

UNIVERZITETNI DOKTORSKI ŠTUDIJ BIOMEDICINA

SEMINAR pri predmetu Temeljna medicinska mikrobiologija

Petra Raspor Lainšček, dr. vet. med

BAKTERIOCINI – IZVEDLJIVA ALTERNATIVA ANTIBIOTIKOM?

MODERATOR SEMINARJA

Prof. Dr. Srečko Koren

LJUBLJANA, 11.3.2013

Izvleček

Rezistenca mikroorganizmov proti antibiotikom je hitro naraščajoč problem v zdravstvu. Bakterije so namreč izredno pametni in hitro prilagodljivi organizmi, nekatere imenujemo tudi superbakterije, saj so razvile rezistenco takorekoč proti vsem antibiotikom. Zato se nenehno iščejo novi načini, kako bi se jih prelisičilo. Ena izmed perspektivnih alternativ so bakteriocini, ki so pravzaprav del naravnega obrambnega mehanizma bakterij. Že dolga leta se jih proučuje v laboratorijih, izvedenih pa je bilo tudi že nekaj kliničnih poskusov.

V seminarski nalogi bom predstavila lastnosti bakteriocinov, njihov način delovanja in nekaj rezultatov raziskovanj, njihovo dosedanjo uporabo ter načrte za prihodnost.

Uvod

Z odkritjem penicilina leta 1928 se je začelo novo obdobje v medicini. Bolezni, ki so do takrat veljale za neozdravljive, so postale obvladljive. Ravno zato velja odkritje antibiotikov za enega največjih dosežkov v 20. stoletju. Žal so se z leti pokazale pomanjkljivosti, zaradi pogoste in nepravilne uporabe so mikroorganizmi razvili rezistenco. Problem je nastopil, ker so ti mikroorganizmi začeli prenašati gene rezistence na druge mikroorganizme in pojavili so se rezistentni sevi, ki v zdravstvu povzročajo mnogo preglavic (1). To je raziskovalce prisililo v razvijanje vedno novih antibiotikov, vendar pa počasi prihaja do pomanjkanja novih družin antibiotikov, ki bi jih lahko razvijali, deloma tudi zaradi dragih stroškov razvijanja (2). Problematična je tudi pretirana uporaba širokospektralnih antibiotikov. Res je, da so privlačni pri zdravljenju bolezni zaradi svojega širokega spektra delovanja, a je njihova uporaba lahko izredno nevarna. Delujejo namreč ne samo na patogene mikroorganizme, ki se jih želimo znebiti, ampak tudi na tiste »dobre« mikroorganizme v mikroflori intestinalnega trakta in tako porušijo ravnotežje normalne človeške mikroflore. Zeankrat se problem širjenja rezistentnih sevov poskuša zajezi z zmanjšano uporabo antibiotikov. To pomeni, da se jih naj ne bi predpisovalo kar vsepovprek, ampak samo kadar gre res za bakterijsko obolenje. Hkrati pa se spodbuja predpisovanje različnih antibiotikov in ne zmeraj enih in istih, saj s tem ustvarjamo idealne pogoje za razvoj odpornosti. Prav tako je pomemben element osveščanja javnosti o pravilnem jemanju antibiotikov, ker veliko ljudi s terapijo preneha takoj, ko se stanje izboljša (3). Zaskrbljujoč je tudi sum povezave jemanja širokospektralnih antibiotikov in večjega pojava atopij in avtoimunih bolezni.

Zaradi vseh naštetih problemov se je pojavila potreba po novih protimikrobnih snoveh. Alternative, ki so bile do sedaj preučevane so: snovi, ki izhajajo iz rastlin, bakteriofagi, lizini fagov, terapevtiki bazirani na RNA, probiotiki in snovi na katere se bom v seminarski nalogi osredotočila-antimikrobni peptidi, katerih podkupina je znana pod imenom bakteriocini. Gre za majhne peptide, ki jih sintetizirajo ribosomi bakterij in delujejo proti drugim mikroorganizmom (2). Od

antibiotikov jih loči spekter delovanja. Bakteriocini namreč delujejo le na seve, ki so sorodni bakterijskemu sevu, ki jih proizvajajo (1,3).

Bakteriocini so v primerjavi z antibiotiki tako zelo privlačni predvsem zaradi naslednjih lastnosti: imajo tako ozko kot široko usmerjeno delovanje, njihovi mehanizmi delovanja so drugačni kot pri antibiotikih, imajo veliko moč delovanja, majhno toksičnost, probiotiki jih lahko proizvajajo *in situ* in lahko se jih proizvajajo z genskim inženiringom (2).

