Guevara-Agudelo y col., 2021).

**Tabla 2. Características farmacológicas, espectro de acción e indicaciones de los principales antibióticos utilizados en bacterias MDR, XDR y PDR.**

Antibiótico	Familia (vía)	Dosis	Espectro de actividad	Indicaciones	Comentarios
Ceftarolina Fosamil	Cefalosporina (i.v.)	600 mg / 12 h	Enterobacterias (no BLEE ni AmpC) <i>S. aureus</i> (SASM, SARM), <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i>	Neumonía comunitaria Infección de piel-partes blandas	Activa frente a SARM
Ceftobiprol	Cefalosporina (i.v.)	500 mg / 8 h	Enterobacterias (no BLEE ni AmpC) <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i> (SASM, SARM)	Neumonía comunitaria Neumonía nosocomial Infección de piel-partes blandas	No aprobada por las agencias reguladoras sanitarias
Ceftazidima/ Avibactam	Cefalosporina + inhibidor (i.v.)	2500 mg / 8 h	Enterobacterias (productoras de BLEE y carbapenemasa de clases A y D) <i>P. aeruginosa</i>	Infección urinaria Infección intraabdominal	Activa frente a carbapenemasas de clase A (KPC) y D (OXA)
Ceftolozano/ Tazobactam	Cefalosporina + inhibidor (i.v.)	1500 mg / 8 h	Enterobacterias (BLEE y AmpC) <i>P. aeruginosa</i> , <i>B. fragilis</i>	Infección urinaria Infección intraabdominal	Inactiva frente a estafilococo, enterococo y otros anaerobios
Oritavancina	Lipoglucopeptido (i.v.)	1200 mg (dosis única)	<i>S. aureus</i> (SASM, SARM, VISA, VRSA) Estreptococo, enterococo (ERV), ECN	Infección de piel-partes blandas	Administración en dosis única que facilita terapia ambulatoria
Dalbavancina	Lipoglucopeptido (i.v.)	1000 + 500 mg (2 dosis, día 1 y 8)	<i>S. aureus</i> (SASM, SARM, VISA) Estreptococo, enterococo, ECN	Infección de piel-partes blandas	Administración en dos dosis que facilita terapia ambulatoria
Telavancina	Lipoglucopeptido (i.v.)	10 mg / kg / 24 h	<i>S. aureus</i> (SASM, SARM, VISA) Estreptococo, enterococo, ECN	Neumonía nosocomial Infección de piel-partes blandas	Neumonía nosocomial (SARM) si no hay terapia alternativa
Tedizolid	Oxazolidinona (i.v. / v.o.)	200 mg / 24 h (6 días)	<i>S. aureus</i> (SASM, SARM), ECN Estreptococo, enterococo (ERV)	Infección de piel-partes blandas	Administración en dosis única diaria y pauta corta
Fosfomicina	Derivado de ácido fosfónico (i.v. / v.o.)	BGN, 4-6 g / 6-8 h BGP, 2 g / 6 h	BGN (enterobacterias productoras de carbapenemasa y BLEE) <i>P. aeruginosa</i> , BGP (SASM, SARM)	Infección urinaria Infecciones invasivas por bacterias multirresistentes	Considerar en combinación con otros fármacos activos para bacterias multirresistentes
Tigeciclina	Glicicilina (i.v.)	50 mg / 12 h - 100 mg / 12 h <sup>a</sup>	<i>A. baumannii</i> , enterobacterias (productoras de carbapenemasa y/o BLEE)	Infección de piel-partes blandas Infección intraabdominal Infecciones invasivas (no ITU)	Considerar en combinación con otros fármacos activos para bacterias multirresistentes
Colistina	Polimixina E (i.v.)	4,5 MU / 12 h <sup>b</sup> 2-3 MU / 8 h	Enterobacterias productoras de carbapenemasa y BLEE, <i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	Infecciones por BGN multirresistentes	Considerar en combinación con otros fármacos activos para bacterias multirresistentes

Fuente: Pintado y Pintado, 2019

### **2.3 Alternativas terapéuticas novedosas para el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes o con resistencia extensiva a los antibióticos (XDR)**

Uno de los objetivos del Plan de Acción Mundial propuesto por OMS (2017), es el fomentar la investigación y el desarrollo de nuevos antibióticos, movilizandolos recursos de los Estados, pero también explorar otras alternativas de profilaxis y tratamiento más eficaces y menos sujetos a la rápida aparición de resistencia (Fig.7).

Los péptidos antimicrobianos (AMP, por su sigla en inglés) son agentes naturales o sintéticos con actividad contra las membranas de los procariontes. Por ejemplo, las bacteriocinas son AMP producidas por prácticamente todas las especies bacterianas. Al ejercer presión selectiva solo sobre una especie bacteriana específica tendrían menor tendencia a desarrollar resistencia y podrían ser administrados en preparaciones múltiples o en combinación con antibióticos (Thombre y cols., 2019).

Otra estrategia que podría prolongar la vida útil de los antibióticos es la búsqueda de un vehículo que los traslade directamente al sitio de infección. Las nanopartículas podrían cumplir esa función, de manera de conseguir una concentración mayor del antibiótico que disminuya el riesgo de resistencia y evitar también la exposición al antibiótico de otras bacterias comensales (León-Buitemea y cols, 2020).

Los bacteriófagos, virus que infectan la célula bacteriana y producen su lisis, pueden actuar de manera más rápida y eficiente que cualquier antibiótico. Tienen también la ventaja de ser específicos para una especie bacteriana, por lo que administrados como tratamiento mantendrían al resto de la microbiota intacta. La terapia fágica y los probióticos podrían sustituir, al menos en parte, a los antibióticos en la profilaxis de infecciones en humanos y animales (Guevara-Agudelo y col., 2021).

La microbiota intestinal de todos los mamíferos juega un rol preponderante para la salud: contiene entre  $10^{10}$  y  $10^{12}$  bacterias por gramo de contenido intestinal con más de 1.000 especies bacterianas diferentes, que modulan al sistema inmune, participan en la adquisición de nutrientes y excluyen a bacterias patógenas. Los antibióticos afectan el equilibrio de esa microbiota e interfieren en sus funciones benéficas (Cárdenas y cols., 2018). Las nuevas tecnologías, como la secuenciación masiva, permiten estudiar esa microbiota, inclusive de las especies no cultivables y su relación con la salud, de manera de poder modularla con la introducción de bacterias exógenas benéficas conocidas como probióticos. Dos ejemplos exitosos son el uso de probióticos en la industria avícola y los trasplantes fecales a pacientes infectados por *C. difficile* (Tacconelli y cols., 2017)

## Hacia donde debemos ir ...



Fig. 7. Alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de las enfermedades infecciosas producidas por bacteria MDR, XDR y PDR. (Fuente: Tacconelli y cols., 2017; modificado)

### 2.4 Uso de la luz azul como posible alternativa desinfectante y terapia alternativa para infecciones no sistémicas causadas por microorganismos con resistencia extensiva a antibióticos

El efecto de la luz ha sido estudiado por su propiedad germicida sobre diferentes microorganismos infecciosos, aunque en el pasado se ha usado la luz UV como descontaminante ambiental de material quirúrgico, ésta ha sido descartada como uso terapéutico sobre tejido humano infectado, debido al riesgo por exposición a la radiación que presenta para las células (Maclean, y col. 2014). La fototerapia con luz azul de rango visible (405 nm), ha ganado interés en la práctica dermatológica, debido a su efecto inhibitor en el crecimiento bacteriano, sin presentar problemas como daños al ADN, envejecimiento de la piel o exacerbación de melanogénesis asociada a exposición UV (Kleinpenning, y col. 2010). Por consiguiente, el uso de la luz para descontaminación de zonas ambulatorias y su posible uso terapéutico en tejido humano infectado ha sido una ruta terapéutica que ha venido ganando interés (Kleinpenning, y col. 2010).

Dai y colaboradores en el 2013 demostraron una actividad inhibitoria de la luz azul sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, comprobando su efecto inhibitorio *in vivo* sobre tejido cutáneo infectado de ratón, sin daño aparente sobre éste por efecto de la luz. Debido a que en estas investigaciones no se ha asociado a daño al emplear la luz azul y sumándole el efecto bactericida que

produce a 405nm, el uso de ésta puede promover terapias novedosas antimicrobianas alternativas a futuro contra infecciones de origen intrahospitalario sobre el tejido cutáneo.

El mecanismo de acción de la luz azul llamado también fototerapia dinámica, consiste en el efecto de los fotones de luz sobre las porfirinas intracelulares, las cuales son moléculas fotosensibles, que tras la absorción de luz pasan de un estado basal no excitado a promover un electrón a un orbital de mayor energía (estado basal excitado). Posteriormente, la porfirina puede volver a su estado inicial de energía tras emitir fluorescencia y calor, o puede cambiar el espín del electrón (estado triplete excitado). De esta manera, se favorece la interacción de la porfirina con otras moléculas de su alrededor promoviendo la formación de radicales de oxígeno libre, los cuales dañan las estructuras de la célula en cuestión, causando finalmente la muerte bacteriana (Fig. 8) (Robres y col. 2015).

