

## ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA REVERTIR LA MULTIRRESISTENCIA MEDIADA POR BOMBAS DE EFLUJO

Marchetti ML, Mestorino N.

Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias

Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** El objetivo central fue restablecer la susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*, de cepas de *Escherichia coli* con fenotipo multirresistente (MDR) aisladas de tambos, mediante la asociación de diferentes antimicrobianos con el inhibidor de bombas de eflujo 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP). Se obtuvieron muestras de materia fecal de animales de producción y compañía, y de pozos sépticos. A los aislamientos se les determinaron los perfiles de sensibilidad y se obtuvieron 10 cepas MDR. Se emplearon dos cepas isogénicas de *E. coli* como control de calidad (AG100A con delección total de bombas de eflujo, y AG112 con sobreexpresión de bombas) y una "wild type", AG100. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CIM) de florfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina y ampicilina por el método de microdilución seriada en caldo Luria-Bertani con y sin NMP. Los mayores porcentajes de resistencia fueron frente a tetraciclina y ampicilina. Todas las combinaciones de resistencia múltiple incluyeron a tetraciclina en su perfil. El NMP asociado a ampicilina tuvo efecto nulo. En la mayoría de las cepas *E. coli* MDR y en AG112, las CIMs de ciprofloxacina, florfenicol y tetraciclina disminuyeron  $\geq 4$  veces al combinarse NMP. La cepa "normal" no presentó cambios relevantes y frente a AG100 la CIM se mantuvo estable, independientemente de la concentración de NMP utilizada. Las cepas tetraciclina-resistente podrían tener mayor tendencia a desarrollar resistencia múltiple. Ciprofloxacina, tetraciclina y florfenicol demostraron ser sustratos de las bombas, no siendo así para ampicilina. Resulta prometedor el efecto de la asociación de NMP con florfenicol.

**Palabras clave:** *E. coli* – antimicrobianos - multirresistencia –bombas de eflujo – 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

## THERAPEUTIC ALTERNATIVES AGAINST MULTIDRUG RESISTANCE BY EFFLUX PUMP

**ABSTRACT.** The central objective was to restore the antimicrobial susceptibility *in vitro*, in strains of *Escherichia coli* with multidrug resistance phenotype (MDR), from commercial farms by combining antimicrobials with the efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP). Strains were isolated from the faeces of production and companion animals and from septic tanks. Sensibility profiles were tested to the isolations and 10 MDR strains were obtained. Laboratory strains included two isogenic mutants: AG100A, an RND type pump-deficient strain and AG112, an *acrAB* overexpressing strain) and a wild-type strain, AG100. The minimum inhibitory concentrations (MICs) of florfenicol, ciprofloxacin, tetracycline and ampicillin were determined by a serial microdilution method in Luria Bertani (LB) broth in presence or absence of NMP. The highest percentages of resistance were for tetracycline and ampicillin. All combinations of multidrug resistance included tetracycline in their profile. Ampicillin had no effect when combining to NMP. In most of the *E. coli* MDR strains and in AG112, MICs of ciprofloxacin, florfenicol and tetracycline decreased  $\geq 4$ -fold with NMP. There was no relevant change against wild type strain and MIC remained the same against AG100, independently of NMP's concentrations. Tetracycline resistance strains are probably able to become multiresistant. Ciprofloxacin, tetracycline and florfenicol demonstrated be efflux pumps substrates, but not ampicillin. It is promising the combination of NMP with florfenicol.

**Key words:** *E. coli* – antimicrobials – multidrug resistance –efflux pumps – 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

Fecha de recepción: 25/06/13

Fecha de aprobación: 01/10/13

**Dirección para correspondencia:** M Marchetti, Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** [mlauramarchetti@fcv.unlp.edu.ar](mailto:mlauramarchetti@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos representa un problema extremadamente severo para la salud pública. Existen determinados tipos de infecciones en seres humanos, generadas por gérmenes multirresistentes, para las que ya no hay terapia eficaz (1, 2, 3, 4). Las causas de esta ineficacia provienen, entre otras, de la mala utilización de los antimicrobianos (uso innecesario, dosis bajas, tratamientos cortos, intervalos incorrectos, etc.) en todos los ámbitos de la salud, a lo que se le suma en medicina veterinaria el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento, fundamentalmente en explotaciones intensivas (5, 6, 7, 8).