Ker je ravno rezistenca tisti problem zaradi katerega so nastale potrebe po novih, boljših protimikrobnih snoveh, se seveda tudi tu pojavlja vprašanje, ali lahko z gotovostjo rečemo, da čez nekaj let ne bo situacija pri bakteriocinih enaka. Seveda obstaja možnost pojava rezistence. Vendar se raziskovalci zanašajo predvsem na dobro razumevanje mehanizmov delovanja bakteriocinov in verjamejo, da s takim znanjem rezistenco lahko vsaj minimizirajo, če ne popolnoma preprečijo (2).

Klasifikacija bakteriocinov

Obstaja več načinov klasifikacije. Bakteriocine laktobacilov delimo na 2 skupini, razred I – peptidi, ki po translaciji prestanejo še precejšnje modifikacije in razred II – nemodificirani peptidi. Ta sistem klasifikacije predlaga tudi, da bi bili večji peptidi izločeni iz skupine bakteriocinov. Antimikrobne snovi, ki jih sintetizirajo ribosomi po Gramu negativnih bakterij se delijo na majhne peptide, mikrocine in večje, kolicine.

Razred I, torej modificirani bakteriocini, se dalje deli v naslednje podskupine: lantibiotiki, linaridini, proteuzini, azeolin vsebujoči peptidi, cianobaktini, tiopeptidi, laso peptidi, sktibiotiki, botromicini, glikocini in modificirani mikrocini, ki ne spadajo v nobeno drugo podskupino (2).

Moč delovanja *in vitro*

Moč delovanja bakteriocinov proti patogenim bakterijam se razlikuje med podrazredi pa tudi znotraj njih. Na splošno velja, da bakteriocini razreda I delujejo predvsem proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Lantibiotiki dobro

delujejo proti nekaterim po Gramu pozitivnim mikroorganizmom, ki v zdravstvu povzročajo precej težav: *Streptococcus pneumoniae*, mikroorganizmi iz rodu *Staphylococcus*, metilicilin rezistentni *Staphylococcus aureus*, vankomicin rezistentni *Enterococcus*, mikroorganizmi iz rodu *Mycobacterium* in *Clostridium difficile* (4). Enak spekter delovanja imajo tiopeptidi, težavo povzroča le njihova slaba topnost.

Obstaja tudi kar nekaj nemodificiranih bakteriocinov (razred II), ki delujejo proti po Gramu pozitivnim bakterijam kot je *Listeria monocytogenes*.

Čeprav obstajajo bakteriocini, ki delujejo proti po Gramu negativnim bakterijam, velja splošno dejstvo, da bakteriocini kažejo manj potenciala kot kemoterapevtiki pri infekcijah s po Gramu negativnimi bakterijami. Obstajajo izjeme, nekateri mikrocin delujejo dobro proti bakterijam iz rodu *Escherichia*, *Citrobacter*, *Clebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* in *Pseudomonas* (2).

Zanimivo je, da nekateri bakteriocini, ki jih proizvajajo po Gramu pozitivne bakterije (tak je subtilozin A, ki ga izloča *Bacillus subtilis*) delujejo zelo dobro proti po Gramu negativnim bakterijam. Kot sem že na začetku omenila je po navadi tako, da bakteriocini delujejo na seve bakterij, ki so sorodni bakterijam, ki jih izločajo (5).

In vitro raziskave so pokazale, da se včasih aktivnost močno izboljša v kombinacijah z drugimi protimikrobnimi snovmi. Nizin naprimer zelo sinergistično deluje z nekaterimi drugimi antibiotiki v boju proti MRSA in VRE (2).

Moč delovanja *in vivo*

Seveda se novi projekti vedno začnejo v laboratoriju, a dobre rezultate je treba doseči tudi v kliničnih raziskavah. Izmed vseh bakteriocinov so bili *in vivo* najbolj proučevani lantibiotiki in tiopeptidi. Del raziskav se dela tudi na tiopeptidih in razredu II bakteriocinov.

Naj na kratko omenim samo rezultate parih študij. Ugotovili so, da lantibiotiki zelo dobro zavirajo rast stafilokokov in enterokokov na katetrih. Nizin pa je do 16krat bolj učinkovit proti bakteriji *Streptococcus pneumoniae* kot vankomicin.