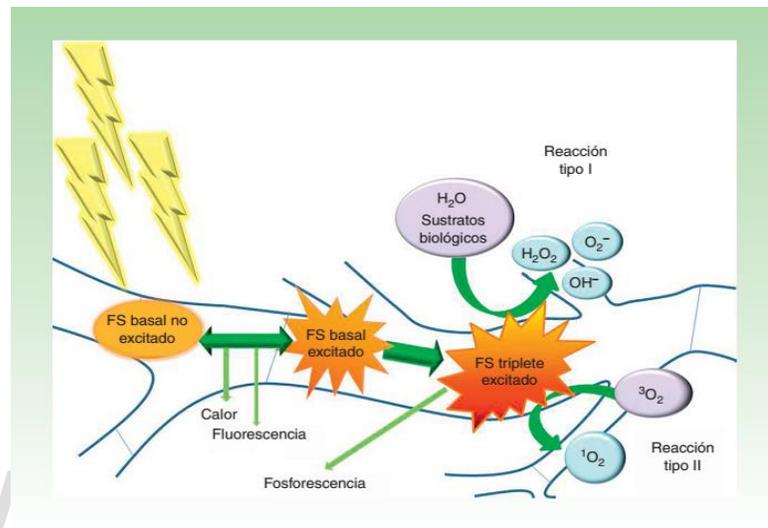


Fig. 8: Mecanismo de acción de terapia fotodinámica (Fuente: Robres y col. 2015).

Muchos factores pueden complicar el uso de la luz azul como terapia, la dependencia del oxígeno para el efecto antimicrobiano ha sido demostrada repetidamente, no obstante, experimentos realizados en ambientes con gran cantidad de éste, no presentan mayores beneficios, destacando que la cantidad de oxígeno no parece ser un limitante del efecto inhibitor de la terapia fotodinámica (Hou y col., 2022). A pesar de esto, sí se ha encontrado un factor limitante en la acumulación de porfirinas intracelular que reaccionan a la luz, una manera de solventar esto, es el uso de estas de forma exógenas como de otras sustancias fotosensibilizadoras, que ayudan a intensificar la eficacia del efecto inhibitor de la luz azul (Gwynne y Gallagher, 2018).

**Tabla 3. Algunas sustancias fotosensibilizantes para uso exógeno**

Class	PS	Advantages	Disadvantages
Photofrin and its derivatives	Hematoporphyrin and its derivatives (HpD)	First-generation PS	Slow metabolism; strong histotoxicity; low active constituent content; short adsorption wavelength; cause skin allergies
Phthalocyanine-based PS	Verteporfin; 5-aminolevulinic acid (5-ALA); hematoporphyrin monomethyl ether (HMME); Temoporfin (m-THPC)	High $^1O_2$ yields; high phototoxicity	Slow metabolism; low immune clearance rate; poor photostability; poor water solubility
	Silicon(IV) phthalocyanine Pc4; Zinc(II) phthalocyanines	Physicochemical stability; long adsorption wavelengths (660–720 nm, with a 50-time higher adsorption at 680 nm); high immune clearance rate; low toxicity in dark	Poor water solubility; prone to agglomerate; low $^1O_2$ yields in oxygen deprivation
Polycyclic quinone PS	Riboflavin; curcumin; hypericin; hypocrellin	Easy purification; high quantum yields; high phototoxicity; low toxicity in dark; good biocompatibility	Short adsorption wavelengths (400–500 nm); poor water solubility; prone to agglomerate
Xanthene dyes	Rhodamine; fluorescein	Good water solubility; high fluorescence quantum yields; high molar extinction coefficient; good biocompatibility; low cytotoxicity	Poor chemical stability; poor photostability; short adsorption wavelengths (~500 nm)
4,4-Difluoro-4-bora-3a,4a-diazas-indacene (BODIPY)		Easy modification; good photophysical and photochemical stability; high fluorescence quantum yields; absorption and emission in the visible region with high molar absorption coefficients	Poor water solubility; low triplet state yield; low $^1O_2$ yield
Transition metal complexes	Ruthenium (II); rhodium; iridium; platinum (II); gold (III)	High ROS yields; high immune clearance rate	Short excitation wavelengths; low penetration depths; poor biocompatibility
Fullerene derivatives		High triplet state yields (~100%); high ROS yields; good photostability; able to generate highly toxic hydroxyl radicals	Short adsorption wavelengths (400~ 500 nm); low penetration depths; poor water solubility

Fuente: Hou y col., 2022

Para el año 2021, Bauer y colaboradores estudiaron el efecto bactericida de la luz azul (405 nm) y luz violeta (450 nm) en todos los microorganismos que conforman el grupo de interés clínico ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp), y compararon la tasa de supervivencia en ambas condiciones de radiación, obteniendo efectos bactericidas para la mayoría, exceptuando únicamente *Enterococcus faecium*; el efecto citotóxico ocurrió a  $300 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  en luz azul, en contraste con la actividad observada con luz violeta, la cual requirió energías elevadas de hasta  $1000 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  para generar un efecto inhibitorio del crecimiento (Bauer y col. 2021). Finalmente, la reducción que observaron en las unidades formadores de colonias (UFC) fue significativa en 405nm, afectando casi la totalidad de los microorganismos estudiados. De esta manera, se evidenció el potencial de la luz azul como agente antimicrobiano que puede ser usado para mejorar las condiciones de desinfección en ambientes ambulatorios o incluso estudiar el efecto bactericida para infecciones no-sistémicas generadas por patógenos del grupo ESKAPE (Bauer y col. 2021).

### **3. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Se ha comprobado que la luz azul tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento bacteriano, observándose una disminución *in vitro* de las unidades formadoras de colonias en cultivos de bacterias Gram negativas con resistencia extensiva a los antibióticos (XDR) al someterlas a la irradiación de luz con una longitud de onda de 405nm.

### **4. OBJETIVOS GENERALES**

Determinar el efecto fotoinhibidor de la luz azul de 405nm en bacterias Gram negativas con multiresistencia extensiva a los agentes antimicrobianos (XDR).

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

5.1. Implementar un protocolo de laboratorio para evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano de la luz azul sobre las bacterias Gram negativas XDR de origen intrahospitalario.

5.2. Evaluar diferentes parámetros físicos y biológicos que influirán en la efectividad de la irradiación sobre bacterias de referencia internacional y cepas XDR seleccionadas.

5.3. Establecer los umbrales mínimos efectivos de irradiación para la inhibición del crecimiento bacteriano en cepas de referencia internacional y XDR seleccionadas.

5.4. Conocer el efecto inhibitorio de la irradiación con luz azul sobre el desarrollo de diferentes especies de bacterias Gram negativas XDR aisladas de pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud.

5.5. Describir los umbrales de inhibición de la luz azul sobre el desarrollo bacteriano de diferentes bacterias Gram negativas XDR estudiadas

5.6. Comparar los umbrales de inhibición de la luz azul con el perfil de resistencia antimicrobiana de las bacterias Gram negativas estudiadas.

### **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **6.1 Cepas bacterianas a estudiar.**

La colección bacteriana analizada estuvo constituida por 40 cepas de origen clínico, con resistencia extensiva a los agentes antimicrobianos pertenecientes a la colección del Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y caracterizadas en estudios previos (Abreu y col., 2014; Serrano y col., 2016; Quijada y col., 2017; Millán y col., 2020). Estas cepas se distribuyeron de la siguiente manera:

Enterobacteriales	Nº	Bacilos Gram negativos no fermentadores	Nº
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	10		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1		
<b>Cepa control</b>		<b>Cepa control</b>	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	

## 6.2 Unidad de Irradiación y especificaciones técnicas

Consta de una fuente de luz LED de 50W (Fig. 9) que emite en la longitud de onda de  $405\pm 10\text{nm}$ , fijada a un disipador de calor con un ventilador adosado que opera de manera constante durante el proceso de irradiación, con la finalidad de evitar el calentamiento excesivo de la unidad, de acuerdo a lo descrito por Gwynne PJ and Gallagher MP (2018). Al frente de la fuente de luz se colocó una lente condensadora que tiene la función de concentrar la iluminación, con la doble finalidad de obtener valores elevados de irradiación en la zona central de la Placa de Petri y, a la vez, producir un gradiente (Fig. 12) que permite determinar, en un solo proceso, los umbrales de inhibición de las muestras inoculadas. Esta configuración alcanza una irradiación máxima constante de  $0,19 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  en el centro de la Placa de Petri.



