

# Efecto del bloqueo de bombas de eflujo en el tratamiento antimicrobiano en cepas con multirresistencia tipo BLEE de origen clínico en Boyacá, Colombia

## Efflux pumps blockade in antimicrobial treatment of clinical multi-resistant ESBL type strain in Boyacá, Colombia

Maritza Angarita-Merchán<sup>1</sup> ; Giselle Di Filippo-Iriarte<sup>2</sup> ; Diana Patricia Mora-Moreno<sup>3</sup> ; Atilio Junior Ferrebuz-Cardozo<sup>4</sup> 

<sup>1</sup> Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Especialista en Administración y Gerencia de Sistemas de Calidad. Magíster en Sistemas Integrados de Gestión. Universidad de Boyacá. Tunja. Colombia. Correo electrónico: mangarita@uniboyaca.edu.co

<sup>2</sup> Bacterióloga. Especialista en Microbiología Clínica. Magíster en Microbiología Clínica. Universidad de Boyacá. Tunja. Colombia.

<sup>3</sup> Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Especialista en Microbiología Médica. Magíster en Ciencias Biológicas. ESE Hospital Universitario San Rafael de Tunja. Tunja. Colombia.

<sup>4</sup> Biólogo. Magíster en Ciencias Biológicas. Universidad de Boyacá. Tunja. Colombia.

Fecha de recibido: 21 de febrero de 2022 - Fecha de aceptado: 17 de enero de 2024

ISSN: 0121-0319 | eISSN: 1794-5240



### Resumen

**Introducción:** El aumento de bacterias resistentes a múltiples fármacos destaca la necesidad de mejorar las terapias antimicrobianas. Las bombas de eflujo, que reducen la concentración de antimicrobianos en las bacterias, son clave en la resistencia, mecanismos que disminuyen la concentración de antimicrobianos en las bacterias, contribuyendo a la resistencia. **Objetivo:** evaluar el efecto del inhibidor de bombas de eflujo *Phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide* sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos ceftazidima, clortetraciclina, ciprofloxacina, ceftriaxona, ampicilina y gentamicina en bacilos gram negativos con múltiples genes de BLEE aisladas. **Materiales y Métodos:** se realizó un estudio experimental con el propósito de analizar los aislamientos de bacilos gram negativos multirresistentes asociados a infecciones procedentes de una Institución prestadora de servicios de salud de Boyacá, para esto, a partir de 81 aislamientos bacterianos se detectaron genes de resistencia antibiótico en 70 cepas mediante reacción en cadena de la polimerasa convencional y secuenciación tipo Sanger. **Resultados:** en los 70 aislamientos analizados se evidenció la presencia de determinantes genéticos de resistencia a antibióticos betalactámicos como:  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV1}$ ,  $bla_{SHV2}$  y  $bla_{CTM-X}$  con predominancia del gen  $bla_{SHV}$ . **Conclusiones:** el ensayo de interacción mostró que en cepas multirresistentes, la terapia conjunta con inhibidores de bombas de expulsión puede ser una alternativa para el tratamiento, sin embargo, debido a la gran diversidad de las bombas de eflujo, se deben evaluar otras familias de inhibidores para identificar los que sean eficientes en un mayor número de cepas.

**Palabras clave:** Farmacorresistencia bacteriana. Bacterias Gramnegativas. Resistencia a Múltiples Medicamentos. Agente Antimicrobiano. Beta-Lactamasas. Genes MDR.

¿Cómo citar este artículo? Angarita-Merchán M, Filippo-Iriarte G, Mora-Moreno DP, Ferrebuz-Cardozo AJ. Efecto del bloqueo de bombas de eflujo en el tratamiento antimicrobiano en cepas con multirresistencia tipo BLEE de origen clínico en Boyacá, Colombia. MÉD.UIS. 2024;37(1):9-24. DOI: <https://doi.org/10.18273/revmed.v37n1-2024001>

## Abstract

**Introduction:** the rise of bacteria resistant to multiple drugs underscores the need to enhance antimicrobial therapies. Efflux pumps, which decrease the concentration of antimicrobials in bacteria, play a key role in resistance. **Objective:** The objective of this study is to evaluate the effect of the efflux pump inhibitor Phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide on bacterial resistance to antibiotics ceftazidime, chlortetracycline, ciprofloxacin, ceftriaxone, ampicillin, and gentamicin in gram-negative bacilli with multiple ESBL genes isolated. **Materials and Methods:** an experimental study was conducted to analyze multi-resistant gram-negative bacillus isolates associated with infections from a healthcare institution in Boyacá. From 81 bacterial isolates, antibiotic resistance genes were detected in 70 strains through conventional polymerase chain reaction and Sanger sequencing. **Results:** the analysis of 70 isolates revealed the presence of genetic determinants for beta-lactam antibiotic resistance such as  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV1}$ ,  $bla_{SHV2}$  y  $bla_{CTM-X}$ , with a predominance of the  $bla_{SHV}$  gene. **Conclusions:** the interaction assay showed that in multi-resistant strains, combination therapy with efflux pump inhibitors could be an alternative for treatment. However, due to the diverse nature of efflux pumps, other families of inhibitors should be evaluated to identify those effective across a larger number of strains.

**Keywords:** Drug resistance. Gram-Negative Bacteria. Multidrug Resistance. Anti-Infective Agents. Beta-Lactamases. Multidrug Efflux Pump Genes

---

## Introducción

Para el año 2019 la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el marco del seguimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), incluyó un nuevo indicador que permitiera el seguimiento de dos patógenos concretos como es *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), y *E. coli* resistente a cefalosporinas de tercera generación, para esta bacteria la resistencia reportada ese mismo año fue de 36 %; así mismo en el año 2021, la OMS reporta el incremento de la resistencia bacteriana frente a antibióticos habitualmente empleados en tratamiento de infecciones causadas por estos patógenos, destacando la resistencia a la ciprofloxacina entre el 8.4 % y 92.9 % en *Escherichia coli* (*E. coli*) y entre 4.1 % y el 79.4 % para *Klebsiella pneumoniae*, esta última es un patógeno importante por su capacidad de mortalidad e Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS)<sup>1</sup>.

Es por ello que la farmacorresistencia microbiana ha llevado a proponer diferentes líneas de contención de los patógenos Multi Drug Resistant (MDR), siendo una de ellas la realización de estudios que permitan la identificación microbiológica fenotípica y molecular de los diferentes mecanismos de resistencia expresados por los microorganismos de interés, vigilancia y control en el ámbito hospitalario<sup>2</sup>, estos estudios han permitido describir que la resistencia a los antibióticos y biocidas comparten algunas estrategias comunes al incorporar la participación de mecanismos adicionales a los genes de resistencia

clásicos, esto involucra una serie de genes que codifican para bombas de expulsión de fármacos, anteriormente relacionadas con resistencia a biocidas, presentes en muchas bacterias MDR<sup>3</sup>.

El aumento de la aparición de bacterias resistentes a múltiples fármacos ha acelerado la necesidad de mejorar las terapias con antimicrobianos, el estudio de nuevos antibióticos y una comprensión más profunda del mecanismo de resistencia a los medicamentos; las bombas de expulsión o también denominadas de “eflujo” han demostrado un papel relevante en la resistencia bacteriana intrínseca y extrínseca, esto gracias a la capacidad que le confiere a la bacteria para reducir la concentración del fármaco antimicrobiano dentro de la misma, así como la expulsión de estas sustancias al exterior; este mecanismo cuenta con una serie de proteínas de transporte presentes en la membrana y el periplasma bacteriano que permiten la eliminación de diferentes compuestos dentro de los cuáles se describe antimicrobianos, metales pesados tóxicos, detergentes, colorantes entre otros<sup>4</sup>, lo cual ha llevado inclusive a realizar estudios sobre los genes y proteínas involucradas en este mecanismo; en bacterias gram negativas se ha descrito la presencia de este mecanismo en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* entre otras, y cuyo ejercicio de la función va a depender de la energía, por lo que se han clasificado en dos grandes grupos dependiendo de su fuente de energía: bombas de eflujo primarias que dependen de la hidrólisis del ATP, y secundarias cuya extracción energética se deriva de gradientes

químicos compuestos por protones o iones como el sodio<sup>5</sup>.