Nizin F, naravna različica nizina, dobro kontrolira rast bakterije *S. Aureus*, če ga apliciramo v kostni cement, pri aplikaciji intranazalno zavira razmnoževanje v respiratornem traktu pri miših in delno zavira rast v intraperitonealni votlini. ED50 določenih bakteriocinov je enaka ali celo nižja kot pri vankomicinu (2).

Majhna toksičnost

Ena izmed pomembnih lastnosti večine bakteriocinov je njihova majhna toksičnost pri peroralnem dajanju. Dejstvo je, da bakteriocine, ki jih proizvajajo laktobacili, že vrsto let uživamo s fermentirano hrano. Tak bakteriocin je nizin - najbolj uporabljen konzervans. Nizin in nekateri drugi lantibiotiki so bili iz aspekta toksičnosti že mnogokrat proučevani in njihova nizka toksičnost je bila tudi dokazana.

Obstaja sicer izjema, citolizin, ki ga izloča bakterija rodu *Enterococcus* (prav tako lantibiotik). Citolizin je citotoksičen, a je edini v skupini lantibiotikov. Cianobaktini po drugi strani imajo zelo slabe antibakterijske lastnosti, citotoksičnost pa je pogosta.

Nekateri bakteriocini razreda II so pokazali majhno toksičnost, spet drugi nobene, kljub temu, da so jih preizkušali v stokrat večjih dozah kot je potrebno za protimikrobno delovanje (2).

Široko in ozkospektralni bakteriocini

Obstaja mnogo bakteriocinov, ki imajo širok spekter delovanja, kar je seveda privlačna lastnost, saj z njimi lahko delujemo na okužbe neznane etiologije. Vendar pa je kot pri antibiotikih, uporaba lahko nevarna. Širokospektralne protimikrobne snovi sicer uničijo tisti mikroorganizem, ki povzroča bolezen, a hkrati uničijo tudi dobre mikroorganizme, tiste, ki sestavljajo mikrofloro črevesja in skrbijo za normalno delovanje le-tega in s tem organizma. Tipičen primer takšnega delovanja je diareja povzročena s strani bakterije *Clostridium difficile*. Širokospektralni antibiotiki porušijo naravno mikrofloro črevesja, kar klostridiju omogoči nemoteno razmnoževanje. Nastalo situacijo seveda zdravimo z antibiotiki in lahko nastane začaran krog. Problematika, ki jo predstavlja C.

difficile je pripeljala do iskanja novih zdravil in tako so odkrili bakteriocin turicin CD, ki ga izloča *Bacillus thuringensis*, ki deluje izključno na *C. Difficile*. Njegovo protimikrobno delovanje je primerljivo z vankomicinom in metronidazolom, hkrati pa skoraj ne spremeni naravne črevesne mikroflore.

Uspeh, ki ga je požel turicin CD je vzpodbudil raziskovalce v proučevanje bakteriocinov, ki bi usmerjeno zdravili tudi druge bolezni (npr. vaginoze in gastrointestinalne motnje povzročene z drugimi patogenimi bakterijami). V poštev pridejo bakteriocini mnogih po Gramu negativnih bakterij, ki imajo zelo ozek spekter delovanja. A vseeno je treba biti pozoren, da ta spekter ni preozek, saj bi bila ta skrajnost ravno tako neuporabna (2).

Bakteriocini, ki jih proizvajajo probiotiki

Lastnost, ki lahko zelo pripomore k učinkovitosti bakteriocinov je ta, da nekateri izmed njih lahko nastajajo kar na mestu infekcije, proizvajajo jih probiotiki. Nekatero bakterije normalne mikroflore črevesja namreč za kolonizacijo črevesja uporabljajo svoj naravni obrambni mehanizem in izločajo bakteriocine, ki jim pomagajo premagati druge bakterije in tako uveljavijo svoje mesto v črevesju. To so dokazali s poskusom, kjer so miškam aplicirali bakterijo, ki proizvaja MccV in enak sev te bakterije, ki ne proizvaja bakteriocina. Sev, ki ne proizvaja bakteriocina ni bil sposoben kolonizacije črevesja in se je izločil skozi debelo črevo.