Fig. 9: Fuente de luz azul basada en un LED con una potencia de 50W que emite en la longitud de onda de  $405\pm 10\text{nm}$  (Fuente: este estudio)

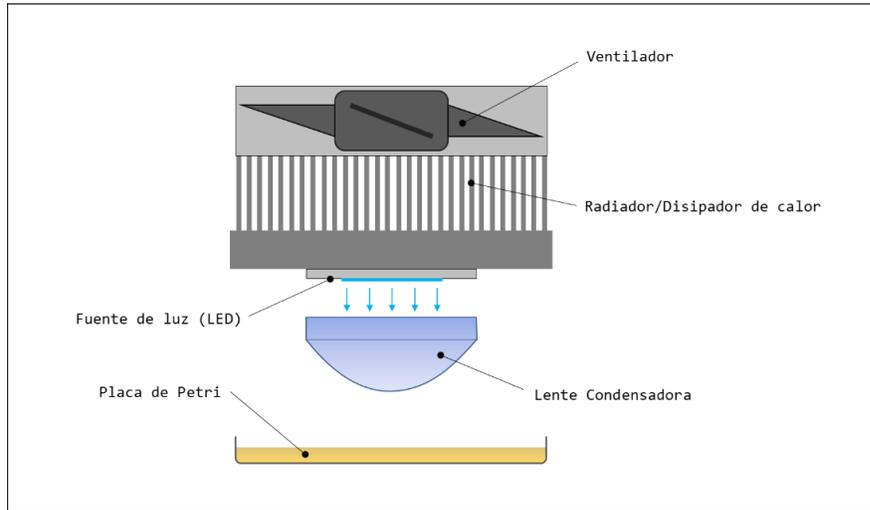


Fig. 10: Componentes de la unidad de irradiación, con un valor máximo de  $0,19 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  en el centro de la placa de Petri (Fuente: este estudio)

Con la finalidad de determinar la estabilidad de la irradiación en el tiempo, se midió la iluminancia de la fuente de luz cada minuto (Fig. 11). Se apreció como su emisión disminuye discretamente durante los primeros 6 minutos de operación, debido al calentamiento paulatino del LED, y que luego se estabiliza a un 90 por ciento del valor inicial, una vez que se alcanza la temperatura de equilibrio.

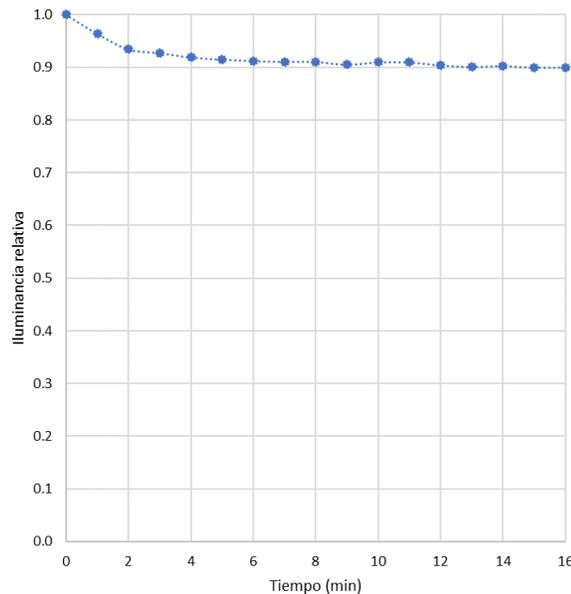


Fig. 11: Iluminación vs Tiempo de exposición (Fuente: este estudio).

Mecánicamente, la unidad fue diseñada y fabricada para calzar de forma precisa sobre una Placa de Petri de 90 mm de diámetro, en sustitución de su cubierta, y así garantizar que el centro del gradiente de irradiación y el de la Placa coincidan.

El nivel de irradiación se determinó en función de la distancia que hay entre el centro de la placa de Petri (zona de irradiación máxima) hasta los extremos de la misma (zona de irradiación mínima) (Fig. 12 y 13), encontrándose que a 36 mm del centro de la placa la incidencia de la luz era nula.

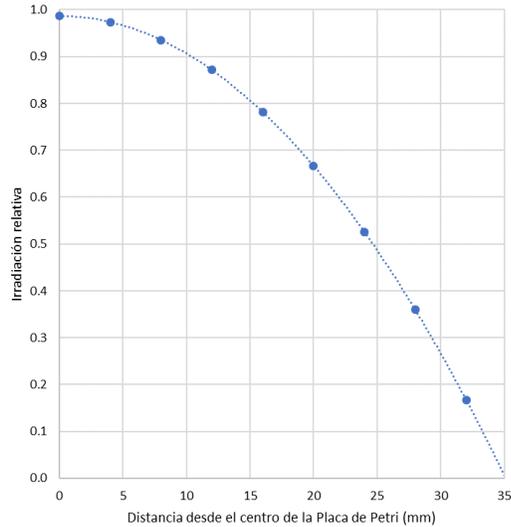


Fig. 12: Gradiente de irradiación (Fuente: este estudio)

### 6.3. Modelo biológico

#### 6.3.1 Etapa de estandarización del protocolo de irradiación.

**6.3.1.1 Cepas bacterianas:** Para esta etapa del estudio se utilizaron 2 cepas de referencia internacional tipo americano ATCC y dos cepas XDR representantes de la colección en estudio:

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Klebsiella pneumoniae* LMM-X23

*Pseudomonas aeruginosa* LMM-15830

**6.3.1.2. Inóculo bacteriano:** Se prepararon dos estándares básicos del inóculo bacteriano comúnmente utilizado en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, el cual consistió en:

Todas las cepas fueron subcultivadas en agar tripticasa soya y MacConkey (Oxoid) para confirmar su viabilidad y pureza. Luego, a partir del cultivo en agar tripticasa soya (Oxoid) se tomaron 3 o 4 colonias típicas y se resuspendieron en 2 ml de solución fisiológica al 5% estéril hasta alcanzar la turbidez del patrón 0,5 de Mc Farland equivalente a  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Esta solución constituyó el primer inóculo bacteriano a probar y es el comúnmente utilizado en las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por la técnica de difusión del disco.

El segundo tipo de inóculo es frecuentemente utilizado en las pruebas de susceptibilidad por Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y consiste en diluir 1:10 la suspensión inicialmente equivalente al 0,5 de McFarland, por lo cual el inóculo final estará constituido por  $1,5 \times 10^7$  UFC.

**6.3.1.3 Inoculación del medio de cultivo:** El medio de cultivo utilizado fue agar Mueller Hinton (Oxoid), el cual se dispensó en placas de Petri estériles desechables de 90 mm de diámetro hasta alcanzar

un grosor de  $\pm 5$  mm. Una vez verificado el control de esterilidad, éstas placas fueron divididas en 4 cuadrantes. Las cepas fueron inoculadas por triplicado en forma de césped de la siguiente manera: Los 2 cuadrantes superiores fueron inoculados con  $1,5 \times 10^8$  UFC y los 2 cuadrantes inferiores con  $1,5 \times 10^7$  UFC. Dos placas fueron seleccionadas para irradiación y la otra conformó el grupo control de viabilidad, es decir sin irradiación.

**6.3.1.4 Irradiación:** Las placas seleccionadas para irradiación fueron sometidas cada una a diferentes tiempos de exposición, una de 15 minutos y las otras por 30 minutos.

**6.3.1.5 Lectura de la prueba:** se realizó midiendo el radio del halo de inhibición, conociendo que la energía recibida por las muestras está determinada por el gradiente mostrado en la Fig. 12. Mientras mayor sea el halo de inhibición, menor es la energía necesaria para la fotoinactivación del microorganismo irradiado.

En las placas donde se observó un evidente efecto inhibitorio, se procedió a medir la distancia del centro de ésta al borde del halo más cercano donde se observó el efecto bactericida de la luz, determinando así, a partir del gradiente definido en la Fig. 12, el umbral de inhibición, conociendo que en el centro de la placa se alcanza un máximo de irradiación de  $0,19 \text{ J}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$  (Fig. 13).



Fig. 13: Inhibición de cepas bacterianas Gram negativas por efecto de la luz azul a 405nm. La escala a la izquierda indica la distancia en milímetros desde el centro de la placa de Petri. La escala a la derecha indica la irradiación relativa correspondiente. (Fuente: este estudio).

**6.3.1.6 Determinación del umbral de inhibición:** Para determinar del umbral de inhibición ( $J \cdot \text{cm}^{-2}$ ) de las cepas probadas se utilizó una hoja de cálculo (Microsoft Excel) empleando todos los parámetros pertinentes, tales como: inóculo bacteriano (CFU), irradiación máxima ( $J \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , tiempo de irradiación (s), medida del radio del halo de inhibición (mm) y la correspondiente irradiación relativa (factor de gradiente), utilizando la ecuación:

$$\text{Umbral de inhibición} = \text{Irradiación máxima} \times \text{tiempo de irradiación} \times \text{irradiación relativa.}$$

Todo el proceso de estandarización fue realizado en tres eventos independientes y los resultados descritos corresponden al promedio de los tres ensayos, así como las condiciones generales a utilizar en la etapa de evaluación.

## **6.4 Etapa de evaluación de los umbrales de inhibición sobre cepas XDR de origen intrahospitalarios.**

**6.4.1.1 Cepas Bacterianas:** En esta etapa del estudio se utilizaron el total de las 40 cepas XDR de origen intrahospitalario.

**6.4.1.2 Condiciones para los ensayos de irradiación:** Tomando en consideración los resultados de la etapa de estandarización se establecieron como condiciones para la irradiación las siguientes:

1. Tiempo de irradiación 15 min (900 segundos)
2. Inoculo bacteriano de  $1,5 \times 10^7$  UFC.

Para los ensayos de irradiación, lectura de la prueba y determinación del umbral de inhibición, se procedió de la misma forma que en los ensayos de estandarización de la sección **6.3**.