Recientemente se ha publicado que en bacterias gram negativas, la transformación por transferencia de plásmidos que codifican para la bomba AcrAB-TolC, están implicadas en mecanismos de resistencia a tetraciclinas<sup>6</sup>, por lo que se hace indispensable el desarrollo de técnicas y herramientas que permitan diferenciar actividades inhibitoras de eflujo multidrogas y desestabilizadoras de la membrana externa de inhibidores de las bombas de expulsión en las bacterias, facilitando la identificación de inhibidores de la bomba de eflujo (EPI) de molécula pequeña, capaces de restaurar la efectividad de los antibióticos disponibles<sup>7,8</sup> la participación activa de los EPI conlleva a un impacto importante para la prevención de la resistencia a antibióticos a nivel mundial, pues su principal función se basa en la restricción de la actividad propia del sistema de bombas eflujo, con la disminución de la afinidad de unión del antibiótico a los transportadores a través de modificaciones estructurales del fármaco, aumentando la permeabilidad celular que permite una elevada concentración del antibiótico en el interior de la célula, o impidiendo de la codificación de genes implicados con la expresión de este mecanismo<sup>4</sup>, es por esto que se han considerado como agentes terapéuticos potenciales que mejoran la actividad de los antibióticos a los cuáles ya se ha desarrollado resistencia por parte de la célula bacteriana<sup>5</sup>.

Aunque los EPI se encuentran en la fase de experimentación desde inicios de este siglo<sup>5</sup>, diversos estudios han demostrado cómo inhibidores de las bombas de expulsión como el *Phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide* (PA $\beta$ N)<sup>7</sup> (primero en descubrirse en el año 2001), tienen capacidad de unión al sitio hidrofóbico ubicado dentro del AcrB<sup>4</sup> inhibiendo así la expulsión del antibiótico; carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP)<sup>3,9</sup>, EPI más conocido en los laboratorios, siendo un ionóforo que altera la fuerza motriz del protón en sus dos componentes  $\Delta\psi$  y  $\Delta pH$  así como al metabolismo bacteriano<sup>5</sup>, pequeños ARN Reguladores (sRNA)<sup>10</sup>, compuestos naturales como diadzein, lanatoside C, ácido protocatechuic, escopolamina, ácido gentsílico<sup>11</sup>, ácido gálico<sup>12</sup>, y derivados alcaloides<sup>13</sup>, muestran efectos sinérgicos con diferentes antibióticos como la eritromicina, tetraciclina, rifampicina, fluoroquinolona, fosfomicina y levofloxacina<sup>3</sup>

al disminuir las concentraciones de antibióticos requeridas para inhibir el crecimiento bacteriano.

Este grupo de moléculas conocidas como EPI se han clasificado de acuerdo a su mecanismo de acción como disipadores de energía como el CCCP, e inhibidores por unión directa como el PA $\beta$ N; otro grupo en donde se ha demostrado su potencial inhibitor pero de los cuáles se desconoce el mecanismo de acción, se ha denominado como EPI de otros orígenes o según su fuente incluyendo 3 subgrupos a mencionar: de origen sintético, originados de bibliotecas químicas diversificadas sintéticas o semisintéticas como los derivados de las quinolonas, compuestos peptidomiméticos, derivados de arilpiperazina y arilpiperazina y los derivados de piridopirimidina y piranopiridina; en grupo de los EPI de origen vegetal se contempla una gran diversidad de adyuvantes químicos que mejoran sinérgicamente la eficacia del fármaco hasta 30 veces, dentro de este subgrupo se incluyen alcaloides, flavonoides, polifenoles y diterpenos fenólicos; el último subgrupo se deriva de los microorganismos como el EA-371a y EA-371d, cuya primera extracción se realizó a partir del extracto de fermentación de *Streptomyces* spp; y la *P. aeruginosa* que se ha reconocido como inhibidor específico de la bomba MexAB-OprM<sup>5</sup>.

Aunque los métodos microbiológicos convencionales son útiles para identificar especies y evaluar perfiles de resistencia, no son eficaces para trazar la diseminación de una población clonal dentro de un centro hospitalario o región, ni para determinar los mecanismos de resistencia presentes, así mismo, el uso clínico de antibiótico e inhibidor de bomba de expulsión (EPI) como estrategia de terapia combinada, va a depender de la permeabilidad de la membrana externa de la célula bacteriana<sup>4</sup>. de manera tal que se imposibilite el transporte activo y/o expulsión del fármaco ya que permite que el antibiótico permanezca en mayor concentración dentro de la célula<sup>5</sup>, y es aquí en donde radica la importancia de estudiar los EPI en cepas circulantes en la región, pues al ser empleados como complemento en combinación con el tratamiento se podría mejorar la actividad del antibiótico contra bacterias que expresen este mecanismo de resistencia

Teniendo presente lo expuesto, y con el fin de ampliar la información sobre el comportamiento de la resistencia antimicrobiana en la región, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del

inhibidor de bombas de eflujo *Phenylalanine-arginine*  $\beta$ -*naphthylamide* sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos ceftazidima, clortetraciclina, ciprofloxacina, ceftriaxona, ampicilina y gentamicina en cepas de bacilos gram negativos con presencia de múltiples genes BLEE aislados.

### Materiales y métodos

#### Tipo de estudio:

Se realizó un estudio de tipo transversal, con diseño experimental para determinar el efecto del bloqueo de las bombas de eflujo con el EPI *Phenylalanine-arginine*  $\beta$ -*naphthylamide* sobre la resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli*, y *K. pneumoniae* que presentaban genes de resistencia tipo BLEE.

#### Muestras:

Para el estudio se emplearon un total de 70 cepas de bacterias gram negativas a partir de 81 aislamientos bacterianos en una institución de tercer nivel de atención del departamento de Boyacá durante el año 2018, y los cuales presentaron genes de resistencia a los antibióticos, por lo cual, la caracterización fenotípica de las cepas permitió identificar fenotipos de resistencia con 35 cepas con betalactamasas de espectro extendido (BLEE), 25 cepas con BLEE tipo *AmpC* y 8 cepas con fenotipo de carbapenemasas; la caracterización ampliada fue reportada por nuestro grupo anteriormente<sup>14</sup>.

El primer paso fue la reactivación de las cepas en medio BHI, con crecimiento durante 24 horas, seguido a la reactivación se realizó la extracción de ADN empleando el kit de *Promega "Wizard" Genomic DNA Purification* siguiendo las instrucciones del fabricante, y una vez finalizada la extracción, se cuantificó el ADN con un micro-espectrofotómetro (NANO Maestrogen) con una relación de absorbancia 260/280 mayor o igual a 1,8; el ADN fue almacenado a -80 °C hasta su análisis.

#### Identificación molecular de los mecanismos de resistencia BLEE:

Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR convencional en un termociclador Labocon, utilizando el reactivo premezclado 2X PCR *Taq MasterMix* con *dye* de *Applied Biological Materials*

(ABM) que contiene una concentración balanceada de ADN *Taq* polimerasa (50 unidades/ml), dNTPs (0.4 mM), MgCl<sub>2</sub> (3 mM) y demás componentes necesarios para la PCR; las amplificaciones fueron realizadas en un volumen final de 25  $\mu$ L (master mix 1X; 0.2  $\mu$ M de cada primer y 2 ng/ $\mu$ L de ADN) según los protocolos especificados para cada gen. Todos los iniciadores fueron sintetizados por *Macrogen Korea*.

