

# ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA MÚLTIPLE A DROGAS EN AISLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomona aeruginosa* PROVENIENTES DE AMBIENTES HOSPITALARIOS

Crespo Crespo Isaac (1\*), Carranza López Claudia Teresa (1), Solorio Alvarado César Rogelio (2), Deveze Álvarez Martha Alicia (3), Alba Betancourt Clara (3), Mendoza Macías Claudia Leticia (3\*\*)

1 [Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | [ \*Dirección de correo electrónico: [l.crespocrespo@ugto.mx](mailto:l.crespocrespo@ugto.mx) ]

2 [Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato]

3 [Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [ \*\*Dirección de correo electrónico: [cl.mendoza@ugto.mx](mailto:cl.mendoza@ugto.mx) ]

## Resumen

**Introducción:** *Pseudomona aeruginosa* es un agente etiológico de las infecciones nosocomiales y que presenta multiresistencia a antibióticos. Una estrategia para combatirla, es emplear inhibidores de bombas de eflujo para revertir su resistencia. **Materiales y Métodos:** Se clasificaron aislados clínicos de *P. aeruginosa* según su grado de resistencia, se determinaron las CMI para cuatro antibióticos y se evaluó el efecto de dos inhibidores de bombas de eflujo. **Resultados:** Los fenotipos de resistencia de las cepas de *P. aeruginosa* fueron MDR, XDR y No Multiresistente. Se determinó la CMI para ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina y tetraciclina. Los dos derivados de maleimidas no tuvieron efecto en la reversión de resistencia. **Discusión y Conclusiones:** La resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa* deriva de diversos mecanismos, lo cual permite considerarla como una bacteria multiresistente, tener CMI relativamente altas y no presentar reversión de resistencia con el uso de los inhibidores de bombas de eflujo como los derivados de maleimidas evaluados en el presente trabajo.

## Abstract

**Introduction:** *Pseudomonas aeruginosa* is an etiological agent of nosocomial infections with multidrug resistance. One strategy to combat it, is to use efflux pump inhibitors to reverse it's resistance. **Materials and Methods:** The clinical isolates of *P. aeruginosa* were classified according to their degree of resistance, the MIC's were determined for four antibiotics and the effect of efflux pump inhibitors was evaluated. **Results:** The resistance phenotypes of *P. aeruginosa* strains were MDR, XDR and Non-Multiresistant. The MIC was determined for ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamicin and tetracycline. The two maleimide derivatives had no effect on resistance reversal. **Discussion and Conclusions:** Antibiotic resistance of *P. aeruginosa* derives from various mechanisms, which allows it to be considered as a multi-resistant bacteria, have relatively high MIC's and not to show reversion of resistance with the use of efflux pump inhibitors as the two maleimide derivatives evaluated in this work.

### Palabras Clave

*Pseudomona aeruginosa*; Multiresistencia; Antibióticos; Inhibidores de Bombas de Eflujo; Reversión de Resistencia.

## INTRODUCCIÓN

### Infecciones nosocomiales

Las infecciones nosocomiales son aquellas patologías adquiridas en una unidad de servicios de salud que aparecen por primera vez tras 48 horas (o más) después de la hospitalización o dentro de los 30 días posteriores a la alta hospitalaria. Los agentes etiológicos pueden ser bacterias, virus, hongos o parásitos [1].

### Resistencia bacteriana a antibióticos

Uno de los mayores problemas en el tratamiento de las infecciones nosocomiales es el aumento de la resistencia a antibióticos, la cual se produce cuando un fármaco pierde su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano de forma efectiva. Las bacterias que presentan con frecuencia esta característica y que son los principales agentes etiológicos de estas infecciones son *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* [2].

### Clasificación de la resistencia a múltiples antibióticos

Actualmente es posible clasificar a las bacterias de acuerdo al grado de resistencia que puedan presentar. Multi-Drug Resistance (MDR): No susceptible al menos un agente en tres o más familias de antibióticos; Extreme-Drug Resistance (XDR): No susceptible al menos un agente en todas las familias de antibióticos excepto en dos o menos; Pan-Drug Resistance (PDR): No susceptible a todos los agentes de todas las familias de antibióticos [3].