## **6.5 Análisis estadístico**

Todos los resultados fueron analizados con el programa SPSS statistics 25. Los valores mostrados son la media de los ensayos  $\pm$  su desviación estándar. Se utilizó el programa SigmaPlot 12.0 para graficar los resultados. Para el cálculo de normalidad: se realizó una prueba de Shapiro-Wilk y se obtuvo un valor  $p < 0.05$ , por lo cual se rechaza la hipótesis nula de una distribución normal de los datos. La prueba U de Mann-Whitney, fue utilizada para establecer las diferencias entre los grupos bacterianos y los umbrales de inhibición. El cálculo de la variable de supervivencia se realizó tomando en cuenta que la irradiación máxima coincide con el centro de placa de Petri. Un desarrollo bacteriano en esta zona fue considerado como 100% de supervivencia bacteriana. Todos los datos correspondientes a la medida de los halos de inhibición fueron analizados mediante la siguiente ecuación:

$$x = (45 - n) \text{ mm} \times 100 \div 45 \text{ mm}$$

Donde, 45 es una constante (100% supervivencia bacteriana);  $n$  = halo de inhibición (de cada cepa estudiada); 100 (% de supervivencia de la cepa estudiada).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Estandarización del protocolo de irradiación.

Como paso previo para evaluar el efecto bactericida de la luz azul en bacterias Gram negativas con resistencia extensiva (XDR) a los antibióticos de origen intrahospitalario, fue necesario estandarizar la metodología a aplicar. Es importante resaltar que la unidad de irradiación fue construida al iniciar este proyecto y adecuada a las circunstancias particulares de este trabajo, por lo que requirió tanto la determinación de algunos parámetros físicos como controles de calidad. De igual forma, se establecieron las condiciones de irradiación necesarias para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.

En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos durante la estandarización de la metodología. Independientemente del tiempo de irradiación y de las UFC evaluadas, todas las cepas probadas produjeron halos inhibitorios que oscilaron entre 20 y 34 mm de radio, excepto *K. pneumoniae* LMM-X23 que no mostró inhibición utilizando 15 minutos de irradiación con un inóculo bacteriano  $1,5 \times 10^8$  UFC. Sin embargo, al disminuir las UFC en el orden de 1000 y aumentar el tiempo de irradiación a 30 minutos el efecto inhibitorio de la luz azul fue evidente, pasando de 0 mm de inhibición con  $10^8$  UFC a ampliar el radio de inhibición a 16 mm con un inóculo bacteriano menor ( $10^7$  UFC). Por otra parte, cabe destacar que la luz azul tuvo mayor poder inhibitorio sobre el desarrollo de las cepas de *P. aeruginosa*, hallazgo que fue independiente de las variables inóculo y tiempo de irradiación.

Los resultados del cálculo del umbral de radiación para cada cepa se describen en la tabla 5. Al respecto, destaca que las cepas de *P. aeruginosa* mostraron mayor sensibilidad al efecto de la luz, requiriendo irradiaciones de entre 21 y  $123 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ . Por el contrario, *K. pneumoniae* LMM-X23 fue la cepa menos sensible, registrando un umbral de inhibición de  $320 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  a los 30 minutos, con un inóculo de  $10^8$  UFC. En conclusión, y con base en los resultados obtenidos, se establecieron las condiciones que fueron aplicadas sobre el total de cepas XDR a estudiar en la etapa de evaluación. Estas condiciones fueron:

1. Tiempo de irradiación: 15 minutos
2. Inóculo bacteriano a utilizar:  $1.5 \times 10^7$  UFC
3. Cepas con halos de inhibición con un radio mayor a 30 mm serán sometidas a un tiempo menor de irradiación.

**Tabla 4. Parámetros evaluados para la estandarización del protocolo de la fotoinactivación con luz azul (405nm) en cepas de referencia internacional y XDR seleccionadas**

Parámetros	<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>K. pneumoniae</i> LMM- X23		<i>P. aeruginosa</i> LMM-15830	
	mm	I relativa	mm	I relativa	mm	I relativa	mm	I relativa
<b>Tiempo irradiación 15 minutos</b>								
<b>Inóculo bacteriano <math>1,5 \times 10^8</math> UFC</b>	20	0,67	24	0,53	0	1	20	0,67
<b><math>1,5 \times 10^7</math> UFC</b>	24	0,53	24	0,53	8	0,94	24	0,53
<b>Tiempo irradiación 30 minutos</b>								
<b>Inóculo bacteriano <math>1,5 \times 10^8</math> UFC</b>	24	0,53	32	0,17	8	0,94	28	0,36
<b><math>1,5 \times 10^7</math> UFC</b>	28	0,36	34	0	16	0,78	28	0,36

**Tabla 5. Determinación del umbral de inhibición de la luz azul (405nm) en cepas de referencia internacional y XDR seleccionadas**

Cepa Bacteriana/Inóculo	Irradiación máxima J·s <sup>-1</sup> ·cm <sup>-2</sup>	Tiempo segundos	Halo mm	Factor Gradiente Irradiación relativa	Umbral de inhibición J·cm <sup>-2</sup>
<i>E. coli</i> ATCC 25922 1,5 x 10 <sup>8</sup> UFC	0,19	900	20	0,67	114
	0,19	900	24	0,53	90
	0,19	1800	24	0,53	180
	0,19	1800	28	0,36	123
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 1,5 x 10 <sup>8</sup> UFC	0,19	900	24	0,53	90
	0,19	900	24	0,53	90
	0,19	1800	32	0,17	57
	0,19	1800	34	0,06	21
<i>K. pneumoniae</i> LMM-X23 1,5 x 10 <sup>8</sup> UFC	0,19	900	0	1	NA
	0,19	900	8	0,94	160
	0,19	1800	8	0,94	320
	0,19	1800	16	0,78	267
<i>P. aeruginosa</i> LMM15830 1,5 x 10 <sup>8</sup> UFC	0,19	900	20	0,67	114
	0,19	900	24	0,53	90
	0,19	1800	28	0,36	123
	0,19	1800	28	0,36	123

NA: no aplicable

## 7.2 Evaluación de los umbrales de inhibición en las cepas XDR de origen intrahospitalarios.

Después de establecer las condiciones de irradiación, las 40 cepas XDR de origen intrahospitalario fueron sometidas a los ensayos de irradiación y evaluación de los umbrales de inhibición para cada una de ellas. En la tabla 6 se muestran los resultados del efecto de la irradiación sobre el conjunto total de cepas. En el 82,50% (33/40) de las cepas se observó inhibición del crecimiento bacteriano, fenotípicamente demostrado por la formación de un halo de inhibición causado por el gradiente de irradiación y que se correspondió con umbral de inhibición (J·cm<sup>-2</sup>). El 17,50% (7/40) de las cepas permanecieron viables al efecto de la irradiación en rangos que superaron 170 J·cm<sup>-2</sup>. Este grupo de cepas estuvo conformado solo por Enterobacterales; 2 *K. pneumoniae*, 4 *Escherichia coli* y un *E. aerogenes*.

Una distribución de los rangos del umbral de inhibición (Tabla 7) permitió agrupar la mayoría de las Enterobacterales en rangos inhibitorios entre 86 y 126 J·cm<sup>-2</sup>, mientras que los bacilos Gram negativos no fermentadores (Pseudomonadales) estuvieron por debajo 86 J·cm<sup>-2</sup> (Fig. 14). En la tabla 8 podemos observar la asociación del tamaño del halo de inhibición con los valores de irradiación para cada grupo de especies bacterianas. Los resultados permitieron establecer una relación inversamente proporcional entre las variables estudiadas, es decir mientras más pequeño es el halo de inhibición mayor es el umbral de irradiación, tal es el caso de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* y *E. aerogenes*. Por el contrario, valores de irradiación menores se relacionaron con halos de inhibición mayores en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*. Al respecto, el porcentaje de sobrevivencia también se relacionó de forma inversamente proporcional al tamaño del halo de inhibición (Tabla 9 y Fig. 16). A medida que el porcentaje de sobrevivencia se incrementaba, el tamaño del halo de inhibición fue más pequeño.

Cuando se analizó el perfil de resistencia de cada cepa bacteriana con el umbral de inhibición (Tabla 10), no se pudo observar una relación directa entre estas variables. Los resultados indican que cepas que

fueron inhibidas por la irradiación podían tener las mismas características de resistencia que las cepas que permanecieron viables al efecto de la luz azul.