Caracterización de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTMX1</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> en cepas gram negativas: para la detección molecular de los genes de resistencia en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* se utilizó el protocolo 005 del Laboratorio de Epidemiología Molecular empleando iniciadores y condiciones establecidas por Paterson 2003<sup>15</sup>; para la detección de los genes *bla*<sub>TEM</sub> (900 pb), se emplearon los iniciadores, 5'-AAACGCTGGTCAAAGTA-3' y 5'-AGCGATCTGTCTAT-3' y las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C 30 s seguido por 35 ciclos de 94 °C 30 s, alineamiento a 49 °C 1 min y extensión 72 °C 1 min con una extensión final de 72 °C 10 min; para *bla*<sub>CTMX1</sub> (500 pb), se utilizaron los iniciadores: 5'-GACGATGTCCTGGCTGAGC-3' y 5'-AGCCGCCGACGCTAATACA-3', amplificado bajo las condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C 30s seguido por 35 ciclos de 94 °C 30 s, alineamiento a 58 °C 1 min y extensión 72 °C 1 min con una extensión final de 72 °C 10 min; para *bla*<sub>SHV</sub> (700pb), se emplearon los siguientes iniciadores, 5'-ATGCGTTATATTCGCTGTG-3' y 5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3', amplificado bajo las condiciones: desnaturalización inicial de 94 °C 30s seguido por 35 ciclos de 94 °C 30s, alineamiento a 56 °C 1 min y extensión 72 °C 1 min con una extensión final de 72 °C 10 min.

Los productos de amplificación se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1 %, empleando *safeview classic* (ABM) como agente intercalante, y *opti DNA Marker 1Kb* (ABM) como marcador de peso molecular, las bandas se evidenciaron en un transiluminador *UltraSlim Led Illuminator Maestrogen*.

#### Descripción Filogenética de los genes identificados:

Posterior a las pruebas moleculares, en todas las muestras en donde se evidenció amplificación de ADN, se realizó el protocolo de corte y purificación de banda a partir del gel de agarosa; para este

procedimiento se utilizó el kit de promega para purificación de los productos de PCR; los productos de PCR purificados fueron enviados a la empresa *Applied Biological Materials Inc* en Canadá para la secuenciación; una vez recibido los análisis de secuenciación se procedió a la revisión de las cada una de las muestras enviadas empleando el software *FinchTV 1.4.0 de Digital World Biology®* y posteriormente se realizó un análisis de homología empleando la herramienta *BLAST nucleotide de NCBI*. Finalmente, se construyeron árboles filogenéticos en el programa *MEGA software 10*.

### Selección de muestras para la evaluación del efecto del bloqueo de las bombas de eflujo:

Considerando el interés de estudiar la participación de las bombas de expulsión en los mecanismos de multirresistencia, se seleccionaron aislados que presentaban los tres genes de resistencia identificados en el apartado anterior.

### Evaluación del efecto del bloqueo de las bombas de eflujo:

Se empleó el ensayo de *checkerboard*<sup>16</sup> para evaluar las interacciones entre dos agentes, en este caso la interacción de los antibióticos ceftazidima, clortetraciclina, ciprofloxacina, ceftriaxona, ampicilina y gentamicina vs el EPI: *Phenylalanine-arginine  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N)* todos obtenidos desde *Sigma aldrich*.

En la ejecución del ensayo se prepararon diluciones de los antibióticos (0; 0,25; 1; 2; 4; 8; 13; 64; 128 mcg/mL) y se dispensaron en 50 uL de MHB en cada pozo de la micro placa; cada antibiótico de la combinación a evaluar se diluyó en serie a lo largo del eje de las ordenadas, mientras que para el PA $\beta$ N se prepararon 6 diluciones (0; 0,76; 3,12; 12,5; 25; 50 mcg/mL) y se adicionaron a lo largo del eje de las abscisas<sup>16</sup>.

De cada cepa seleccionada cepas se preparó un inóculo de turbidimetría de 0,5 *McFarland*, con posterior inoculación en cada pozo de 100 uL ( $5 \times 10^5$  CFU/mL), los platos fueron incubados a 37 °C por 48 h en condiciones aeróbicas; después de la incubación se realizó la lectura a 655 nm para evaluar el crecimiento microbiano<sup>16</sup>. Es importante mencionar que una sexta cepa de *E coli* y una de *Pseudomona aeuroginosa* positivas para los tres genes fue excluida ya que no fue posible reactivarla para los estudios.

Para establecer la interacción, se determinó el índice de concentración fraccionada de inhibición ( $\Sigma$ FIC) con la ecuación modificada de Berenbaum<sup>17</sup> donde,  $\Sigma$ FIC = FIC<sub>A</sub> + FIC<sub>B</sub>. FIC<sub>A</sub> es la MIC de la droga A en combinación/MIC de la droga A sola. FIC<sub>B</sub> es la MIC de la droga B en combinación/MIC de la droga B sola<sup>16</sup>; los resultados se interpretaron de forma que si  $\Sigma$ FIC  $\leq 0.5$  se consideran sinérgicas,  $\Sigma$ FIC  $> 0.5$  y  $\leq 4$  se consideran indiferentes o de efecto aditivo y  $\Sigma$ FIC  $> 4$  se consideran antagonistas<sup>18</sup>.

### Análisis de la información.

Los datos obtenidos fueron sistematizados en el Programa Microsoft Excel 2019, graficados y analizados en el programa GraphPad Prisma 5, y las diferencias entre las MIC se analizaron mediante al Prueba T y se consideró significativo el valor de  $p < 0.05$ .

### Consideraciones éticas

El estudio contó con aval del Comité de Bioética de la ESE Hospital Universitario San Rafael de Tunja, Acta de evaluación No 4 del 18 de abril de 2018.

### Resultados

La extracción de ADN se realizó en las 70 cepas de bacterias gram negativas obteniendo rangos de concentración entre 80 y 200 ng/uL y una relación A260/A280 superior a 1.6 para todas las extracciones, los genes *bla<sub>TEM</sub>* y *bla<sub>CTM-X1</sub>* se encontraron en el 41,4 % de las cepas (29/70), lo cual evidencia que estos mecanismos se expresan en menos de la mitad de las cepas aisladas y evaluadas; el gen *bla<sub>SHV</sub>* fue identificado en el 51,4 % de las cepas analizadas (36/70) evidenciando que este mecanismo es más común en el ambiente desde el cual se obtuvieron los aislados bacterianos, detectándose en al menos la mitad de las bacterias Gram negativas aisladas.

Al realizar un análisis por cepas bacterianas, todas las cepas de *Pseudomona aeuroginosa* (5/5), *Enterobacter aerogenes* (4/4), *Citrobacter fameri* (1/1) y *Citrobacter freundii* (1/1) presentaron al menos un gen de resistencia a betalactámicos, en las cepas de *Pseudomona aeuroginosa* predominó el gen *bla<sub>CTM-X1</sub>* al igual que en *Enterobacter aerogenes* mientras que en las cepas de *Citrobacter fameri* y *Citrobacter freundii*

predomina el gen *bla<sub>SHV</sub>*; las cepas de *Escherichia coli* presentaron al menos un gen de resistencia en el 91,7% de las cepas analizadas (22/24) con predominancia del gen *bla<sub>TEM</sub>*, seguido por *Klebsiella pneumoniae* donde el 90.9% (10/11) de las cepas portan uno o más de los genes evaluados con mayor número de cepas portando el gen *bla<sub>SHV</sub>*.

Las cepas aisladas de *Enterobacter cloacae* presentaron mecanismos de resistencia en el 66,7% de las cepas (8/12) predominando el gen *bla<sub>SHV</sub>*. Finalmente, las cepas de *Klebsiella oxytoca* y *Serratia marcescens* presentaron genes de resistencia en el 50% de las cepas analizadas (1/2) y (5/10) respectivamente, con mayor presencia del gen *bla<sub>SHV</sub>* (ver Tabla 1).

Los resultados indican que la presencia de dos genes de resistencia se identificó en el 64,9% de las cepas resistentes (37/57), con una distribución equitativa en todas las combinaciones de genes posibles; al analizar las cepas bacterianas se evidencia que la mayor prevalencia de este patrón de resistencia lo expresan *Pseudomona aeuroginosa* (80%), *Escherichia coli* (79,2%) y *Klebsiella pneumoniae* (72,7%), de igual forma, solo estas tres cepas presentaron aislados con presencia de los tres genes evaluados con un porcentaje de 15,8% de las cepas resistentes (9/57), con una distribución por cepas de 6 de 24 aislados de *Escherichia coli* (25%), 1 de 5 aislados de *Pseudomona aeuroginosa* (20%), y 2 de 11 aislados de *Klebsiella pneumoniae* (18,2%) (ver Figura 1).