La resistencia a los antimicrobianos puede ser adquirida por una determinada bacteria por mutación, o a través del intercambio de material genético entre microorganismos patógenos, comensales y/o zoonóticos resistentes.

A lo largo de una cadena de transferencia compleja, los determinantes genéticos de resistencia bacteriana, pueden pasar de un hospedador a otro; esto es, de animal en animal, de animal a hombre y eventualmente, de hombre a hombre e incluso localizarse en el ambiente. Este hecho implica selección de resistencia por una primera bacteria, y la posterior transferencia vertical a su descendencia, con el riesgo de la posible transferencia horizontal a otros microorganismos (9).

*Escherichia coli* fue seleccionada como indicador de resistencia debido a que es uno de los grupos más extendidos de la microbiota animal y del hombre. Su monitoreo, permite conocer qué antimicrobianos están generando resistencia, evitar riesgos en salud pública, disminuir el fracaso terapéutico y evitar pérdidas económicas al productor (10).

La emergencia de resistencia en la microbiota normal constituye un riesgo inminente para la eficacia antimicrobiana en animales de consumo (9, 11). Es por ello muy importante resaltar que la resistencia a los antibióticos no es una característica propia de los microorganismos patógenos. Los genes de resistencia pueden ser adquiridos o seleccionados tanto en bacterias patógenas como en las bacterias comensales luego de una exposición a antimicrobianos, siendo la flora comensal de enorme importancia epidemiológica. La importancia de este último se documentó a través del aislamiento de grandes cantidades de bacterias comensales resistentes en intestino de individuos expuestos a ambientes donde la utilización de antimicrobianos es muy frecuente como en granjas y/o hospitales (12, 13).

La resistencia bacteriana es manifiesta en los animales mantenidos en condiciones intensivas donde los antibióticos son de aplicación corriente (cerdos, pollos parrilleros, vacas de tambos, feedlot) (9).

*E. coli* en particular, es una de las bacterias comensales con mayores posibilidades de generar resistencia en el campo veterinario y humano. La multirresistencia es la más grave expresión de resistencia desde el punto de vista clínico. Uno de los mecanismos de multirresistencia en *E. coli* a antibióticos lipofílicos/anfifílicos está representado por la sobreexpresión de bombas de eflujo. Estas bombas expulsan al antimicrobiano hacia el exterior de la bacteria impidiéndole así ejercer su efecto (9, 14, 15, 16).

El eflujo activo por medio de bombas es un mecanismo de resistencia ubicuo, ampliamente distribuido entre los microorganismos, y que interviene en el bombeo de numerosos antibióticos. Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples clases (de allí el término Multiple Drug Resistance: MDR) (17). La resistencia a múltiples drogas en bacterias patógenas –y también en comensales– se ha convertido en una amenaza creciente para la salud pública (18, 19, 20).

Se han observado incrementos adicionales en la concentración inhibitoria mínima de los antibióticos luego de haberse generado sobreexpresión de bombas de eflujo de diferentes clases dando lugar a un fenotipo multirresistente (MDR) (21).

La inactivación de dichos sistemas puede producir un aumento en la concentración de determinados sustratos marcadores en el interior de los microorganismos (22, 23, 24, 25). Esta característica los convierte, por lo tanto, en blancos ideales para la búsqueda de nuevos inhibidores de los sistemas de bombeo, que logren que las bacterias que portan estos sistemas sean más sensibles a los antimicrobianos actualmente existentes en el repertorio clínico (24).

La inhibición de dicho mecanismo puede transformarse en una prometedora estrategia para restaurar la actividad de los antimicrobianos que resulten sustrato de ese sistema. Existen diversas maneras de modificar la resistencia por eflujo entre las que se encuentra el uso de inhibidores de bombas (EPI del inglés *efflux pump inhibitor*).