Kako bi laktobacili z izločanjem bakteriocinov pripomogli k zdravljenju določenih bolezni, so ugotavljali že v mnogih raziskavah. Naj naštejemo samo nekaj zanimivih izsledkov. *Lactobacillus casei* zavira rast *L. monocytogenes* in enterohemoragične *E. coli* pri miših.

Lactobacillus johnsonii pri otrocih pomaga nadzirati kolonizacijo *Helicobactera pylori*.

Sev *Pedilococcus adilactici*, ki proizvaja bakteriocin je bil uspešnejši pri zaviranju VRE kot sev, ki ga ne proizvaja.

V prihodnosti, ko bo sekveniranje DNA doseglo še višji nivo in bo možno še natančneje določiti sestavo človeške črevesne makrobiote, bo lastnost probiotikov, da proizvajajo bakteriocine *in situ*, postala še pomembnejša. Že danes je jasno, kako pomembna je uravnotežena mikroflora, nekatere raziskave so celo dokazale povezavo med črevesnimi mikroorganizmi in debelostjo ter diabetesom. Nedolgo nazaj je bila opravljena študija na miškah, katerim so alpicirali *L. salivarius*, ki je izločal bakteriocin in takšnega, ki ga ni. Miške so hranili z zelo visoko kalorično hrano. Opazna je bila razlika v teži, ki pa je sčasoma izginila. V prihodnosti želijo ugotoviti pravilno kombinacijo probiotikov, ki bi težo nadzirala dlje.

Pomemben doprinos v zdravstvu bi lahko dosegli z vnosom probiotikov, ki bi izločali točno določene bakteriocine, ki bi delovali na bakterije za katere sumimo, da povzročajo določene bolezni. S tem bi dokazali vzrok bolezni (2).

Bioinženiring

Ker so bakteriocini peptidi, jih je lažje izdelati s pomočjo bioinženiringa kot klasične antibiotike. Inženiring bakteriocidov lahko izpeljemo z manipulacijo gena bakteriocina, z izkoriščanjem biosintetičnih encimov za produkcijo peptidov v *in vitro* pogojih in delno ali pa popolno kemično sintezo antimikrobov. Ravno inženiring je imel veliko vlogo pri odkrivanju in razumevanju osnov mehanizmov delovanja bakteriocinov in vloge njihove strukture pri tem. Inženiring bakteriocinov pa je zanimiv tudi z vidika uporabnosti v klinični praksi, saj se z njegovo pomočjo lahko nekaterim peptidom izboljša njihovo aktivnost in stabilnost. Nekaj primerov: derivat lantibiotika nizina ima večjo specifično aktivnost proti Gram negativnim in tudi proti Gram pozitivnim bakterijam, sintetična oblika laktocina S je bolj stabilna kot naravni soimenjak, hibrid med nizinom in vankomicinom pa naprimer deluje na VRE. Naravni tiopeptidi se slabo topijo v vodi, pri polysintetičnih oblikah pa je ta lastnost izboljšana (2).

Mehanizmi delovanja

Mehanizmi delovanja bakteriocinov se precej razlikujejo od delovanja antibiotikov. V grobem jih ločimo na bakteriocine, ki delujejo na celično steno in tiste, ki delujejo znotraj celice in motijo ekspresijo genov in nastajanje peptidov.

Nizin in še nekaj drugih lantibiotikov pa tudi nekateri bakteriocini razreda II se vežejo na lipid II celične stene in s tem prekinajo sintezo polisaharidov iz katerih je sestavljena celična stena. Lipid II je namreč ključnega pomena pri sintezi peptidoglikanov. Je pa tudi tarča delovanja antibiotika vankomicina. Vendar se bakteriocin veže na lipid II na drugem delu celične stene in tako pusti vankomicinu prosto mesto vezave. Če gre za bakterijo, ki je rezistentna na vankomicin, sinergija bakteriocina in antibiotika celico ubije, medtem, ko sam antibiotik tega ni zmožen storiti (6). Nekateri lantibiotiki uporabljajo lipid II samo kot vezavno mesto, nakar tvorijo v membrani pore, membranski potencial se poruši in celica umre. Tudi nekateri bakteriocini razreda IIa in II s tvorjenjem por v membrani celice ubijejo ali jih poškodujejo.

Manjša podskupina lantibiotikov na celično membrano veže fosfatidiletanolamin in s tem inaktivira encim fosfolipaza 2a.