**Tabla 1.** Análisis molecular de genes de resistencia en cepas gram negativas, presencia de genes de resistencia tipo betalactamasas

Cepa Bacteriana	Número de Cepas	Presencia de genes por PCR						
		<i>blaTEM</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaCTM-X1</i>	<i>blaTEM/blaSHV</i>	<i>blaTEM/blaCTM-X1</i>	<i>blaSHV/blaCTM-X1</i>	<i>blaTEM/blaSHV/blaCTM-X1</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	5	7	6	3	4	3	2
<i>Escherichia coli</i>	24	18	12	11	10	7	8	6
<i>Pseudomona aeuroginosa</i>	5	3	2	4	1	1	3	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0	1	1	0	1	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	10	1	4	1	0	1	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	12	1	6	3	0	1	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	1	2	3	1	1	0	0
<i>Citrobacter fameri</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1	0	0	0	0	0
<b>Total:</b>	<b>70</b>	<b>29</b>	<b>36</b>	<b>29</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>9</b>

Fuente: autores.

Para el análisis de homologías del gen *bla<sub>TEM</sub>* se enviaron a secuenciar 26 amplicones, de los cuales al analizar la secuencia arrojada solo 9 de esos presentaron una longitud de pares de bases adecuada para el análisis BLAST, los datos erróneos encontrados en 17 muestras restantes pueden deberse principalmente a daños por degradación del ADN sufrida durante el proceso de purificación de la banda.

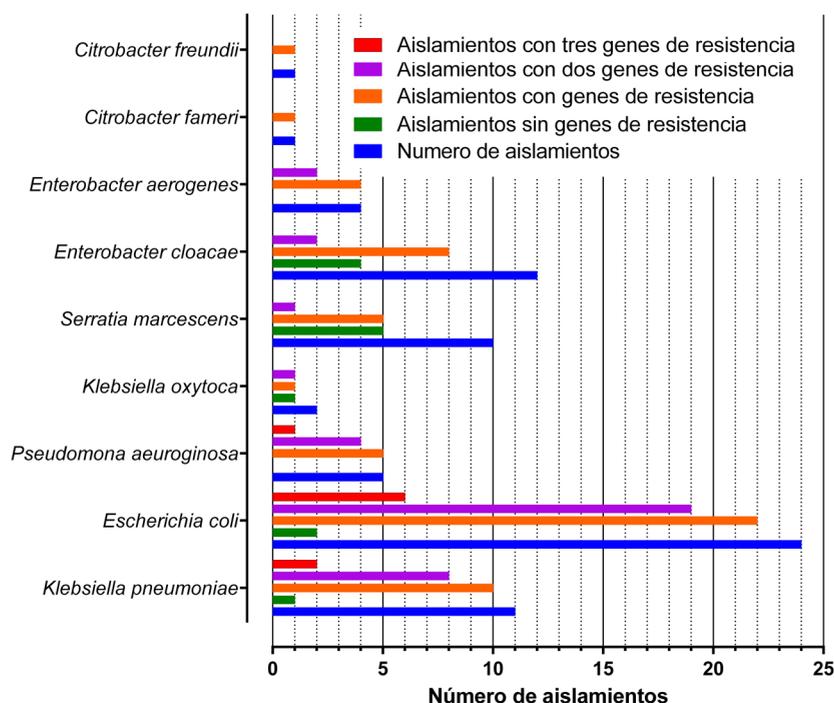
Los resultados mostraron 6 muestras con homología superior al 90% versus la *Escherichia coli* isolate GD24,

con la variante *bla<sub>TEM1</sub>* (MT387486.1) siendo esta la variante más frecuente entre las cepas aisladas, dos cepas mostraron una homología superior al 98% con *Escherichia coli* isolate GD8 con la variante *bla<sub>TEM-116</sub>* allele (MT387477.1) y finalmente una cepa mostró una homología de 100% con *Escherichia coli* isolate GD7 class A con la variante *bla<sub>TEM-181</sub>* (MT387476.1).

Para los análisis de *bla<sub>SHV</sub>* se enviaron a secuenciar 21 amplicones positivos para *bla<sub>SHV</sub>* obteniendo la secuencia de 18 de ellos, de estos datos la variante de *bla<sub>SHV</sub>* más frecuentes fueron la 1 y 2 respectivamente;

12 de los aislados presentaron homologías superiores al 98 % con *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* strain KPB420/14 beta-lactamase SHV-1 (MF662994.1), y 9 aislados presentaron homologías superiores al 94 % con *Klebsiella pneumoniae* strain ZUKP128,  $bla_{SHV-2}$  (MF402903.1), se encontraron además dos aislados con homología superior al 96 % con *Escherichia coli* 713  $bla_{SHV-4}$  (NG\_066766.1); adicionalmente se identificaron otras variantes de este gen con un solo aislamiento cada uno según, siendo homólogos a

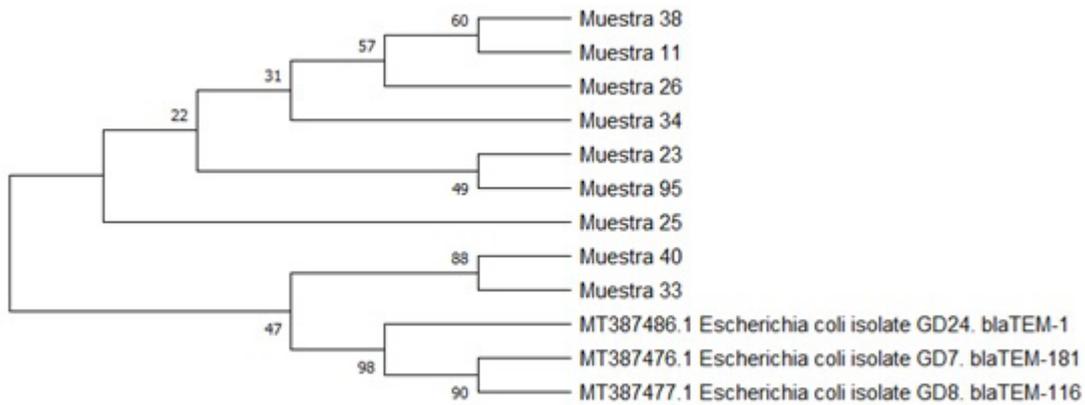
*Klebsiella pneumoniae* strain 2207  $bla_{SHV-5}$  (AF117747.1), *Escherichia coli*  $bla_{SHV-8}$  (NG\_050115.1), *Klebsiella pneumoniae* strain NC2,  $bla_{SHV-11}$  (MN786386.1), *Klebsiella pneumoniae* SHV-49 (NG\_050086.1), *Escherichia coli* D2616 SHV-197 (NG\_052582.1) y *Klebsiella pneumoniae* SHV-222 (NG\_062294.1). Al comparar con un estudio previo realizado por Velandia y colaboradores<sup>19</sup> en instituciones de salud de Boyacá no encontramos ninguna similitud con las cepas reportadas en este estudio.



**Figura 1.** Presencia de genes de resistencia  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  y  $bla_{CTM-X1}$  evaluado por PCR en los 70 aislamientos de bacterias Gram negativas. Fuente: autores

La historia evolutiva se infiere utilizando el método UPGMA, el árbol de consenso bootstrap inferido de 500 repeticiones se toma para representar la historia evolutiva de los taxones analizados; las ramas correspondientes a particiones reproducidas en menos del 50 % de réplicas de bootstrap se colapsan, el porcentaje de árboles replicados

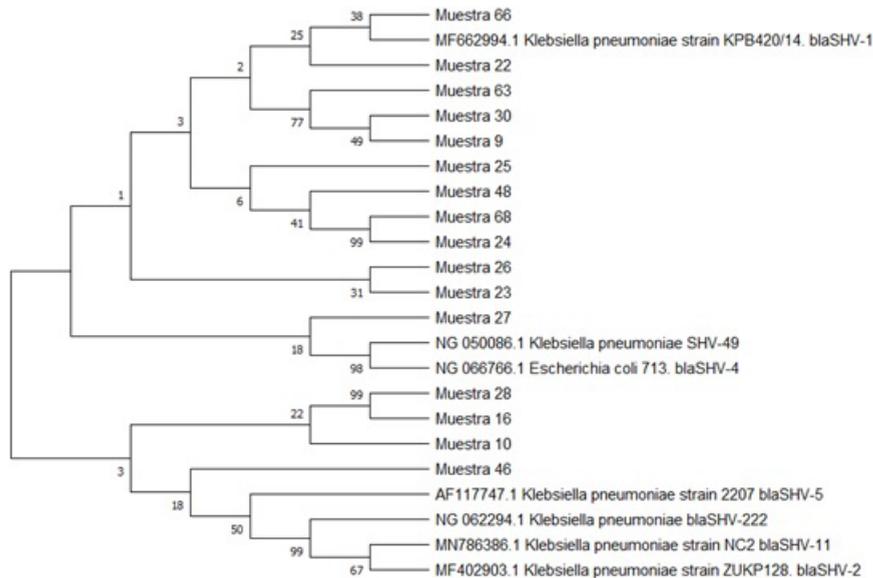
en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas y las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de máxima verosimilitud compuesta y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitios (ver Figuras 2 y 3).