Entre ellos se encuentra el 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) que ha sido estudiado por diversos autores en diferentes especies bacterianas como *E. coli* (24), *Enterobacter aerogenes* (25), *Campylobacter jejuni* (26). Es una arylpiperazina que funciona como inhibidor de bombas de eflujo bacterianas de amplio espectro. Esta fue probada en aislamientos clínicos de *E. coli* de origen humano posteriormente sometidos a presión antimicrobiana para lograr fenotipos MDR (24). Sin embargo, no existen estudios acerca de su efecto sobre cepas de *E. coli* MDR comensales

de origen animal, potenciales transmisores de multirresistencia en forma horizontal, de enorme significación epidemiológica.

Hasta el momento los antimicrobianos evaluados en combinación con NMP fueron levofloxacina, tetraciclina, cloranfenicol, oxacilina, claritromicina, rifampicina y linezolid frente a *E. coli* (22, 23, 24, 25). Pero no existen datos acerca de su acción frente a ampicilina, ciprofloxacina y florfenicol, antimicrobianos de amplio uso en medicina veterinaria, potenciales seleccionadores de determinantes de resistencia y reconocidos sustratos de las bombas de eflujo.

El objetivo del presente trabajo fue, a partir de estudios de susceptibilidad *in vitro* de cepas de *E. coli* aisladas en producciones tamberas de la provincia de Buenos Aires, comparar los perfiles de resistencia entre animales-hombre y ambiente; y establecer datos de prevalencia de antibióticorresistencia en las zonas evaluadas. En la actualidad son escasos los datos existentes en nuestro país, acerca del monitoreo en medicina veterinaria de cepas de *E. coli* usadas como indicadoras de resistencia y multirresistencia de origen animal.

De manera que a partir del hallazgo de cepas de *E. coli* de campo con fenotipo multirresistente, nos propusimos como objetivo central, evaluar *in vitro* la interacción del inhibidor de bombas de eflujo 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) con antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias, usando como control cepas de *E. coli* modificadas genéticamente con diferentes niveles de expresión de bombas de eflujo. Se incluyeron en el presente estudio los antimicrobianos utilizados corrientemente en medicina veterinaria y de gran impacto en salud pública.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (Sigma-Aldrich); caldo Luria-Bertani (LB) (10 g de tripton, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl por litro de agua destilada); caldo y agar Müeller Hinton (Laboratorios Britania, Argentina); discos de antibiograma amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprima-sulfametoxazol (1.25-23.75 µg), ampicilina (10 µg), de Laboratorios Britania, Argentina. Florfenicol (30 µg) y ceftiofur (30 µg) de Oxoid, Inglaterra. Ampicilina 96% p/p (Fluka, Buenos Aires, Argentina), tetraciclina 97.03% p/p (Parafarm, Buenos Aires, Argentina), florfenicol 99.3% p/p (Romikin S.A., Buenos Aires, Argentina), ciprofloxacina 99.8% p/p (Parafam, Buenos Aires, Argentina).

## PRUEBA CUALITATIVA DE SUSCEPTIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN PLACA

### Selección de cepas de campo.

Se utilizaron cepas obtenidas a partir de un estudio no experimental observacional de tipo transversal realizado en tambos de la provincia de Buenos Aires. Los tambos seleccionados estaban ubicados en las localidades de Tandil, San Vicente, Trenque Lauquen y Luján. Se obtuvieron muestras de materia fecal mediante hisopado rectal a partir de animales sanos en producción (vacas en ordeño), mascotas (perros y gatos) y terneros de destete que consumían leche de descarté. Se obtuvieron, también, muestras de los pozos sépticos (representativas de los habitantes del lugar) en frascos limpios y estériles, siguiendo los protocolos correspondientes al Manual OPS-OMS 2004 (27, 28).