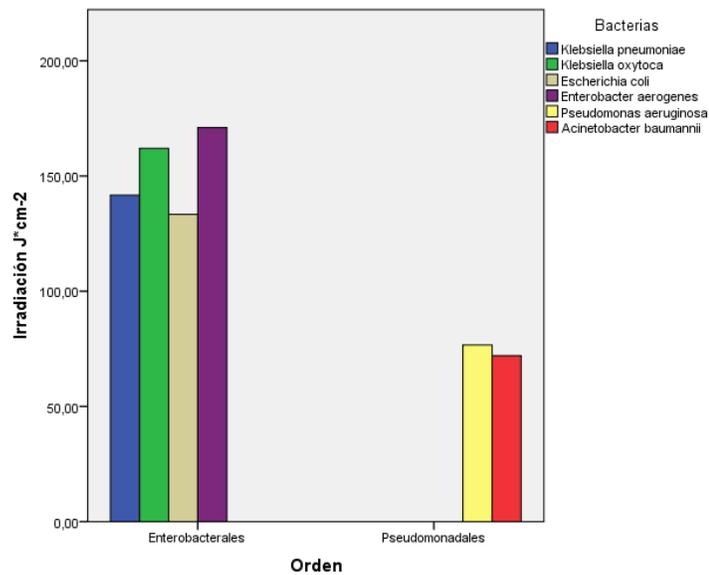


Fig. 14: Umbral de inhibición de la luz azul (405nm) establecidos por especie XDR estudiada y separados por orden. (Fuente: este estudio).

www.bdigital.ula.ve

**Tabla 6. Determinación del umbral de inhibición de la luz azul (405nm) en cepas XDR\***

Nº cepa	Cepa bacteriana	Halo mm	Factor Gradiente Irradiación relativa	Umbral de inhibición J·cm <sup>-2</sup>
LMM-X1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	0,81	138
LMM-X4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0,97	165
LMM-X6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	0,91	155
LMM-X8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	0,67	114
LMM-X10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	0,81	138
LMM-X11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	0,97	165
LMM-X12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	0,81	138
LMM-X14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	25	0,49	83
LMM-X17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0,98	167
LMM-X18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23	0,56	96
LMM-X19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	0,85	146
LMM-X23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	0,94	160
LMM-X27	<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	0,95	162
LMM-X29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	0,70	119
LMM1060	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	>170
LMM416235	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	>170
LMM038	<i>Escherichia coli</i>	24	0,53	90
LMM099	<i>Escherichia coli</i>	18	0,73	124
LMM316	<i>Escherichia coli</i>	22	0,60	102
LMM726	<i>Escherichia coli</i>	28	0,36	61
LMM35218	<i>Escherichia coli</i>	12	0,87	149
LMM717	<i>Escherichia coli</i>	0	1	>170
LMM719	<i>Escherichia coli</i>	0	1	>170
LMM1147	<i>Escherichia coli</i>	0	1	>170
LMM1194	<i>Escherichia coli</i>	0	1	>170
LMM15131.1	<i>Escherichia coli</i>	18	0,73	124
LMM200	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	1	>170
LMM007	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	0,27	46
LMM022	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	0,56	96
LMM086	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	0,27	46
LMM111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	0,73	124
LMM137	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	0,36	61
LMM259	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25	0,49	83
LMM283	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	0,27	46
LMM77923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26	0,45	76
LMM150830	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24	0,53	90
LMM260315	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28	0,36	61
LMMGP567.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	0,67	114
LMM251	<i>Acinetobacter baumannii</i>	29	0,31	54
LMM496	<i>Acinetobacter baumannii</i>	24	0,53	90

\*Inóculo: 1,5 X 10<sup>7</sup>; Tiempo de irradiación: 15 minutos (900 segundos)

**Tabla 7. Distribución de las cepas XDR de acuerdo a los rangos de umbral de inhibición**

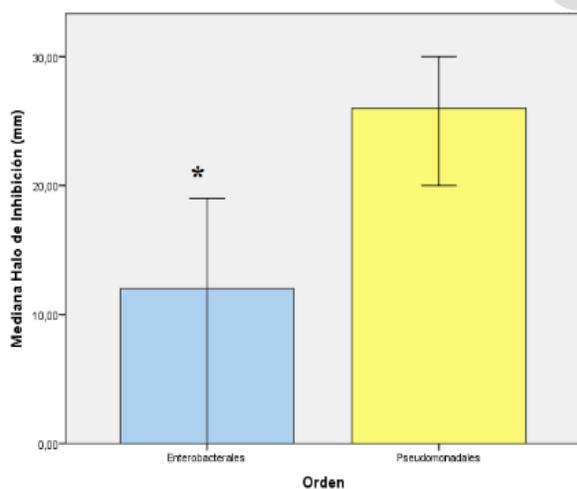
Umbral de inhibición J·cm <sup>-2</sup>	Enterobacteriales N° (%)	Pseudomonadales N° (%)
45 – 85	2 (7,40)	8 (61,54)
86 – 126	7 (25,93)	5 (38,46)
127 – 167	11 (40,74)	0
168 – y más	7 (25,93)	0
<b>Total</b>	27 (100)	13 (100)

**Tabla 8. Relación del tamaño del halo de inhibición y umbral de inhibición de la luz azul (405nm) determinados para cada especie bacteriana estudiada**

Bacterias	Halo (mm)	Umbral de Irradiación (J·cm <sup>-2</sup> )
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11.73 ± 8.09	141.73 ± 27.81
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7.00 ± 0.00**	162.00 ± 0.00
<i>Escherichia coli</i>	12.20 ± 11.29	133.40 ± 39.70
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0.00 ± 0.00	171.00 ± 0.00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.63 ± 4.10	76.63 ± 27.45
<i>Acinetobacter baumannii</i>	26.50 ± 3.53	72.00 ± 25.45

\*Los valores expuestos para cada especie son la media poblacional ± la desviación estándar (calculados por el programa SPSS statistics 25) \*\*valores de 0.00 de desviación estándar dados por una población de un solo representante por especie (n=1) \*

A



B

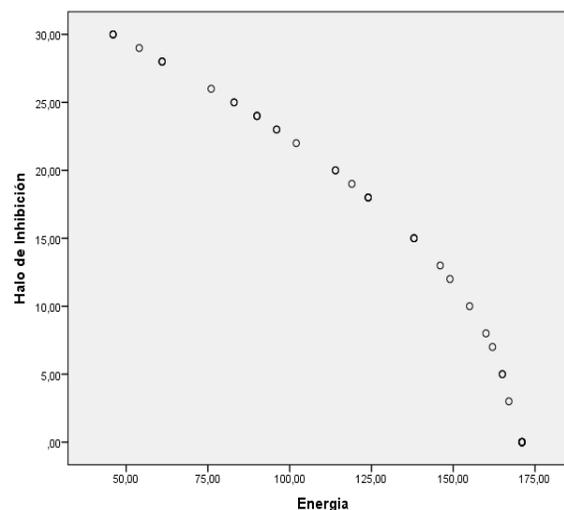


Fig. 15. A: Análisis de diferencias entre los halos de inhibición (mm) presentados por los grupos Enterobacteriales y Pseudomonadales; barras representadas por el error estándar. Significancia según prueba U de Mann-Whitney con un valor de  $p < 0,01$ . B: dispersión que explica la correlación entre la variable independiente (Energía de irradiación J·cm<sup>-2</sup>) y la variable dependiente (Halo de inhibición mm). (Fuente: este estudio).

**Tabla 9. Resultados del cálculo del porcentaje de supervivencia a partir del halo de inhibición para cada una de las cepas estudiadas**

N° Cepa	Cepa Bacteriana	Supervivencia (%)	Halo inhibición (mm)
LMM-X1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67,00	15,00
LMM-X4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	89,00	5,00
LMM-X6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	78,00	10,00
LMM-X8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	56,00	20,00
LMM-X10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67,00	15,00
LMM-X11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	89,00	5,00
LMM-X12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67,00	15,00
LMM-X14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	44,00	25,00
LMM-X17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	93,00	3,00
LMM-X18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	49,00	23,00
LMM-X19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	71,00	13,00
LMM-X23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	82,00	8,00
LMM-X27	<i>Klebsiella oxytoca</i>	84,00	7,00
LMM-X29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	58,00	19,00
LMM1060	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100,00	0
LMM416235	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100,00	0
LMM038	<i>Escherichia coli</i>	47,00	24,00
LMM099	<i>Escherichia coli</i>	60,00	18,00
LMM316	<i>Escherichia coli</i>	51,00	22,00
LMM726	<i>Escherichia coli</i>	38,00	28,00
LMM35218	<i>Escherichia coli</i>	73,00	12,00
LMM717	<i>Escherichia coli</i>	100,00	0
LMM719	<i>Escherichia coli</i>	100,00	0
LMM1147	<i>Escherichia coli</i>	100,00	0
LMM1194	<i>Escherichia coli</i>	100,00	0
LMM15131.1	<i>Escherichia coli</i>	60,00	18,00
LMM200	<i>Enterobacter aerogenes</i>	100,00	0
LMM007	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33,00	30,00
LMM022	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49,00	23,00
LMM086	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33,00	30,00
LMM111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60,00	18,00
LMM137	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38,00	28,00
LMM259	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44,00	25,00
LMM283	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33,00	30,00
LMM77923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42,00	26,00
LMM150830	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47,00	24,00
LMM260315	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38,00	28,00
LMMGP567.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56,00	20,00
LMM251	<i>Acinetobacter baumannii</i>	36,00	29,00
LMM496	<i>Acinetobacter baumannii</i>	47,00	24,00