### *Pseudomona aeruginosa* multiresistente a antibióticos

*P. aeruginosa* es uno de los agentes etiológicos más persistentes en las infecciones nosocomiales debido a sus mecanismos de resistencia frente a antibióticos. Esto se debe a que esta bacteria es capaz de expresar genes asociados a la resistencia intrínseca, tener mutaciones en éstos para conferir nueva resistencia, además de adquirir nuevos genes de resistencia a través de plásmidos [4].

### Inhibición de bombas de eflujo de *Pseudomona aeruginosa* como estrategia en la reversión de multiresistencia a antibióticos

Inhibir las bombas de eflujo es prometedor para aumentar la concentración intracelular del antibiótico, restaurar la actividad del antibiótico contra las cepas resistentes y minimizar el desarrollo de nuevas cepas resistentes. Por lo que, el uso de inhibidores de bombas de eflujo junto con antibióticos puede reducir la persistencia de infecciones por *P. aeruginosa* [5].

Este trabajo tiene como propósitos la clasificación de la resistencia a antibióticos, la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de cuatro antibióticos y la evaluación de la posible modulación de la resistencia asociada a bombas de eflujo de cepas de *P. aeruginosa* procedentes de aislados clínicos de un hospital de tercer nivel de la ciudad de León, Guanajuato con base a investigaciones previas con otros modelos de estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención y conservación de cepas de *Pseudomona aeruginosa*

Se obtuvieron tres cepas de *P. aeruginosa* identificadas como PA54 AB, PA238 URO y PA255 URO de diversas muestras clínicas de un hospital de tercer nivel de la ciudad de León, Guanajuato. Estos aislados clínicos se cultivaron en medio agar sangre (Becton Dickinson) para luego conservarse a -70°C en medio Luria Bertani (Becton Dickinson) y glicerol 10% (v/v) para posteriores ensayos.

## Clasificación de la resistencia de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Los perfiles de susceptibilidad fueron realizados en el HRAEB, los cuales se complementaron con otros antibióticos evaluados mediante la técnica de Kirby – Bauer [6].

En función del perfil de susceptibilidad para cada cepa de *P. aeruginosa* y de acuerdo a los criterios establecidos para clasificar a las bacterias multiresistentes, se caracterizaron las tres cepas, según fuera, como MDR, XDR, PDR y No Multiresistente [3].

## Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

A partir de los cultivos conservados en medio Luria Bertani y glicerol 10% (v/v), se inocularon a placas con agar sangre (Becton Dickinson) para incubarlas por 48 horas a 37°C. Se empleó la técnica de microdilución en placa de 96 pozos con medio Mueller – Hinton Broth (Becton Dickinson) y se realizaron diluciones dobles seriadas para los antibióticos ciprofloxacino (Sigma - Aldrich), cloranfenicol (Sigma - Aldrich), gentamicina (Sigma - Aldrich) y tetraciclina (Sigma - Aldrich), en un rango de concentración de 4 a 256 µg/ml, excepto para cloranfenicol que fue de 4 a 1024 µg/ml, de acuerdo al documento M07 – A9 del CLSI [7].

## Efecto de derivados de maleimidias en la modulación de resistencia asociada a bombas de eflujo

Se determinó la CMI para los antibióticos ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina y tetraciclina, con el método ya descrito, en combinación con dos moléculas derivadas de maleimidias, previamente seleccionadas. Una vez ajustada la D.O.<sub>630nm</sub> bacteriana a 0, 04, se pre-incubó cada molécula a una concentración de 10 µg/ml, por 15 min a 37°C, posteriormente se procedió a montar el ensayo para determinar la CMI como se describió anteriormente. El efecto modulador se observa cuando hay una disminución en la CMI para el antibiótico en presencia de los derivados de maleimidias [8].

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Clasificación de la resistencia de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

A partir de la información disponible de la susceptibilidad de cada una de las tres cepas de *P. aeruginosa* y con base a los criterios internacionales para clasificar a las bacterias multiresistentes, se propusieron los posibles fenotipos de resistencia para estas cepas (Tabla 1) [3][6]. Cuando una infección nosocomial es causada por *P. aeruginosa*, es común que éstas cepas presenten múltiples resistencias a antibióticos, según lo señalan algunos estudios, el fenotipo más frecuente es XDR, seguido por el MDR y por último el PDR, aunque esto puede variar de acuerdo a la región [9].

### Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se evaluaron cuatro antibióticos que son sustrato de bombas de eflujo descritas en *P. aeruginosa* [10]. La bomba de eflujo MexA – MexB OprM se expresa de manera constitutiva, mientras que, las bombas de eflujo MexC – MexD – OprJ, MexE – MexF – OprN y MexX – MexY – OprM se expresan de manera inducible [11]. Los resultados de la determinación de CMI se observan en la Tabla 2. En el caso de la cepa identificada como P54 AB presenta resistencia a ciprofloxacino en el punto de corte, se debe posiblemente a que esta cepa ha desarrollado poca resistencia a los antibióticos de la familia de fluoroquinolonas a través de modificaciones en el sitio de acción (DNA girasa y topoisomerasa IV), por plásmidos transferibles (PMQR) o mutaciones en genes que regulan la expresión de bombas de eflujo y la disminución de la expresión de porinas de la membrana externa, ya que estos mecanismos son los que se asocian a la resistencia a las fluoroquinolonas en *P. aeruginosa* [12][13]. El hecho que las cepas identificadas como PA238 URO y PA255 URO presentaran CMI relativamente altas para ciertos antibióticos (Tabla 2), se debe a que *P. aeruginosa* cuenta con otros mecanismos de resistencia distintos a bombas de eflujo [4]. Por ejemplo, los mecanismos descritos anteriormente para la resistencia a la familia de antibióticos fluoroquinolonas, así como la

resistencia intrínseca a cloranfenicol y tetraciclina, la cual es mediada principalmente por la bomba de eflujo MexA – MexB – OprM y en concentraciones debajo de la CMI se genera la sobreexpresión de la bomba de eflujo MexX – MexY – OprM [13][14].

### Efecto de derivados de maleimidias en la modulación de resistencia asociada a bombas de eflujo

Previamente, se identificaron cinco moléculas de derivados de maleimidias con efecto modulador en la resistencia asociada a bombas de eflujo tanto en *Bacillus subtilis*, como en otras bacterias gramnegativas [8] [15]. En el presente trabajo se evaluaron dos de esas cinco moléculas (M10 y M11) en cepas de *P. aeruginosa* y como se puede observar en la Tabla 2, no existió modulación de resistencia asociada a bombas de eflujo, lo cual se debe posiblemente a que las bombas de eflujo de *B. subtilis* y *P. aeruginosa* pertenecen a familias diferentes de acuerdo a su estructura y funciones, por lo que, si hubo efecto en el primero de los modelos de estudio, no necesariamente podría ocurrir en el segundo, además que los otros mecanismos de resistencia a antibióticos de *P. aeruginosa* distintos a bombas de eflujo, no permiten observar si existe un efecto de reversión en la resistencia con el uso de estos dos derivados de maleimidias [4][16].

### CONCLUSIONES

Los datos obtenidos de CMI para los antibióticos evaluados confirman la presencia de bombas de eflujo tanto inducibles como constitutivas, presentes en los aislados clínicos evaluados de *P. aeruginosa*. Ante la ausencia de efecto modulador de las moléculas M10 y M11, no permite usarlas como inhibidores de bombas de eflujo en esta bacteria multiresistente.

### AGRADECIMIENTOS

A la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado por la beca recibida para la realización de este trabajo.