### Aislamiento y tipificación bioquímica.

Se realizó aislamiento en medio sólido selectivo diferencial EMB, tinción de Gram y tipificación bioquímica de cada cepa (IMViC). Fueron seleccionados únicamente aquellos aislamientos clasificados dentro de la especie *Escherichia coli*.

### Procedimiento.

Los aislamientos obtenidos a partir de la biotipificación pertenecientes a la especie *E. coli*, fueron sometidos a pruebas de susceptibilidad *in vitro* mediante difusión en agar frente a ocho antimicrobianos seleccionados por su frecuente uso, con el fin de obtener cepas resistentes a tres o más antimicrobianos, es decir multirresistentes.

El procedimiento se llevó a cabo en placas de Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo Müeller-Hinton inoculado con las cepas aisladas a una concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Se colocaron cuatro discos de antibiograma por placa, se incubaron a 35°C durante 20 hs y luego se procedió a realizar la lectura mediante la utilización de un calibre de precisión midiendo el área de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

Con el fin de monitorear las pruebas y obtener resultados confiables, se utilizó la cepa de referencia *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 con sensibilidad conocida para los antimicrobianos evaluados. El punto de corte utilizado para categorizar las cepas como sensibles o resistentes a cada antimicrobiano fue el recomendado por CLSI para *E. coli* (29, 30).

La selección de los antimicrobianos para las pruebas de susceptibilidad se fundamentó en encuestas sobre los agentes antibacterianos más utilizados en los últimos 12 meses, realizadas a encargados y/o productores de los establecimientos analizados (29, 30). Con los datos obtenidos de las encuestas se priorizó a aquellos antimicrobianos factibles de ser sustratos de las bombas de eflujo bacterianas.

Finalmente, siguiendo las recomenda-

ciones de la lista de agentes antimicrobianos establecidos para la realización de los estudios de susceptibilidad en medicina veterinaria detallado en los documentos M31-A2 (31) y M31-A3 *Performance standards for antimicrobial dilution and susceptibility tests for bacteria isolated from animals* (29) y de ciprofloxacina aportada por el M100-S19 *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (30), se seleccionaron los siguientes discos con antimicrobianos: ciprofloxacina (5 µg), ceftiofur (30 µg), florfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (20-10 µg), ampicilina (10 µg), y trimetoprima-sulfametoxazol (25 µg) (Lab. Britania S.A.).

## PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD CUANTITATIVA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

### Cepas bacterianas

Las cepas de laboratorio empleadas fueron 10 aislamientos de *E. coli* multirresistentes (MDR) obtenidas a partir de la prueba cualitativa de susceptibilidad por difusión en placa, dos cepas mutantes isogénicas (AG112 y AG100A), una cepa "wild type", AG100 y *E. coli* ATCC 25922.

Se utilizaron dos cepas de *E. coli* modificadas genéticamente como control de calidad y una con expresión "normal de bombas" para la puesta a punto de la técnica de determinación de susceptibilidad por microdilución con inhibidor. Estas cepas fueron AG112 con sobreexpresión de bombas de flujo, AG100A con delección total de todas las bombas de flujo y AG100 con fenotipo "wild type".

Al igual que en el método de determinación de susceptibilidad por difusión, la cepa de referencia para el control de calidad fue *E. coli* ATCC 25922 (29).

### Procedimiento

Se procedió a la determinación de la CIM a través de la prueba cuantitativa de microdilución en caldo, basada en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de antimicrobiano en policubetas.

El caldo utilizado fue Luria Bertani (LB) y los antimicrobianos ensayados fueron tetraciclina, florfenicol, ciprofloxacina y ampicilina. La selección de los antimicrobianos se realizó en función de los fenotipos de resistencia de las cepas MDR (Tabla 1).

El rango de diluciones para determinar la CIM de cada antimicrobiano solo, fue de 256 µg/mL a 0.007 µg/mL.

Se calculó la mínima concentración efectiva (MEC) de 1-(1-naphthylmethyl)piperazine mediante su combinación con cada antimicrobiano

(a igual rango de diluciones que para la CIM -256 µg/mL a 0.007 µg/mL-), a cinco diferentes concentraciones de NMP: 6.25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL y 100 µg/mL.