**Tabla 10. Patrones de resistencia de las cepas XDR y el umbral de inhibición J·cm<sup>-2</sup>**

Nº cepa	Cepa bacteriana	Patrón de resistencia	Umbral de inhibición J·cm <sup>-2</sup>
LMM-X1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM-2, SHV-5, CTX-M-8, CIP, GEN	138
LMM-X4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-8, CIP, GEN	165
LMM-X6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-5, CTX-M-8, CIP, GEN	155
LMM-X8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2; ACN, GEN, TOB	114
LMM-X10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-8, CTX-M-9; CIP, GEN	138
LMM-X11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM-2, SHV-2, CTX-M-9; CIP, GEN	165
LMM-X12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2; CIP, GEN	138
LMM-X14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15; CIP,AMK,GEN, TOB	83
LMM-X17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-15; ACN, AMK, GEN, TOB	167
LMM-X18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-2; AMK	96
LMM-X19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-8; ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	146
LMM-X23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CTX-M-8; ACN, CIP, GEN, TOB	160
LMM-X27	<i>Klebsiella oxytoca</i>	TEM-15, CTX-M-8, KPC-2	162
LMM-X29	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TEM-1, CTX-M-15; ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	119
LMM1060	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2; CIP, GENT, AMK, TOB,	>170
LMM416235	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC-2; CIP, AMK, GEN, TOB	>170
LMM038	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15, CIP, AMK	90
LMM099	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-2, VIM-1, CIP,AMK	124
LMM316	<i>Escherichia coli</i>	TEM-1, CTX-M-15; CIP, AMK	102
LMM726	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15; CIP, AMK	61
LMM35218	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15; VIM-1, CIP, AMK	149
LMM717	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15; VIM-1, CIP, AMK	>170
LMM719	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15; KPC-2, CIP, AMK	>170
LMM1147	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-8; VIM-1, CIP, AMK	>170
LMM1194	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-15; VIM-1, CIP, AMK	>170
LMM15131.1	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M-2; KPC-2, CIP, AMK	124
LMM200	<i>Enterobacter aerogenes</i>	AmpC; CIP; GEN	>170
LMM007	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1, ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	46
LMM022	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1, ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	96
LMM086	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1, CIP, GEN, TOB	46
LMM111	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC-2; ACN, CIP, AMK, GEN, TOB	124
LMM137	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1, CIP, GEN, TOB	61
LMM259	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1, CIP, GEN, AMK, TOB	83
LMM283	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1; CIP, GEN, TOB	46
LMM77923	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	IMP; CIP, AMK, GEN, TOB	76
LMM150830	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC-2, CIP, GEN, TOB	90
LMM260315	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC-2, CIP, GEN, TOB	61
LMMGP567.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	VIM-1, CIP, GEN, TOB	114
LMM251	<i>Acinetobacter baumannii</i>	VIM-1, CIP, GEN, TOB	54
LMM496	<i>Acinetobacter baumannii</i>	VIM-1, CIP, GEN, TOB	90

\*Inóculo: 1,5 X 10<sup>7</sup>; Tiempo de irradiación: 15 minutos (900 segundos). Betalactamasas de espectro extenso (CTX-M, SHV, TEM), Carbapenemasas (VIM-1, IMP, KPC-2); ACN, ácido nalidíxico; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; AMK, amikacina; TOB, tobramicina.

## 8. DISCUSIÓN

La inactivación microbiana mediada por luz azul representa una prometedora alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones no sistémicas, tales como las de piel y tejidos blandos, especialmente las producidas por bacterias con resistencia extensiva (XDR) a los antimicrobianos (Haridas & Atreya, 2022). El fenómeno creciente de la resistencia antimicrobiana ha obligado a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas donde la terapia con luz azul se presenta como una opción válida (Nakonieczna y cols, 2019). En este estudio se demostró que la luz azul (405nm) fue eficaz para inactivar más del 80% de las cepas Gram negativas XDR estudiadas.

Gracias a que la unidad de irradiación se diseñó de manera que pudiera generarse un gradiente, pudimos determinar que la mayoría de las cepas pertenecientes al grupo de las Enterobacterales fueron inhibidas con umbrales de irradiaciones de hasta  $165 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , obtenidos en una exposición de 15 minutos. Similares resultados fueron reportados por Dos Anjos y cols. (2019) quienes inactivaron con luz azul clones internacionales (ST10; ST131 y ST648) de *E. coli* multirresistentes con irradiaciones de  $206.25 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  durante 90 minutos. Sin embargo, cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii* fueron más sensibles a la acción de la fotoinactivación ( $46$  a  $124 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), por lo menos en un orden mayor que el grupo de la Enterobacterales.

Algunos estudios indican que las diferencias en la inactivación de distintas especies bacterianas, por irradiaciones a 405nm, se debe a que cada una de ellas tienen diferencias en cuanto a la capacidad de generar especies reactivas al oxígeno (ROS) y, a su vez, de producir diversas vías para solventar el estrés oxidativo (Hadi y col. 2021; Rapacka-Zdonczyk y col. 2021). Otros autores afirman que la sensibilidad de una bacteria a una longitud de onda del espectro visible, puede verse afectada por el tipo y la prevalencia de sustancias fotosensibilizadoras endógenas tales como las porfirinas, así como por la absorbancia pico de estas sustancias (Haridas & Atreya, 2022). Al respecto, algunos reportes indican que con dosis cercanas a los  $50 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ , se produce un incremento en la cantidad de especies reactivas al oxígeno (ROS) en cepas de *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, incluso también promueve una reducción considerable del crecimiento *in vitro* e *in vivo*, debido a una alta cantidad de porfirinas intracelulares que suelen tener estas bacterias (Leanse y col, 2018). En este contexto, se pudo determinar que los valores de supervivencia por especie en este estudio, estuvieron directamente relacionados con los umbrales de irradiación, es decir porcentajes menores de supervivencia estuvieron en función con valores mínimos de irradiación. Esta relación, supervivencia/irradiación, fue demostrada fenotípicamente por el tamaño del halo de inhibición, mientras más grande era el halo, el efecto inhibitor de la luz azul es mayor, requiriendo umbrales de irradiación menores, lo que significa una reducción de las UFC y, por ende, de los valores de supervivencia.

Por otra parte, es importante destacar que irradiaciones de por lo menos  $170 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$  fueron insuficientes para inhibir el crecimiento bacteriano en solo 7 cepas (17,50%) del grupo de las Enterobacterales, considerándose una supervivencia del 100%. Las cepas que permanecieron tolerantes a los efectos de la irradiación fueron 2 *K. pneumoniae*, 4 *Escherichia coli* y 1 *E. aerogenes*. Es probable que un aumento del tiempo de exposición a la radiación o el tratamiento previo de estas cepas con sustancias fotosensibilizadoras puedan favorecer el efecto inhibitor de la luz azul. En este sentido, estudios previos de las infecciones por especies de enterobacterias y los mecanismos de defensa del sistema inmune mamífero de promover ROS para generar la muerte celular del agente infeccioso, indican una convergencia evolutiva entre los mecanismos de eliminación de dichas infecciones y la supervivencia de los microorganismos infecciosos, generándose de esta manera mecanismos que evitan el estrés oxidativo

(Basak y col. 2012; Mih y col. 2020; Hadi, y col. 2021; Rapacka-Zdonczyk y col. 2021). Es conocido que las proteínas KatG y AhpF permiten remover el peróxido de hidrógeno intracelular en las bacterias, reduciendo así el estrés oxidativo, lo que explica que se encuentre una mayor concentración de estas proteínas en Enterobacterales tras la exposición a terapias fotodinámicas asociadas a la luz azul (Rodríguez-Rojas y col, 2020).

Por otra parte, Leanse y col., en el 2018, investigaron el desarrollo potencial de resistencia en bacterias patógenas Gram negativas a la luz azul mediante múltiples exposiciones a ésta. Los resultados de este estudio demostraron que es poco probable que la resistencia a la luz azul pueda inducirse en bacterias Gram-negativas a través de múltiples ciclos de exposición *in vitro* o *in vivo* y concluyen que la exposición seriada de luz azul en heridas infectadas de ratón sugiere que los pacientes que son tratados por infecciones dermatológicas, pueden potencialmente soportar tratamientos secuenciales de fototerapia a 405nm, sin el desarrollo de resistencia.

Numerosos reportes afirman que el efecto inhibitorio de la luz azul sobre bacterias multirresistentes, sin inducir daño en el tejido humano, se ha convertido en una esperanzadora alternativa terapéutica, especialmente para infecciones localizadas (Halstead y cols, 2016; Cabral & Rodríguez, 2019; Nakonieczna y cols, 2019). Los hallazgos de este estudio indican que la susceptibilidad de las bacterias Gram negativas a los efectos de la luz azul fue una característica independiente de la especie y de los mecanismos de resistencia presentes en estas cepas. Estudios realizados por Zhang y col. (2014), demostraron que la irradiación a  $55,8 \text{ J/cm}^2$  redujo significativamente la carga bacteriana en las quemaduras de ratón infectadas con *A. baumannii*. Por otra parte, Wozniak y col. (2019) comprobó la utilidad del efecto sinérgico entre diversos antibióticos (colistin, tetraciclinas o imipenem) y dosis subletales de irradiación ( $63.6 \text{ J} \cdot \text{cm}^2$ ) en cepas de *A. baumannii* XDR. Un reporte reciente de Dos Anjos y col. (2020) demostró que la hipermucoviscosidad y la hipervirulencia de *K. pneumoniae* no fueron factores que impidieron la fotoinactivación de las cepas.