**Figura 2.** Árbol filogenético de presencia de genes de resistencia  $bla_{TEM}$  en bacterias gram negativas.  
**Fuente:** autores.

Este análisis para  $bla_{TEM}$  involucró 12 secuencias de nucleótidos, se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares); hubo un total de 861 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos

se realizaron en MEGA X<sup>20</sup>, en este se evidencia que a excepción de las muestras 33 y 40, existe poco emparentamiento con las cepas homólogas lo cual indica que pueden haber surgido evolutivamente de forma paralela a las cepas reportadas en Genbank.



**Figura 3.** Árbol filogenético de presencia de genes de resistencia  $bla_{SHV}$  en bacterias Gram positivas.  
**Fuente:** autores.

Este análisis involucró 23 secuencias de nucleótidos, se eliminaron todas las posiciones ambiguas para cada par de secuencias (opción de eliminación por pares), hubo un total de 1061 posiciones en el conjunto de datos final; al realizar el análisis del árbol filogenético se observa que 9 muestras de las evaluadas se encuentran emparentadas con el gen *bla<sub>SHV1</sub>* formando parte de dos ramas comunes a la misma, y que esta variante tiene mucha similitud entre todos los aislados, lo cual puede indicar un origen común entre los alelos de las cepas aisladas; el resto de las variantes encontradas están emparentadas entre sí mostrando un origen común a todas estas variantes.

### Evaluación del efecto de bloqueo de las bombas de eflujo:

Se seleccionaron 5 cepas de *E. coli*, y 2 cepas de *K. pneumoniae* que presentaban tres genes de resistencia evaluados (*bla<sub>TEM</sub>*; *bla<sub>SHV</sub>*; *bla<sub>CTXM1</sub>*), correspondientes a aislados provenientes de

muestras de secreción de ojo (cepa 22, *K. pneumoniae*) y de urocultivos (cepas 21, *E. coli*; 23, *E. coli*; 24, *K. pneumoniae*; 31, *E. coli*; 34, *E. coli* y 38, *E. coli*).

Los resultados del análisis de interacción de los antibióticos y el EPI, evidencian que las diferentes cepas pueden expresar diferentes niveles de resistencia y se evidencia la participación de las bombas de expulsión en mayor o menor medida en las cepas evaluadas donde  $\sum FIC \leq 0.5$  se consideran sinérgicas,  $\sum FIC > 0.5$  y  $\leq 4$  se consideran indiferentes o de efecto aditivo y  $\sum FIC > 4$  se consideran antagonistas<sup>18</sup> (ver Tabla 2).

Los resultados del análisis de interacción de los antibióticos y el EPI, muestra que la inhibición de las bombas de eflujo presenta sinergia con la clortetraciclina en seis de las cepas testeadas, en contraposición de la ciprofloxacina, donde la mayoría de las cepas se comportan de forma aditiva, revelando la necesidad de estudios moleculares más profundos para identificar las bombas involucradas en cada caso.

**Tabla 2.** Interacción del bloqueo de las bombas de eflujo en las cepas analizadas

	Cepa 21	Cepa 22	Cepa 23	Cepa 24	Cepa 31	Cepa 34	Cepa 38
Antibiótico vs PAβN	$\sum FIC$	$\sum FIC$	$\sum FIC$				
Ceftazidime	2	R	1,01	1,01	0,14	0,08	0,05
	Antagonista	Resistente	Indiferentes	Indiferentes	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos
Clortetraciclina	R	0,06	0,13	0,28	0,02	0,02	0,14
	Resistente	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos
Ciprofloxacina	0,75	0,53	0,75	0,51	0,56	0,25	1,00
	Indiferentes	Indiferentes	Indiferentes	Sinérgicos	Indiferentes	Sinérgicos	Indiferentes
Ceftriaxona	0,63	R	R	R	0,02	0,02	0,05
	Indiferentes	Resistente	Resistente	Resistente	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos
Ampicilina	R	R	R	R	0,02	0,02	0,02
	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Sinérgicos	Sinérgicos	Sinérgicos
Gentamicina	0,51	1,01	R	R	0,25	0,50	1,00
	Sinérgicos	Indiferentes	Resistente	Resistente	Sinérgicos	Sinérgicos	Indiferentes

R: La cepa mantiene su fenotipo perfil de resistencia.

Fuente: autores.

Finalmente, para dar respuesta al planteamiento inicial de cuál es el efecto del inhibidor sobre los mecanismos de resistencia en las cepas que presentaron interacciones sinérgicas entre ambos tratamientos, se analizaron las concentraciones MIC

mcg/mL de cada antibiótico en comparación con la MIC del antibiótico requerida en presencia de PAβN, encontrándose una reducción significativa en la MIC de clortetraciclina, ceftriaxona y ampicilina (ver Tabla 3).

**Tabla 3.** Efecto del tratamiento con en la MIC de los antibióticos testeados

Antimicrobiano	Número de cepas con sinergia	MIC mcg/mL	MIC mcg/mL	Prueba t
		Antibiótico	Antibiótico + PAβN	p (dos colas)
Ceftazidime	3	29,333	1,333	0,2443
Clortetraciclina	6	86,667	6,792	<b>0,0111</b>
Ciprofloxacina	2	128,000	32,125	0,2043
Ceftriaxona	3	126,667	1,500	<b>0,0004</b>
Ampicilina	3	128,000	0,333	<b>4,26E-07</b>
Gentamicina	3	86,667	0,833	0,1772

Fuente: autores.

### Discusión

Diversos estudios sobre resistencia bacteriana han demostrado la presencia de diversidad de bombas de expulsión de fármacos dejando sin efecto a la mayoría de los antimicrobianos disponibles<sup>4</sup>, por lo cual se requiere investigar nuevas estrategias para hacer frente a la problemática mundial.

En un estudio realizado en Teherán, Irán, por Peymani *et al*, identificaron la presencia de los genes *bla*<sub>CTXM</sub>, *bla*<sub>SHV1</sub> y *bla*<sub>SHV12</sub>, en un 17,3%, 6,7% y 4% respectivamente, en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas a partir de muestras de pacientes que ingresaron al hospital de Qazvin y Teherán<sup>21</sup>; esto demuestra que la resistencia a antibióticos betalactámicos se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, en el departamento de Boyacá, López *et al* encontraron la presencia del gen *bla*<sub>CTXM</sub> en un 61,1%, *bla*<sub>SHV</sub> en 50% y *bla*<sub>TEM</sub> en 38,88%, los cuáles fueron identificados de cepas de gram negativos aislados a partir de muestras de urocultivo<sup>22</sup>, genes que fueron hallados en el presente estudio en cepas del mismo tipo pero de diferentes muestras incluida la orina; de otra parte, Zanguña *et al* en el 2020 reportaron la presencia de los genes para bombas de expulsión *MexA*, *MexC* y *AcrB* en aislamientos de *Enterobacter cloacae* y *Enterobacter aerogenes* obtenidos de una institución de salud de Boyacá, y que a su vez presentaron un perfil de resistencia BLEE y *AmpC*<sup>23</sup>. Con esto queda en evidencia que en los hospitales del departamento de Boyacá circulan cepas bacterianas que pueden estar empleando bombas de eflujo para bloquear el efecto de los antimicrobianos, lo que lleva a replantearse las alternativas farmacológicas para el tratamiento de los diferentes procesos infecciosos.