Paralelamente, se evaluó la actividad antimicrobiana intrínseca del inhibidor de bombas (es decir, sin antimicrobiano) frente a cada aislamiento problema. Para lo cual se emplearon diluciones en un rango de 800 µg/mL a 1.56 µg/mL.

Se preparó el inóculo por método directo a partir de una colonia aislada (29, 30). La densidad de dicha suspensión fue ajustada a la escala 0.5 de Mc Farland, es decir,  $1 \text{ a } 2 \times 10^8$  UFC/mL. Se diluyó en caldo LB hasta obtener una concentración final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

La determinación de la CIM fue realizada por observación directa del primer pocillo que no presentó turbidez (29, 30).

## RESULTADOS

### PREVALENCIA E INCIDENCIA DE MULTIRRESISTENCIA EN LOS TAMBOS ANALIZADOS

En los tambos de la provincia de Buenos Aires analizados, la resistencia a tetraciclina resultó ser la de mayor prevalencia, 10.5 % de la resistencia total, seguida por un 2.2 % de resistencia bacteriana a ampicilina. Encontramos un porcentaje menor de resistencia a trimetoprima - sulfametoxazol (1.6%), ciprofloxacina (0.7%), florfenicol (0.8%) y amoxicilina/ácido clavulánico (0.1%). No se halló resistencia frente a ceftiofur y gentamicina.

En cuanto a la resistencia encontrada a más de un antimicrobiano, los resultados fueron: 2.2% frente a dos antimicrobianos al mismo tiempo y 1.5% frente a tres o más agentes antibacterianos, es decir multirresistencia. Las cepas multirresistentes fueron 10 en total y pertenecían a vacas en ordeño, terneros y animales domésticos (perros). No se hallaron cepas multirresistentes en las muestras de los pozos sépticos en ninguna de las explotaciones analizadas.

Los perfiles de resistencia y la prevalencia se detallan en la Tabla I y en la Figura 1, respectivamente.

### Efectos de la combinación de los antimicrobianos con el inhibidor de bombas NMP en las cepas isogénicas

No se observaron modificaciones en la concentración mínima inhibitoria cuando se combinó NMP con ampicilina frente a ninguna de las cepas isogénicas ni al fenotipo "normal". La CIM fue la misma para cada una de las cepas genéticamente modificadas, independientemente de la expresión de bombas de flujo y de la concentración de NMP incorporado. Es decir, no se modificó en abso-