Drugi način mehanizma delovanja bakteriocinov je inhibicija ekspresije genov in sinteze proteinov. S tem, ko motijo metabolizem DNA, RNA ali proteinov, celico ubijejo. Kot primer: MccB17 vstopi skozi membrano skozi porin OmpF in skozi notranjo membrano s pomočjo notranjega peptidnega transporterja. V notranjosti celice bakteriocin inhibira dodatno zvijanje DNA s pomočjo giraze in tako preprečuje DNA replikacijo.

MccJ25 se veže na sideroforni receptor FhuA na zunanji membrani in s pomočjo točno določenega transporterja preide v celico. Tam inhibira transkripcijo z blokiranjem drugega kanala RNA polimeraze.

MccC7-C51 v celici *E. coli* citoplazemska aminopeptidaza pretvori v modificiran aspartil adenilat, ki nato inhibira aspartil tRNA sintentitazo in tako blokira mRNA sintezo.

Večina tiopeptidov cilja na bakterijski ribosom, vežejo se na 23s rRNA na 50s podenoti ribosoma. Ostali se vežejo na elongacijski faktor in inhibirajo sintezo proteinov. Botromicini blokirajo aminoacetil tRNA na 50s podenoti ribosoma (2).

Rezistenca

Zaradi slabih izkušenj pojavljanja rezistence pri antibiotikih se tudi v zvezi z bakteriocini pojavlja vprašanje možnega nastanka rezistentnih sevov bakterij. Ker je bila do sedaj njihova uporaba v kliničnem okolju zelo omejena, se lahko navezujemo samo na podatke pridobljene med raziskovanjem v laboratoriju.

Tako so bili odkriti potencialni mehanizmi rezistence tistih bakteriocinov, ki delujejo na celično steno. Naprimer, rezistenca na lantibiotike katerih tarča je lipid II celične stene, bi se lahko pojavila zaradi zmanjšane dostopa do celičnega receptorja, na katerega se bakteriocin veže. Druga možnost je pojav rezistence zaradi drugih sprememb v sestavi celične stene, naprimer izgube določenih receptorjev celične stene, ki so pomembni za pritrditev bakteriocinov. V laboratoriju so ugotovili, da do takšnega problema prihaja pri nekaterih bakteriocinih razreda II, katerih tarča je Man PTS celični receptor. Receptor se na celici sicer izraža normalno, kakšen pa je mehanizem rezistence še ni znano.

Tudi bakteriocini z drugim načinom delovanja, kjer je tarča znotraj celice, niso popolnoma varni. Odkrili so, da z bi z mutacijami genov, ki kodirajo tarčo bakteriocinov, prišlo do nastanka rezistence. Naprimer, celice postanejo odporne proti MccJ25 zaradi mutacij v podenoti RNA polimeraze, proti MccB17 zaradi točkovnih mutacij DNA giraze kodirajočega gena in proti tiopeptidom, ki delujejo na ribosome zaradi mutacij genov, ki kodirajo določen ribosomalni peptid (2).

Obstaja še ena skrb, ki bi lahko preprečila vsesplošno uporabo bakteriocinov v klinični praksi. To je imunska mimika. Obstajajo namreč sevi bakterij, ki ne proizvajajo bakteriocinov, imajo pa gene za imunost proti bakteriocinom. Prav tako pa so bakterije lahko rezistentne na bakteriocine drugih sevov bakterij, če

same proizvajajo sorodne bakteriocine. Tak primer so nekatere bakterije iz rodu *Staphylococcus*, *Bacillus* in *Enterococcus* (7).

Proteolitična cepitev bakteriocinov je še ena od možnih poti prek katere bi se rezistenca lahko razvila. Tak način delovanja so opazili pri laktokokih, ki so rezistentni na lizin. Rešitev, ki bi s ciklizacijo peptide naredila odporne na peptidaze, je že v proučevanju (8).

Vse ugotovitve, ki so jih raziskovalci pridobili skozi leta v laboratoriju, nas opominjajo, da moramo biti še posebej pazljivi pri razvijanju novih antimikrobnih substanc. Nekateri bakteriocini povzročijo pojav majhne rezistence in tako vseeno pridejo v poštev za uporabo v klinični praksi kar v naravni obliki. Pri tistih, kjer bi bila rezistenca prevelika pa nam je v veliko pomoč vse pridobljeno znanje o mehanizmi nastanka rezistence, saj lahko pripomore k preprečevanju same rezistence. Ena izmed rešitev je tudi nadaljna derivatizacija bakteriocinov s katero bi se ustvarilo snovi, ki bi se lahko vezale na bakterije tudi takrat, ko bi že prišlo do mutacij v genih, ki kodirajo celične receptorje. Ali morda z modifikacijo peptidov, ki bi zmanjšali občutljivost na proteaze. V poštev pride tudi zdravljenje v kombinaciji kakšnega drugega bakteriocina oz. antibiotika, katerega mehanizem delovanja je popolnoma drugačen (2).