Los hallazgos obtenidos en este estudio demostraron que la luz azul (405nm) tiene un efecto inhibitorio contra bacterias Gram negativas XDR de origen intrahospitalario, el cual pudo ser cuantificado, permitiendo establecer un rango de irradiación entre  $61$  y  $165 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  para el grupo de las Enterobacterales y de  $46$  a  $124 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  para Pseudomonadales, así como de estimar el umbral de tolerancia de  $>170 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$  para las cepas no inhibidas. El uso de la lente condensadora colocada al frente de la fuente de luz representa una ventaja técnica importante, ya que permitió evaluar, en un solo proceso, la sensibilidad de varias cepas, al cuantificar el umbral de irradiación de cada una de ellas. Cabe destacar que este es el primer estudio realizado en Venezuela donde se demuestra que la luz azul es capaz de inactivar patógenos Gram negativos XDR de importancia clínica y epidemiológica. Los resultados obtenidos abren una nueva línea de investigación para explorar las aplicaciones prácticas de la luz azul como alternativa terapéutica en la lucha contra el creciente fenómeno de la resistencia antimicrobiana.

## 9. CONCLUSIONES

- El 82,5% (33/40) de las bacterias Gram negativas XDR estudiadas fueron inhibidas con irradiaciones  $\leq 165 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ .
- Los rangos de irradiación con efecto inhibitorio en el grupo de Pseudomonadales fueron menores que los requeridos para las Enterobacterales.
- Los valores de tolerancia en 7 cepas (17,5%) de Enterobacterales no inhibidas por la luz azul fue  $\geq 170 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$

- Existen diferencias significativas en la susceptibilidad al tratamiento con la luz azul a 405nm entre bacterias del orden Enterobacterales y Pseudomonadales.
- Se estableció una relación significativa entre el tamaño del halo de inhibición, el porcentaje de sobrevivencia y los umbrales de irradiación.
- Las características técnicas del diseño de la Unidad de Irradiación permitieron establecer eficientemente los rangos de fotoinactivación bacteriana.
- Este trabajo representa el primer estudio que se realiza en Venezuela sobre los efectos bactericidas de la luz azul en bacterias Gram negativas XDR de origen intrahospitalario.

## 10. RECOMENDACIONES

- Someter las cepas bacterianas que demostraron tolerancia a la luz azul a períodos de irradiación más prolongados.
- Utilizar sustancias fotosensibilizantes en cepas tolerantes a irradiaciones superiores a  $170 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$
- Cuantificar la reducción de las UFC en cada grupo bacteriano y establecer su correspondencia con los umbrales de inhibición, para estimar una escala de fotoinactivación.
- Ampliar el estudio del efecto bactericida de la luz azul sobre un variado grupo de patógenos de importancia clínica y epidemiológica, tales como especies de *Mycobacterium*.

## 11. OTRAS PERSPECTIVAS A SEGUIR

- Incluir estudios con microscopia electrónica que ayuden a dilucidar los efectos de la luz azul sobre los componentes de la célula bacteriana.
- Estudiar el efecto sinérgico o aditivo del tratamiento con fototerapia y antibióticos en ensayos *in vitro* y en animales de experimentación.
- Estudiar los mecanismos genéticos involucrados en el estrés oxidativo y los procesos que se activan para evitar la lisis bacteriana.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abana, C. M., Brannon, J. R., Ebbott, R. A., Dunigan, T. L., Guckes, K R., Fuseini, H., Hadjifrangiskou, M. (2017). *Characterization of blue light irradiation effects on pathogenic and nonpathogenic Escherichia coli*. *Microbiologyopen*, 6(4), e00466.

Amin, R. M., Bhayana, B., Hamblin, M. R., & Dai, T. (2016). *Antimicrobial blue light inactivation of Pseudomonas aeruginosa by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies*. *Lasers Surg Med*, 48(5), 562–568.

Andrei S, Valeanu L, Chirvasuta R, Stefan MG. (2018) *New FDA approved antibacterial drugs: 2015-2017*. *Discoveries*. 4; 6(1): e81

Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). *Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis*. *Lancet Glob. Health*, 399(10325), 629–655.

Araque M, Nieves B, Lauretti L, Rossolini GM. (2000). *Molecular basis of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in nosocomial isolates of Klebsiella pneumoniae from Mérida, Venezuela*. Int. J. Agents Antimicrob; 15: 37-42.

Araque M. (2018). *Resistencia antimicrobiana. De la preocupación a la ocupación. Enfoque “Una Salud”*. Bol Acad Nac Med; 119 (10): 16-24

Basak, S., & Jiang, R. (2012). *Enhancing E. coli Tolerance towards Oxidative Stress via Engineering Its Global Regulator cAMP Receptor Protein (CRP)*. PLoS One, 7(12), e51179.

Bauer R, Hoenes K, Meurle T, Hessling M, Spellerberg B. (2021). *The effects of violet and blue light irradiation on ESKAPE pathogens and human cells in presence of cell culture media*. Sci Rep;11(1):24473.

Breijyeh, Z., Jubeh, B., y Karaman, R. (2020). *Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It*. Molecules, 25(6), 1340.

Cabral J, Rodriguez AG, (2019) *Blue Light Disinfection in Hospital Infection Control: Advantages, Drawbacks, and Pitfalls*. Antibiotics. 8, 58; doi:10.3390/antibiotics8020058.

Cardenas J, Castillo O, De Cámara C, González V. (2018) *Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales*. Bol. Venez. Infectol; 29 (1): 11-19

Collins, T. L., Markus, E. A., Hassett, D. J., & Robinson, J. B. (2010). *The effect of a cationic porphyrin on Pseudomonas aeruginosa biofilms*. Curr Microbiol, 61(5), 411–416.

Dai, T., Gupta, A., Huang, Y. Y., Yin, R., Murray, C. K., Vrahas, M. S., Sherwood, M. E., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2013). *Blue light rescues mice from potentially fatal Pseudomonas aeruginosa burn infection: efficacy, safety, and mechanism of action*. Antimicrob Agents Chemother, 57(3), 1238–1245.

Dos Anjos C, Sabino CP, Sellera FP, Esposito F, Pogliani FC, Lincopan N (2020) *Hypervirulent and hypermucoviscous strains of Klebsiella pneumoniae challenged by antimicrobial strategies using visible light*, Int J Antimicrob Agents.

Dos Anjos Ca, Sabino CP, Bueris V, Fernandes MR, Pogliani FC, Lincopan N, Selleraa FP. (2019). *Antimicrobial blue light inactivation of international clones of multidrugresistant Escherichia coli ST10, ST131 and ST648*. Photodiagnosis Photodyn Ther. 27, 51–53.

Dos Anjos, C., Sellera, F. P., Ribeiro, M. S., Baptista, M. S., Pogliani, F. C., Lincopan, N., & Sabino, C. P. (2020). *Antimicrobial blue light and photodynamic therapy inhibit clinically relevant  $\beta$ -lactamases with extended-spectrum (ESBL) and carbapenemase activity*. Photodiagnosis Photodyn Ther, 32.

Fariñas, M. C., y Martínez-Martínez, L. (2013). *Infecciones causadas por bacterias gramnegativas multirresistentes: enterobacterias, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii y otros bacilos gramnegativos no fermentadores*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 31(6), 402–409.

Fernandez, L., y Hancock, R. E. W. (2012). *Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance*. CLIN. MICROBIOL. REV, 25(4), 661–681.