Recientemente se ha publicado que en bacterias gram negativas, la transformación por transferencia de plásmidos que codifican para la bomba AcrAB-TolC, están implicadas en mecanismos de resistencia a tetraciclinas<sup>6</sup>, por lo que se hace indispensable el desarrollo de técnicas y herramientas que permitan diferenciar actividades inhibitoras de eflujo multidrogas y desestabilizadoras de la membrana externa de inhibidores de las bombas de expulsión en las bacterias, facilitando la identificación de EPI, capaces de restaurar la efectividad de los antibióticos disponibles<sup>7,8</sup>.

Al analizar los resultados obtenidos del ensayo de interacción Checkerboard, podemos evidenciar que las dos cepas de *K. pneumoniae* (cepas 22 y 24) incluidas en el estudio resultaron ser resistentes al menos a tres de los antibióticos testeados, incluso en presencia de un bloqueo de las bombas de expulsión.

En este caso Baron y Rolain en el 2018<sup>3</sup> realizaron un estudio en cepas de bacterias gram negativas, evaluando el efecto de los inhibidores de las bombas sobre la resistencia a colistina empleando CCCP, 2,4-dinitro-phenol (DNP), PAβN, reserpine, omeprazole y verapamil, encontraron que solo el CCCP presentó efectos sinérgicos, rescatando la susceptibilidad de las bacterias a la colistina. Esta diferencia puede estar relacionada a los mecanismos de acción reportados para estas moléculas inhibitoras, por ejemplo, el CCCP presenta como mecanismos de acción la inhibición del potencial energético, afectando la disponibilidad de protones requeridas para el funcionamiento de las bombas de expulsión descritas entre las familias 1 a 4, que requieren un gradiente de protones para

el mecanismo de transporte antiporte protón/sustrato<sup>9,10</sup>.

Por otra parte, el mecanismo reportado para el PA $\beta$ N, corresponde a un mecanismo de inhibición por competencia con el antibiótico, o por el sitio de interacción de este con la bomba de expulsión<sup>24,25</sup>. Adicionalmente, Schuster *et al* en 2019<sup>26</sup>, describieron dos mutantes generados de forma aleatoria desde la cepa *E. coli* 3-AG100 que presentaban una alteración que disminuye considerablemente el efecto sinérgico de PA $\beta$ N frente a compuestos lipofílicos de gran tamaño, como es el caso de la ciprofloxacina y la clortetraciclina.

Estos datos pueden explicar, al menos en parte, porque las cepas de *K. pneumoniae* evaluadas presentan una respuesta baja a la inhibición con el PA $\beta$ N, de esta forma se recomienda someter estas cepas resistentes a la prueba, empleando un EPI como el CCCP u otro inhibidor de potencial eléctrico mediado por protones; otra de las estrategias publicadas para estas cepas son las combinaciones de antibióticos betalactámicos<sup>27,28</sup> o carbapenémicos<sup>29</sup>, donde se evidencia un potente efecto sinérgico al combinar los fármacos antibióticos, la inclusión de la colistina en conjunto con otros antibióticos<sup>30,31</sup>, con péptido sintético de la lactoferrina humana<sup>32</sup>, o en combinación de aceites esenciales extraídos de variedades vegetales<sup>33</sup>, por lo cual se pueden evaluar estas combinaciones en presencia del inhibidor de las bombas de expulsión.

De igual forma, dos de las cepas de *E. coli* (cepa 21 y 23) presentaron mecanismos de resistencia que permitieron mantener su fenotipo aún frente al inhibidor de las bombas empleado, por lo que se recomienda aplicar los mismos diseños propuestos para las cepas de *K. pneumoniae* anteriormente descritas.

Las cepas de *E. coli* restantes (cepas 31, 34 y 38), las cuales presentaban un fenotipo de resistencia a tres antibióticos en común (ampicilina, ceftriaxona y ceftazidime) mostraron un resultado positivo al presentar sensibilidad a los antibióticos testeados en presencia del inhibidor PA $\beta$ N, demostrando que, en estas cepas, el mecanismo competitivo de PA $\beta$ N fue efectivo en el bloqueo de las bombas de expulsión involucradas, al igual que se reportó en cepas de *E. coli* aisladas de mastitis bovina<sup>34</sup>.

Los resultados del análisis con ceftazidime mostraron que tres cepas de las evaluadas (cepa 21, 23 y 24) no presentan ningún efecto, pues no se generan cambios en las MIC en presencia del EPI, al igual que lo reportado para *Vibrio sp.*<sup>35</sup>; por otra parte, tres cepas de *E. coli*, presentaron efecto sinérgico en presencia del EPI, de esta forma no hay datos concluyentes en nuestro estudio sobre la interacción del PA $\beta$ N con el antibiótico evaluado.

Los análisis de clortetraciclina, muestran que solo la cepa 21 se comporta como una bacteria resistente a todas las concentraciones probadas; sin embargo, en las otras cepas testeadas, la presencia del EPI muestra un efecto sinérgico con el antibiótico, mostrando que el mecanismo de competencia del PA $\beta$ N se muestra suficiente para inhibir la expulsión de la clortetraciclina.

Al analizar los resultados de la resistencia a ciprofloxacina, solo dos cepas de las evaluadas (cepas 24 *K. pneumoniae* y cepa 34 *E. coli*) presentaron un efecto sinérgico en presencia del EPI aplicado, con una disminución de 2 y 128 veces respectivamente. Al considerar los resultados reportados por Abdel-Halim *et al* en 2019<sup>36</sup>, en donde se evalúa el efecto de inhibidores de las bombas de expulsión en cepas de *E. coli* MDR, se evidenció que diferentes inhibidores pueden tener un comportamiento muy diferente en las mismas cepas bacterianas expuestas a ciprofloxacina, donde la domperidona disminuyó 32 veces las concentraciones de ciprofloxacina requerida, mientras que la reserpina solo disminuye 8 veces la concentración requerida.

Wei *et al* en el 2020 reportan un estudio realizado en cepas de *E. coli* donde el tratamiento con un inhibidor extraído de la hierba china *Artemisia annua*, identificado como artesunato, produce una disminución de la MIC de ciprofloxacina en las cinco cepas MDR evaluadas<sup>37</sup>. Nuestros resultados indican además que de todas las cepas evaluadas solo dos de ellas presentan efectos positivos a la inhibición de las bombas de expulsión con PA $\beta$ N. En un estudio realizado en cepas de *Salmonella* por Kang *et al* en 2014<sup>38</sup>, se demostró que estas cepas de bacterias gram negativas, incrementan la expresión de las bombas de expulsión por presión selectiva mediante la exposición a ciprofloxacina. En referencia a las cinco cepas en las que no se evidencia una interacción positiva en los resultados, Pun *et al* en

el 2023 reportan que en estudios con la bacteria *Pectobacterium brasiliense* 1692, la cual presenta una bomba de eflujo homóloga a la AcrB de *Escherichia coli*, la aplicación del EPI no genera una respuesta sinérgica con este antibiótico<sup>39</sup>, indicando que el mecanismo de resistencia frente a la ciprofloxacina puede ser independiente de las bombas de expulsión.

En referencia a la ceftriaxona, tres cepas (22, 23 y 24) resultaron resistentes a este antibiótico aun en presencia de EPI, en la cepa 21 no existe interacción entre las drogas evaluadas y, al igual que con otros antibióticos, las cepas 31, 34 y 38 en la presencia del PAβN presentan un efecto sinérgico.

En cuanto a la resistencia a ampicilina en este estudio, las cepas de *K. pneumoniae* y las cepas 21 y 24 de *E. coli* presentaron resistencia en presencia del EPI empleado, esto puede deberse al mecanismo de acción del EPI seleccionado o resistencia bacteriana al mismo. En un estudio realizado con artesunato, la presencia de este inhibidor de las bombas AcrAB-TolC demostró un efecto sinérgico en combinación con la ampicilina ( $\Sigma$ FIC de 0.3)<sup>40</sup>. Adicionalmente, en otras cepas bacterianas como la *Pseudomonas putida* KT2440 la adición de PAβN presenta un efecto sinérgico con la ampicilina incluso en presencia de indol<sup>41</sup>.