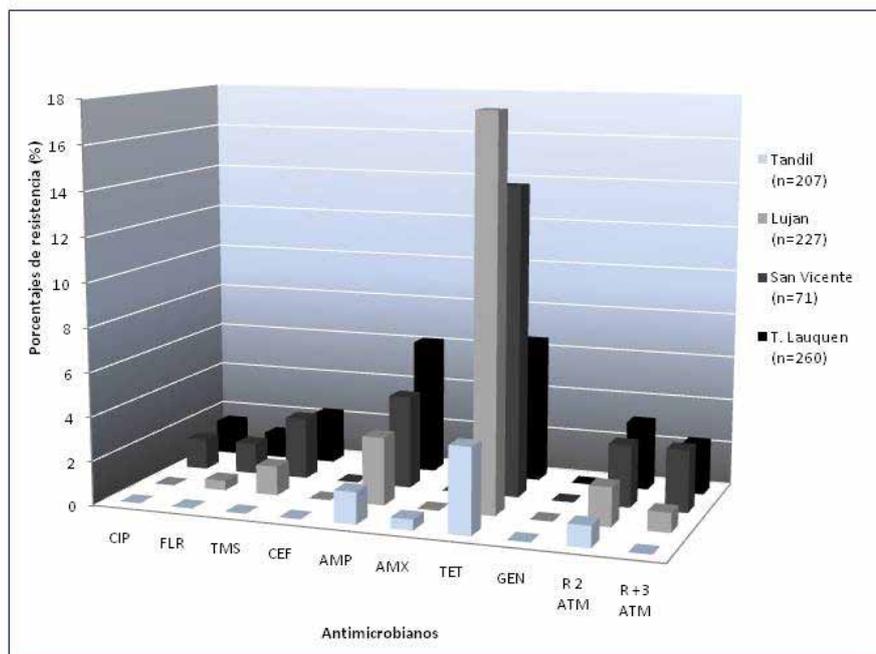


Figura 1. Porcentajes de resistencia antimicrobiana en 4 tambos de la provincia de Buenos Aires CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. TMS: Trimetoprima-sulfametoxazol. CEF: Ceftiofur. AMP: Ampicilina. AMX: Amoxicilina-ácido clavulánico. TET: Tetraciclina. GEN: Gentamicina. R 2 ATM: Resistente a dos antimicrobianos al mismo tiempo. R 3 ATM: Resistente a 3 antimicrobianos al mismo tiempo.

Tabla I. Fenotipos de cepas de *E. coli* multirresistentes en tambos de la provincia de Buenos Aires

Localización	Muestras	Número de cepas	Perfiles de resistencia
San Vicente	vaca en ordeño	1	CIP TMS AMP TET
	vaca en ordeño	1	FLR TMS TET
Lujan	perro	1	FLR TMS AMP TET
	perro	1	TMS AMP TET
Trenque Lauquen	vaca en ordeño	1	FLR AMP TET
	vaca en ordeño	1	FLR TMS TET
	terneros	3	CIP TMS AMP TET
	vaca en ordeño	1	CIP TMS AMP TET

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. TMS: Trimetoprima-sulfametoxazol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina.

luto el perfil de resistencia a ampicilina, de los microorganismos analizados, al inhibir el eflujo de las bombas bacterianas.

Sin embargo, los otros antimicrobianos evaluados se comportaron de manera diferente, las CIMs se redujeron al menos 2 veces o más cuando se combinó el antimicrobiano con el NMP a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL, hallazgo que se observa claramente en la cepa isogénica de *E. coli* con sobreexpresión de bombas de eflujo *acrAB*, AG112.

En el caso particular de florfenicol, se logró reducir su CIM 16 veces frente a la cepa AG112,

al combinarse con 50 µg/mL de NMP y 32 veces con 100 µg/mL del mismo. Frente a AG100 (cepa "wild type"), la CIM de florfenicol se redujo 4 y 8 veces cuando se combinó con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP respectivamente.

Para tetraciclina, la concentración de 50 µg/mL de NMP disminuyó 4 veces su CIM frente a AG112 y la incorporación de 100 µg/mL de NMP la redujo 16 veces. Frente a AG100, la CIM de tetraciclina fue reducida 2 veces en presencia de NMP tanto con 50 µg/mL como con 100 µg/mL.

Finalmente cuando NMP se combinó a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL con

ciprofloxacina frente a la cepa AG112, se obtuvo una disminución de la CIM de ciprofloxacina de 2 y 4 veces, respectivamente. La CIM de ciprofloxacina asociada a NMP frente a la cepa AG100 se modificó de manera similar que en el caso de tetraciclina, es decir decreció 2 veces frente las dos concentraciones mayores de NMP.

No se observó ningún tipo de actividad sinérgica de NMP en combinación con ninguno de los antimicrobianos evaluados, frente a la cepa de *E. coli* isogénica con delección total de bombas de eflujo *acrAB* (AG100A). En ningún caso las CIMs de los antimicrobianos se vio modificada frente a esta cepa.

Cuando NMP fue evaluado solo, sin el agregado de antimicrobianos, la CIM del inhibidor fue 400 µg/mL en las cepas de *E. coli* genéticamente modificadas, en la wild type y en la *E. coli* ATCC 25922. Los resultados mencionados se detallan en la Tabla II.