- Fila, G., Kawiak, A., & Grinholc, M. S. (2017). *Blue light treatment of Pseudomonas aeruginosa: Strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors*. *Virulence*, 8(6), 938–958.
- Fila, G., Krychowiak, M., Rychlowski, M., Bielawski, K. P., & Grinholc, M. (2018). *Antimicrobial blue light photoinactivation of Pseudomonas aeruginosa: Quorum sensing signaling molecules, biofilm formation and pathogenicity*. *J Biophotonics*, e201800079.
- Flores-Carrero, A., Labrador, I., Paniz-Mondolfi, A., Peaper, D. R., Towle, D., & Araque, M. (2016). *Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacter ludwigii co-harboring CTX-M-8, SHV-12 and TEM-15 in a neonatal intensive care unit in Venezuela*. *J. Glob. Antimicrob. Resist*, 7, 114–118.
- Gestal, Monica y Villacís, José. (2014). *Superbugs, Ecuador y el futuro*. *Revista Facultad de Ciencias Médicas*, 17, 56-61.
- González, F., & Araque, M. (2013). *Association of Transferable Quinolone Resistance Determinant qnrB19 with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Salmonella Gibe and Salmonella Heidelberg in Venezuela*. *Int. J. Microbiol.*
- Guevara-Agudelo, F. A., Muñoz, L. C., Navarrette, J, Salazar, LM, Pinilla, G (2021). *Innovaciones en la terapia antimicrobiana*. *Nova*, 8; 34: 9-25.
- Gwynne, P. J., y Gallagher, M. P. (2018). *Light as a Broad-Spectrum Antimicrobial*. *Front. Microbiol.* 9. 119
- Hadi, J., Wu, S., Soni, A., Gardner, A., & Brightwell, G. (2021). *Genetic Factors Affect the Survival and Behaviors of Selected Bacteria during Antimicrobial Blue Light Treatment*. *Int J Mol Sci*, 22(19), 10452. MDPI AG.
- Halstead,FD, Thwaite,JE, Burt,R,Laws TM,Raguse M, Moeller R, Webber MA. (2016) *Antibacterial activity of blue light against nosocomial wound pathogens growing planktonically and as mature biofilms*. *Appl Environ Microbiol.* 82:4006 –4016.
- Hou W, Shi G, Wu S, Mo J, Shen L, Zhang X and Zhu Y (2022) *Application of fullerenes as photosensitizers for antimicrobial photodynamic inactivation: A review*. *Front. Microbiol.* 13: 957698.
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). *Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes*. *Rev. Panam. Salud Publica*, 43, e65.
- Kleinpenning M, Tim Smits, Marjolein H. A. Frunt, Piet E. J. van Erp, Peter C. M. van de Kerkhof, Rianne M. J. P. Gerritsen. (2010). *Clinical and histological effects of blue light on normal skin*. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*, (26), 16-21.
- Labrador, I., y Araque, M. (2014). *First Description of KPC-2-Producing Klebsiella oxytoca Isolated from a Pediatric Patient with Nosocomial Pneumonia in Venezuela*. *Case Rep. Infect. Dis*, 2014, 1–4.

Leanse L., Harrington, O., Fang, Y., Imran Ahmed, Xueping, S., Tianhong D. (2018). *Evaluating the Potential for Resistance Development to Antimicrobial Blue Light (at 405 nm) in Gram-Negative Bacteria: in vitro and in vivo Studies*. *Front. Microbiol.*, 9, 1-7.

León-Buitimea A, Garza-Cárdenas CR, Garza-Cervantes JA, Lerma-Escalera JA and Morones-Ramírez JR (2020) *The demand for new antibiotics: Antimicrobial peptides, nanoparticles, and combinatorial therapies as future strategies in antibacterial agent design*. *Front. Microbiol.* 11:1669.

Llor, C., y Bjerrum, L. (2014). *Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem*. *Ther. Adv. Drug Saf.* 5(6), 229–241.

Maclean M, K. McKenzie, J.G. Anderson, G. Gettinby, S.J. MacGregor. (2014). *405 nm light technology for the inactivation of pathogens and its potential role for environmental disinfection and infection control*. *J. Hosp. Infect.*, 88, 1-11.

Mih, N., Monk, J. M., Fang, X., Catoi, E., Heckmann, D., Yang, L., & Palsson, B. O. (2020). *Adaptations of Escherichia coli strains to oxidative stress are reflected in properties of their structural proteomes*. *BMC Bioinformatics*, 21(1).

Munita JM, Arias CA. 2016. *Mechanisms of antibiotic resistance*. *Microbiol. Spectrum.* (2): 481-511.  
Nakonieczna J, Wozniak A, Pieranski M, Rapacka-Zdonczyk A, Ogonowska P, Grinholc M. (2019). *Photoinactivation of ESKAPE pathogens: overview of novel therapeutic strategy*. *FutureMed. Chem.* 11(5), 443–461

Otaiza F, Orsini M, Pohlez M. *Organización Panamericana de la Salud (OPS). Prevención y control de infecciones asociadas a la atención de la salud. Recomendaciones Básicas. Washington, D.C.: OPS: 2017*

Pérez LH, Zurita IM, Pérez N, Patiño N, Calvimonte OR. (2010). *Infecciones Intrahospitalarias: Agentes, Manejo Actual y Prevención*. *Rev Cient Cienc Méd*, 13: 90-94.

Pintado de Santiago P, Pintado King A. (2019). *Nuevos antibióticos: un reto a las infecciones resistentes*. *MPG Journal*; 2; 43

Prestinaci, F., Pezzotti, P., y Pantosti, A. (2015). *Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon*. *Pathog. Glob. Health*, 109(7), 309–318.

Quijada-Martínez P, Flores-Carrero A, Labrador I, Millán Y, Araque M. (2017). *Molecular characterization of multidrug-resistant Gram-negative bacilli producing catheter-associated urinary tract infections in internal medicine services of a Venezuelan University Hospital*. *J. Infect. Dis.*; 4(1): id1030.

Rapacka-Zdonczyk, A., Wozniak, A., Kruszewska, B., Waleron, K., & Grinholc, M. (2021). *Can Gram-Negative Bacteria Develop Resistance to Antimicrobial Blue Light Treatment?* *Int J Mol Sci*, 22(21), 11579. MDPI AG.

Robres P, C. Aspiroz, A. Rezusta, Y. Gilaberte. (2015). *Utilidad de la terapia fotodinámica en el manejo de la onicomiosis*. *Actas Dermosifiliogr.*, 106(10), 795-805.

- Rodríguez-Rojas, A., Kim, J. J., Johnston, P., Makarova, O., Eravci, M., Weise, C., Rolff, J. (2020). *Non-lethal exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> boosts bacterial survival and evolvability against oxidative stress*. PLoS Genet, 16(3).
- Sailer, R., Strauss, W. S. L., König, K., Rück, A., & Steiner, R. (1997). *Correlation between porphyrin biosynthesis and photodynamic inactivation of Pseudomonas aeruginosa after incubation with 5-aminolaevulinic amid*. J Photochem Photobiol B, 39(3), 236–242.
- Serrano-Uribe R, Flores-Carrero A, Labrador I, Araque M. (2016) *Epidemiología y caracterización molecular de bacilos Gram negativos multirresistentes productores de sepsis intrahospitalaria en pacientes adultos*. Avanz Biomed; 5(1): 26-37.
- Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., Carmeli, Y. (2018). *Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis*. Lancet Infect. Dis., 18(3), 318–327.
- Tafur, J. D., Torres, J. A., Villegas, M. V. (2008). *Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas*. CIDEIM, 12 (3), 222-233.
- Thombre R, Jangid K, Shukla R Dutta NK (2019) Editorial: *Alternative Therapeutics against antimicrobial-resistant pathogens*. Front. Microbiol. 10:2173.
- Tianhong Dai, Asheesh Gupta, Ying-Ying Huang, Margaret E. Sherwood, Clinton K. Murray, FACP, FIDSA, Mark S. Vrahas, Tammy Kielian, and Michael R. Hamblin, MD. (2013). *Blue Light Eliminates Community-Acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Infected Mouse Skin Abrasions*. Photomed. Laser Surg., 31, 531–538.
- Tomb, R. M., White, T. A., Coia, J. E., Anderson, J. G., MacGregor, S. J., & Maclean, M. (2018). *Review of the Comparative Susceptibility of Microbial Species to Photoinactivation Using 380-480 nm Violet-Blue Light*. Photochem. Photobiol. 94(3), 445–458.
- Varela Y, Abreu S, Millán B, Araque M. (2014). *Klebsiella pneumoniae y Escherichia coli productoras de beta-lactamasas de espectro extendido, aisladas en pacientes con infección asociada a los cuidados de la salud en un hospital universitario*. Enf Infec Microbiol, 34 (3), 92-99.
- Varela, Yasmin, Millán, Beatriz, & Araque, María. (2017). *Diversidad genética de cepas extraintestinales de Escherichia coli productoras de las betalactamasas TEM, SHV y CTX-M asociadas a la atención en salud*. Biomédica, 37(2), 209-217.
- Wang, Y., Harrington, O. D., Wang, Y., Murray, C. K., Hamblin, M. R., & Dai, T. (2017). *In Vivo Investigation of Antimicrobial Blue Light Therapy for Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii Burn Infections Using Bioluminescence Imaging*. Journal of visualized experiments: JoVE, (122), 54997.
- World Health Organization (WHO). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics*. Geneva: WHO, 2017. [Consulta: 2018 oct 13]. Disponible en: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/>.
- World Health Organization (WHO). *La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial*. Marzo 2021. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>

Wozniak, A., Rapacka-Zdonczyk, A., Mutters, N. T., & Grinholc, M. (2019). *Antimicrobials Are a Photodynamic Inactivation Adjuvant for the Eradication of Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*, 10, 229.

Zhang, Y., Zhu, Y., Gupta, A., Huang, Y., Murray, C. K., Vrahas, M. S., Sherwood, M. E., Baer, D. G., Hamblin, M. R., & Dai, T. (2014). *Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant Acinetobacter baumannii infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis and treatment of combat-related wound infections*. *J Infect Dis*, 209(12), 1963–1971.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)