Al analizar la resistencia a gentamicina, en las cepas 21, 31 y 34 (tres de cinco cepas de *E. coli* analizadas) la adición de PAβN genera una disminución de 2 veces las concentraciones de MIC, similar a lo que reporta Bag et al<sup>42</sup> en cepas de *E. coli* aisladas en muestras de urocultivos. En una cepa bacteriana de *Pseudomonas* sp. MR 02 super resistente, la presencia del PAβN muestra un efecto sinérgico disminuyendo 2 veces la concentración de gentamicina requerida<sup>43</sup>, lo que muestra que el mecanismo de expulsión para este antibiótico, independientemente de la cepa y la bomba involucrada es susceptible a la competencia generada con el EPI.

Al evaluar el impacto de la inhibición de las bombas de eflujo con el EPI PAβN sobre las MIC en la literatura se reporta la disminución de Resistencia Antimicrobiana (AMR) a tetraciclinas en cepas MDR de *Salmonella enterica* a niveles por debajo de punto de corte para establecer que una cepa es resistente a este antibiótico<sup>44</sup>. Otros estudios de cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos

demostraron que la aplicación de PAβN generó una disminución de la MIC a tigeciclina en cuatro diluciones y adicionalmente, en este estudio se identifica que la cepa presentaba una sobreexpresión del sistema AcrAB<sup>45</sup>.

En nuestro estudio encontramos que el tratamiento con el inhibidor provoca una disminución de la MIC en mcg/mL para los antibióticos clortetraciclina, ceftriaxona y ampicilina, encontrándose además con diferencias significativas entre las concentraciones (ver Tabla 3). En los otros antibióticos testados se evidencia una tendencia biológica a la disminución de la MIC pero sin diferencias significativas, posiblemente debido a la necesidad de evaluar un número mayor de cepas, ya que por ejemplo en el caso de la ciprofloxacina en un estudio sobre *A. baumannii* se reportó que el tratamiento con PAβN disminuyó entre 2 y 4 veces la MIC frente a este antibiótico<sup>46</sup>, similar a lo evidenciado en nuestros resultados.

Finalmente, se evidenció dos comportamientos diferenciados en las cepas bacterianas 31, 34 y 38 que responden de forma sinérgica frente a la mayoría de los antibióticos, mientras que las cepas 21, 22, 23 y 24 presentan mecanismos de resistencia a los antibióticos que no son susceptibles a la inhibición por el PAβN. Además, frente a cada antibiótico no se evidenció un comportamiento homogéneo en las cepas estudiadas, lo que apunta a que la eficiencia del bloqueo de las bombas de eflujo depende de las bombas presentes y activas en las bacterias más que de los mecanismos de resistencia específicos, como es el caso en la resistencia antimicrobiana. En este punto se hace indispensable un estudio de identificación de la presencia de las bombas de eflujo y el análisis de la expresión de estas.

En los análisis filogenéticos no se encontró una fuerte relación de las cepas estudiadas y reportadas en la región, estos hallazgos nos permiten inferir que las cepas se encuentran en constante evolución respondiendo a las presiones selectivas a las que son sometidas por diversas razones, incluyendo la mala prescripción de antibióticos o la interrupción del tratamiento por parte de los pacientes. Se identifica la presencia de los genes BLEE *bla*<sub>TEM</sub> 1, 116 y 181 presentes en secuencias depositadas de *Escherichia coli* isolate GD24, GD8 y GD7 respectivamente. En relación al gen *bla*<sub>SHV</sub> se encontró gran diversidad de genes predominando los genes *bla*<sub>SHV</sub> 1 y 2.

En un estudio publicado por Pulido *et al* en el 2011, donde analizan muestras proveniente de 10 hospitales de la misma región geográfica, identifican que los genes  $bla_{SHV}$  más prevalentes fueron  $bla_{SHV12}$ ,  $bla_{SHV5}$ ,  $bla_{SH27}$  y  $bla_{SHV2}$ <sup>47</sup>, en contraste en nuestro estudio, años después solo se evidencia que continúa circulando el gen  $bla_{SHV2}$  en conjunto con una variedad de genes emergentes en la región, demostrando la constante evolución de estos mecanismos antimicrobianos.

Durante la ejecución del estudio se presentaron como limitantes el bajo número de cepas multirresistentes disponibles en el cepario que se pudiesen incluir en la fase de evaluación del bloqueo de las bombas de eflujo y la disponibilidad de un único EPI para realizar las pruebas. Finalmente se recomienda evaluar la expresión de las bombas de eflujo por qPCR y/o Western Blot.

### Conclusiones

En la cepas gram negativas aisladas se detectaron, a través de PCR convencional, genes que determinan la resistencia a antibióticos, como lo son  $bla_{TEM}$ ,  $bla_{SHV}$  y  $bla_{CTX-M}$ , así mismo, se determinó que todas las cepas bacterianas presentaron al menos un gen de resistencia, predominando el  $bla_{CTX-M}$ . De las setenta bacterias evaluadas se identificaron nueve aislamientos que presentaban los tres genes en conjunto, generando una alerta temprana en la posible aparición de microorganismos multirresistentes.

Por otra parte, el análisis filogenético de los genes  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$  mostró que las variantes alélicas de  $bla_{TEM}$  y  $bla_{SHV}$  de mayor circulación en la institución de salud fueron  $bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{SHV-1}$  y  $bla_{SHV-2}$ . Finalmente, con el análisis *Checkerboard* y el análisis en la reducción de las MIC de los antibióticos clortetraciclina, ceftriaxona y ampicilina, se estableció que el uso de inhibidores como terapia alternativa en cepas multirresistentes puede ser una opción terapéutica, sin embargo, se deben ampliar los estudios a otras familias de inhibidores para cubrir un mayor número de mecanismos de expulsión y garantizar un bloqueo efectivo en todas las cepas testadas.

### Agradecimientos

A la ESE Hospital Universitario Hospital San Rafael de Tunja y la Universidad de Boyacá.

### Declaración de conflictos de interés

Los autores no presentan ningún tipo de conflictos de interés.

### Financiación

El presente trabajo ha sido financiado por la Universidad de Boyacá y ESE Hospital Universitario Hospital San Rafael de Tunja.

### Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud [Internet]. Resistencia a los antimicrobianos; 17 de noviembre del 2021 [citado 11 de enero de 2024]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Castro LT, Torres MI, Castañeda LM, López DP, Prada CF. Caracterización fenotípica de bacilos Gram negativos con betalactamasas de espectro extendido y carbapenemasas. *Rev Investig. Salud Univ Boyacá*. 2015;2(2):116-130.
3. Baron SA, Rolain JM. Efflux pump inhibitor CCCP to rescue colistin susceptibility in *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant strains and Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(7):1862-1871.
4. Chetri S. The culmination of multidrug-resistant efflux pumps vs. meager antibiotic arsenal era: Urgent need for an improved new generation of EPIs. *Front Microbiol*. 2023;14:1149418.
5. Sharma A, Gupta VK, Pathania R. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *Indian J Med Res*. 2019;149(2):129-145.
6. Nolivos S, Cayron J, Dedieu A, Page A, Delolme F, Lesterlin C. Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. *Science*. 2019;364(6442):778-782.
7. Misra R, Morrison KD, Cho HJ, Khuu T. Importance of Real-Time Assays To Distinguish Multidrug Efflux Pump-Inhibiting and Outer Membrane-Destabilizing Activities in *Escherichia*