### REFERENCIAS

1. Khan, H. A., Baig, F. K. & Mehboob R. (2017). Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(5), pp. 478-482. doi: 10.1016/j.apjtb.2017.01.019
2. Navidinia, M. (2016). The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Journal of Paramedical Sciences*, 7(3), pp. 2008-4978. doi: 10.22037/jps.v7i3.12584.
3. Magiorakos, A. P. et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), pp. 268-281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
4. Lambert, P. A. (2002). Mechanism of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95(41), pp. 22-26.
5. Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T & Taher, Ibrahim. (2011). Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan Journal of Medicine*, 6(5870), pp. 1993-2820. doi: 10.3402/ljm.v6i0.5870.
6. López, C. T. C., Álvarez, M. A. D., Morales, M. A. R., Morales, J. R. Z., & Macías, C. L. M. (2017). Evaluación y caracterización de cepas bacterianas con resistencia a múltiples drogas provenientes de aislados clínicos en ambientes hospitalarios. *Jóvenes en la ciencia*, 3(2), 198-202.
7. Edition, A. S. N. (2012). CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. Reyes-Gualito, A. (2018) Evaluación de la actividad antimicrobiana y/o moduladora de la resistencia a antimicrobianos de cinco nuevos derivados de bisarilmaleimida en aislados clínicos de *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Enterococcus* sp. Tesis de Licenciatura.
9. Aguilar, P., Zúñiga, G., Rodríguez, B. A., Cervantes, A. L. O., Arroyo, A. E. G., Moreno, S. & Rojas, V. L. J. (2017). Identification of extensive drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains: New clone ST1725 and high-risk clone ST233. *PloS one*, 12(3), e0172882.
10. Aeschlimann, J. R. (2003). The Role of Multidrug Efflux Pumps in the Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Gram-Negative Bacteria: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 23(7), 916-924.
11. Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 337-418.
12. Patel, J., Cockerill, F., & Bradford, P. M100-S25. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015; 35 (3): 1-16.
13. Yang, X., Xing, B., Liang, C., Ye, Z., & Zhang, Y. (2015). Prevalence and fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital of South China. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 1386-1390.

14. Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2013). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 4, 422. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422>
15. Aguilar-Granados, A. (2017) Obtención de un modelo bacteriano de resistencia a múltiples fármacos en *Bacillus subtilis* para la evaluación de derivados de maleimidas con potencial efecto reversor de la resistencia. Tesis de Licenciatura.
16. Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*, 453(2), 254-267.

**TABLA 1. Fenotipo de resistencia para los aislados clínicos de *P. aeruginosa*.**

Categoría de Antibiótico	Agente antibiótico	PA54 AB	PA238 URO	PA255 URO
Aminoglicósidos	Amikacina	NS	NS	S
	Gentamicina	NS	NS	NS
	Netilmicina	ND	ND	ND
	Tobramicina	S	NS	ND
Carbapenems	Imipenem	S	NS	ND
	Meropenem	S	NS	NS
	Doripenem	ND	ND	ND
Cefalosporinas	Cefepime	S	S	NS
	Ceftazidime	S	S	NS
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacino	NS	NS	NS
	Levofloxacino	NS	NS	NS
Penicilinas antipseudomonas + inhibidores de $\beta$ -lactamasas	Piperacilina-tazobactam	S	S	NS
	Ticarcilina-ácido clavulánico	ND	ND	ND
Monobactams	Aztronam	ND	ND	ND
Ácido Fosfórico	Fosfomicina	ND	ND	ND
Polimixinas	Colistina	ND	S	ND
	Polimixina B	ND	ND	ND
<b>Posible fenotipo de resistencia</b>		<b>NA</b>	<b>MDR</b>	<b>XDR</b>

NA: No multiresistente, MDR: Multi- Drug Resistance, XDR: Extreme-Drug Resistance, PDR: Pan-Drug Resistance, NS: No susceptible, S: Susceptible, ND: No determinado.

**TABLA 2. Efecto en la modulación de la resistencia a antibióticos en aislados clínicos de *P. aeruginosa* de dos derivados de maleimidas.**

Cepa Agente antibiótico	PA54 AB			PA238 URO			PA255 URO		
	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI + M10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI + M11 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI + M10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI + M11 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI + M10 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMI + M11 ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ciprofloxacino	$\leq 4$	$\leq 4$	$\leq 4$	32	32	32	> 256	> 256	> 256
Cloranfenicol	32	32	32	> 256	> 256	> 256	> 1024	> 1024	> 1024
Gentamicina	64	64	64	16	16	16	32	32	32
Tetraciclina	16	16	16	64	64	64	> 256	> 256	> 256

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, M10: Inhibidor Molécula 10, M11: Inhibidor Molécula 11.