Se realizó la comparación del resultado obtenido al dividir las CIMs de los antibacterianos frente a las cepas de referencia con y sin sobreexpresión de bombas (AG100A y AG112); y valores de las CIMs obtenidas de los mismos antimicrobianos frente a la cepa AG112 con y sin el agregado de NMP a la concentración de 100 µg/mL (Tabla III); representado con la siguiente ecuación:

$$\frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG100A}} \approx \frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG112+NMP}}$$

$$\frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG100A}} \approx \frac{CIMs_{ATM-AG112}}{CIMs_{ATM-AG112+NMP}}$$

Se observó claramente que al comparar estas razones, el agregado de 100 µg/mL de NMP, permitió bloquear la totalidad de las bombas, logrando que las CIMs de los antibacterianos con inhibidor frente a la cepa AG112, se igualen a las CIMs obtenidas sin NMP frente a la cepa AG100 con delección total de bombas.

**EFECTOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS ANTIMICROBIANOS CON EL INHIBIDOR DE BOMBAS NMP EN LAS CEPAS DE CAMPO DE *E. coli* MDR**

Para un mejor análisis de los resultados, se subclasificaron los 10 aislamientos de *E. coli* MDR basándonos en los perfiles de resistencia de cada uno de ellos, de manera que las cepas se subdividieron en: 5 cepas *MDR-C* (ciprofloxacina resistentes), 5 cepas *MDR-F* (florfenicol resistentes), 8 cepas *MDR-A* (ampicilina resistentes), y 10 cepas *MDR-T* (tetraciclina resistente).

No se observaron modificaciones en la CIM de ampicilina en combinación con NMP frente a las cepas de *E. coli* MDR-A. La incorpo-

Tabla II. Efecto de NMP en las CIMs de los antimicrobianos en cepas isogénicas -AG100A y AG112-; y en un fenotipo wild type (AG100)

Cepa	Genotipo	Expresión de bombas <i>acrAB</i>	ATB	CIM (µg/ml) frente a concentraciones de NMP(µg/ml)						NMP CIM (µg/ml)	Veces que decrece la CIM	
				0	6,25	12,5	25	50	100		50	100
											µg/ml NMP	µg/ml NMP
AG100	wild type	normal	AMP	2	2	2	2	2	2	400	0	0
			CIP	0.015	0.015	0.015	0.007	0.007	0.007	400	2	2
			TET	1	1	1	0,5	0,5	0,5	400	2	2
			FLR	8	8	4	4	2	1	400	4	8
AG100A	AG100Δ <i>acrAB</i>	delección	AMP	1	1	1	1	1	1	400	0	0
			CIP	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	400	0	0
			TET	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	400	0	0
			FLR	1	1	1	1	1	1	400	0	0
AG112	AG100 <i>marR</i>	Sobreexpresión	AMP	4	4	4	4	4	4	400	0	0
			CIP	0.062	0.062	0.062	0.031	0.031	0.015	400	2	4
			TET	8	8	8	4	2	0,5	400	4	16
			FLR	32	32	16	16	2	1	400	16	32

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina. ATB: antibióticos. CIM: concentración inhibitoria mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazina

Tabla III. Comparación entre la razón obtenida al dividir las CIMs de las cepas AG112 y AG100A; y la razón entre las CIMs frente a AG112 con y sin NMP

Antibiótico	Proporción o razón entra las CIMs				
	Con o sin <i>acrAB-TolC</i> para AG112 y AG100A	Con y sin NMP (50 µg/mL) para		Con y sin NMP (100 µg/mL) para	
		AG112	AG100A	AG112	AG100A
FLR	32	16	1	32	1
CIP	4	2	1	4	1
TET	16	4	1	16	1
AMP	4	1	1	1	1

FLR: Florfenicol. CIP: Ciprofloxacina. TET: Tetraciclina. CEF: Ceftiofur. AMP: Ampicilina. AMC: Amoxicilina-ácido clavulánico. GEN: Gentamicina. TMS: Trimetoprima-sulfametoxazol. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine

Tabla IV. Efecto de 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) en la CIM de los antimicrobianos en cepas de campo de *E. coli* MDR aisladas de animales

ración de concentraciones crecientes de NMP no modificó el perfil de susceptibilidad frente a ampicilina.