Dosedanja uporaba

O bakteriocinih vemo marsikaj v laboratorijskih razmerah, zelo malo pa o dogajanju *in vivo*. V praksi je bil do sedaj poudarek na zdravljenju živali. Humana medicina temu sledi oz. bo sledila.. Obstaja nekaj komercialnih pripravkov za uporabo v veterinarski medicini (2). Mazilo za zdravljenje otitisa externa in dermatitisa pri mačkah in psih vsebuje poleg drugih antimikrobnih snovi tudi tiosstrepton, ki je bakteriocin in ga izloča bakterija iz rodu *Streptomyces* (9, 10). Kot preventiva za zdravljenje mastitisa pri kravah molznicah se uporabljajo robčki, ki vsebujejo nizin (2).

Zaključek

Glede na težave, ki se pojavljajo pri uporabi antibiotikov, je vprašanje, zakaj bakteriocini še niso na trgu, skoraj neizogibno. Bakteriocini imajo namreč kar nekaj pozitivnih lastnosti, ki nakazujejo na njihovo učinkovito uporabo. Verjetno je eden izmed poglavitnih dejavnikov investiranje, saj bi bilo v proces potrebno vložiti velika finančna sredstva. Vendar pa je opaziti določene premike, razvijajo se bakteriocini, ki bi bili uporabni tudi na področju prakse humane medicine. Pojavljajo se nekateri sintetični in naravni tiopeptidi, ter določeni probiotični sevi, ki izločajo bakteriocine. Za večino teh se sicer ne ve natančno katere bakteriocine izločajo in kakšen je njihov spekter, so pa na tržišču tudi že takšni pri katerih je to znano (eden izmed takih se uporablja za ustno higieno).

Glede na potek dogodkov v zadnjih desetletjih in pomembna odkritja na tem področju, je verjetno le še vprašanje časa, kdaj jih bomo začeli uporabljati tudi v redni praksi. Pomembno je, da se dobro raziščejo mehanizmi delovanja in mehanizmi nastanka rezistence, s pomočjo katerih bomo resistenco lahko preprečevali. Obenem bo potrebno odkriti najbolj učinkovit način bioprocasa, ki bo dovoljeval hitro in množično produkcijo kakovostnih bakteriocinov in njihovo pridobivanje v čistih oblikah. Predvsem pa je nujno investiranje tudi v klinična prizkušanja, ki bi omogočila raziskovanje učinka *in vivo*, s čemer se bo odprla možnost realne uporabe posameznih učinkovitih bakteriocinov v klinični praksi (2).

Literatura

1. Nishie M, Nagao J, Sonomoto K. Antibacterial peptides »Bacteriocines«: An overview od their diverse characterictis and applications. Biocontrol Science 2012; 17: 1-16
2. Cotter P, Ross P, Hill C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? Nature reviews. Microbiology 2013; 11: 95-105
3. Riley M, Wertz J. Bacteriocins: evolution, ecology and application. Annual Reviews Of Microbiology 2002; 56: 117-37

4. Piper C, Cotter P D, Ross R P, Hill C. Discovery of medically significant lantibiotics. *Current drug discovery technologies* 2009; 6: 1–18
5. Shelburne C E, An F, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin D, Lantz M. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 297–300
6. Piper C, Draper L A, Cotter P D, Ross R P, Hill C. A comparison of the activities of lactacin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 64: 546–551
7. Draper L A, Grainger K, Deegan L, Cotter P, Hill C, Ross P. Cross. Immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147. *Molecular Microbiology* 2009; 71: 1043–1054
8. Rink R, Arkema-Meter A, Baudoin I *et al.* To protect peptide pharmaceuticals against peptidases. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2010; 61: 210-218
9. Wikipedia, The free encyclopedia. Thiostrepton. <http://en.wikipedia.org/wiki/Thiostrepton> (9.3.2013)
10. Novartis animal health. Panolog. www.ah.novartis.com/products/en/panolog_cat.shtml (9.3.2013)