- coli. *J Bacteriol.* 2015;197(15):2479-2488.
8. Lamut A, Peterlin Masic L, Kikelj D, Tomasic T. Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria. *Med Res Rev.* 2019;39(6):2460-504.
  9. Park YK, Ko KS. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistin. *J Microbiol.* 2015;53(1):53-9.
  10. Parker A, Gottesman S. Small RNA Regulation of TolC, the Outer Membrane Component of Bacterial Multidrug Transporters. *J Bacteriol* 2016;198(7):1101-13.
  11. Aparna V, Dineshkumar K, Mohanalakshmi N, Velmurugan D, Hopper W. Identification of Natural Compound Inhibitors for Multidrug Efflux Pumps of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* using in Silico High-Throughput Virtual Screening and In Vitro Validation. *PLoS One.* 2014;9(7):e101840.
  12. Dwivedi GR, Tiwari N, Singh A, Kumar A, Roy S, Negi AS, et al. Gallic acid-based indanone derivative interacts synergistically with tetracycline by inhibiting efflux pump in multidrug resistant *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100(5):2311-25.
  13. Dwivedi GR, Maurya A, Yadav DK, Singh V, Khan F, Gupta MK, et al. Synergy of clavine alkaloid “chanoclavine” with tetracycline against multidrug-resistant *E. coli*. *J Biomol Struct Dyn.* 2019;37(5):1307-25.
  14. Angarita Merchán M, Di Filippo Iriarte G, Mora Moreno DP, Ferrebuz Cardozo AJ. Perfil de resistencia de microorganismos circulantes en una Institución Prestadora de Servicios de salud en el Departamento de Boyacá, 2018. *Revista Investig. Salud Univ. Boyacá.* 2019;6(1):120-44.
  15. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, et al. Extended-Spectrum beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3554-60.
  16. Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(1):140-3.
  17. Berenbaum MC. A method for testing for synergy with any number of agents. *J Infect Dis.* 1978;137(2):122-30.
  18. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):1.
  19. López DP, Castro LT, Prada CF, Torres MI. Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from a Boyacá Hospital, Colombia. *The Internet journal of microbiology.* 2018;15(1):1-12.
  20. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
  21. Velandia DPL, Torres MI, Castañeda LM, Prada CF. Determinación de genes que codifican la resistencia de betalactamasas de espectro extendido en bacilos Gram negativos aislados de urocultivos. *Investig Salud Univ Boyacá.* 2016; 3(2):107-126.
  22. Peymani A, Naserpour T, Zare E, Azarhoosh K. Distribution of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing *P. aeruginosa* isolated from Qazvin and Tehran hospitals, Iran. *J Prev Med Hyg.* 2017; 58(2):155-160.
  23. Zanguña LF, Torres MI, Di Filippo G. Perfil de tolerancia al triclosán y detección de los genes MexA, MexC, AcrB y oqxA relacionados con la expresión de bombas de expulsión en aislados clínicos del género *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*. *Investig Salud Univ Boyacá.* 2020; 7(1):102-117.
  24. Li XZ, Nikaïdo H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs.* 2004;64(2):159-204.
  25. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Matsumoto T, Yamaguchi A. Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature.* 2006;443(7108):173-179.
  26. Schuster S, Bohnert JA, Vavra M, Rossen JW, Kern WV. Proof of an Outer Membrane Target of the Efflux Inhibitor Phe-Arg-beta-Naphthylamide from Random Mutagenesis. *Molecules.* 2019;24(3):470.
  27. Zhang W, Guo Y, Yang Y, Dong D, Zheng Y, Zhu D, et al. Study of In Vitro Synergistic Bactericidal Activity of Dual beta-Lactam Antibiotics Against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2020;26(3):204-210.
  28. Vidailiac C, Benichou L, Duval RE. In vitro synergy of colistin combinations against colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

- aeruginosa, and *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(9):4856-4861.
29. Oliva A, Gizzi F, Mascellino MT, Cipolla A, D'Abramo A, D'Agostino C, et al. Bactericidal and synergistic activity of double-carbapenem regimen for infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(2):147-53.
  30. Brennan-Krohn T, Kirby JE. Synergistic Combinations and Repurposed Antibiotics Active against the Pandrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Nevada Strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9):e01374-19.
  31. Falagas ME, Voulgaris GL, Tryfinopoulou K, Giakkoupi P, Kyriakidou M, Vatopoulos A, et al. Synergistic activity of colistin with azidothymidine against colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates collected from inpatients in Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2019;53(6):855-8.
  32. Morici P, Florio W, Rizzato C, Ghelardi E, Tavanti A, Rossolini GM, et al. Synergistic activity of synthetic N-terminal peptide of human lactoferrin in combination with various antibiotics against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(10):1739-48.
  33. Kwiatkowski P, Pruss A, Grygorcewicz B, Wojciuk B, Dolegowska B, Giedrys-Kalamba S, et al. Preliminary Study on the Antibacterial Activity of Essential Oils Alone and in Combination with Gentamicin Against Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing and New Delhi Metallo-beta-Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Microb Drug Resist.* 2018;24(9):1368-75.
  34. Ospina MAO, Pietralonga PAG, Schwarz DGG, Silva AJ, Paula SO, Moreira MAS. Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 2014;97(2):176-81.
  35. Lloyd NA, Nazaret S, Barkay T. Genome-facilitated discovery of RND efflux pump-mediated resistance to cephalosporins in *Vibrio* spp. isolated from the mummichog fish gut. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019;19:294-300.
  36. Abdel-Halim H, Al Dajani A, Abdelhalim A, Abdelmalek S. The search of potential inhibitors of the AcrAB-TolC system of multidrug-resistant *Escherichia coli*: an in silico approach. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103(15):6309-18.
  37. Wei S, Yang Y, Tian W, Liu M, Yin S, Li J. Synergistic Activity of Fluoroquinolones Combining with Artesunate Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. *Microb Drug Resist.* 2020;26(1):81-8.
  38. Kang HW, Woo GJ. Increase of multidrug efflux pump expression in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* mutants induced by ciprofloxacin selective pressure. *Res Vet Sci.* 2014;97(2):182-6.
  39. Pun M, Khazanov N, Galsurker O, Kerem Z, Senderowitz H, Yedidia I. Inhibition of AcrAB-TolC enhances antimicrobial activity of phytochemicals in *Pectobacterium brasiliense*. *Front Plant Sci.* 2023;14:1161702.
  40. Li B, Yao Q, Pan XC, Wang N, Zhang R, Li J, et al. Artesunate enhances the antibacterial effect of  $\beta$ -lactam antibiotics against *Escherichia coli* by increasing antibiotic accumulation via inhibition of the multidrug efflux pump system AcrAB-TolC. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(4):769-77.
  41. Kim J, Shin B, Park C, Park W. Indole-Induced Activities of  $\beta$ -Lactamase and Efflux Pump Confer Ampicillin Resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. Vol. 8, *Frontiers in Microbiology.* 2017. p. 433.
  42. Bag A, Chattopadhyay RR. Efflux-pump inhibitory activity of a gallotannin from *Terminalia chebula* fruit against multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Prod Res.* 2014;28(16):1280-1283.
  43. Ranjan V, Mukherjee S, Thakur S, Gupta K, Chakraborty R. Ampicillin-Eating, Carbapenem-Resistant, Super-Superbug *Pseudomonas* sp. MR 02, Isolated from an Indian River, Mahanada, Has Exhaustive Repertoire of Genes to Combat All Classes of Antibiotics and Catabolize  $\beta$ -Lactams for Its Sustenance. *SSRN Electronic Journal.* 2019.;
  44. Price EDJ, Dassanayake RP, Bearson SMD. Increasing antimicrobial susceptibility of MDR *Salmonella* with the efflux pump inhibitor 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2023;668:49-54.
  45. Yoon EJ, Oh Y, Jeong SH. Development of Tigecycline Resistance in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence

- Type 147 via AcrAB Overproduction Mediated by Replacement of the *ramA* Promoter. *Ann Lab Med.* 2020;40(1):15-20.
46. Maleki MH, Jalilian FA, Khayat H, Mohammadi M, Pourahmad F, Asadollahi K, et al. Detection of highly ciprofloxacin resistance acinetobacter baumannii isolated from patients with burn wound infections in presence and absence of efflux pump inhibitor. *Maedica (Bucur).* 2014;9(2):162-167.
47. Pulido IY, Mantilla JR, Valenzuela EM, Reguero MT, González EB. Distribución de genes codificadores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* de hospitales de Bogotá, D.C., Colombia. *Biomédica.* 2011;31(1):15-20.