En la mayoría de las cepas de *E. coli* MDR-F, la CIM de florfenicol disminuyó 4 veces al combinarse con las dos concentraciones mayores de NMP. Una cepa de *E. coli* MDR-F en particular, manifestó una modificación en su perfil de susceptibilidad con una reducción de la CIM de florfenicol de 8 y 16 veces con 50 µg/mL y 100 µg/mL de NMP, respectivamente.

Para el caso de tetraciclina se obtuvo una disminución de 4 veces la CIM con 100 µg/mL de NMP en todas las cepas *E. coli* MDR-T. Sin embargo cuando el antimicrobiano fue combinado con 50 µg/mL de NMP, solo en 6 de las 10 cepas *E. coli* MDR-T la CIM de tetraciclina se redujo 4 veces.

La concentración de NMP que permitió una disminución de la CIM de ciprofloxacina de 4 veces en todas las cepas *E. coli* MDR-C, fue 100 µg/mL. Solo en 2 de las 5 cepas *E. coli* MDR-C se obtuvo un resultado similar (descenso de 4 veces la CIM de ciprofloxacina) con 50 µg/mL de NMP.

Cuando NMP fue evaluado solo frente a las cepas de campo MDR, sin el agregado de antimicrobianos, la CIM del inhibidor fue  $\geq 800$  µg/mL en todos los casos.

En la Tabla IV se presentan las CIMs de los antimicrobianos asociados a 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) frente a cepas de campo MDR aisladas de animales.

## DISCUSIÓN

Los resultados de susceptibilidad obtenidos en este estudio mediante antibiograma, son comparables con los informados por otros autores en cerdos y/o bovinos de Argentina, Chile, Japón,

Serbia, EEUU, donde se hallaron altos niveles de resistencia frente a tetraciclina y ampicilina (32, 33, 34, 35, 36).

Todas las combinaciones de resistencia múltiple incluyen en su perfil a la tetraciclina, resultados similares fueron hallados en otros trabajos (36). Esto puede sugerir que las cepas de *E. coli* tetraciclina-resistentes podrían tener mayor tendencia a volverse resistentes frente a otros antimicrobianos simultáneamente. Este fenómeno podría deberse a la capacidad intrínseca que tienen las tetraciclinas de ser inductores de la mutación de la región *marR* cromosómica. MarR es una proteína que normalmente produce una acción reguladora negativa reprimiendo al operador *mar*. El flujo es dependiente del locus *marA* dando lugar a resistencia múltiple. Normalmente *mar* es reprimido por el MarR, pero puede ser desreprimido por compuestos tales como tetraciclinas, cloranfenicol y salicilatos (37, 38, 39, 40).

Algunos autores como Lomovskaya et al (2000), afirman que los betalactámicos son sustratos de las bombas de flujo tipo RND (41). Demostraron la influencia de la presencia de las bombas de flujo tipo RND en la susceptibilidad de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a través de modificaciones genéticas haciendo que las cepas tengan diferentes niveles de expresión de las mismas. Sin embargo, el bloqueo de estos sistemas por un inhibidor como el NMP no modificó el resultado de la CIM en nuestro estudio. Este resultado coincide con Bina et al (2009) que no obtuvo modificación en la CIM de ampicilina al combinarlo con NMP frente a *Vibrio cholerae* (42).

Está demostrado que el flujo tiene un papel clave en la cooperación con las enzimas  $\beta$ -lactamasas, pues permite que el sistema enzimático no se sature (14, 43, 44, 45).

Localidad	Muestra	Perfiles de Resistencia		ATB	CIP MIC (µg/ml) frente a concentraciones de NMP(µg/ml)						NMP MIC (µg/ml)	Veces que decrece la CIM con NMP	
					0	6,25	12,5	25	50	100		50 µg/ml	100 µg/ml
San Vicente	VO 1	FLR	CIP	FLR	16	16	16	8	2	1	≥800	8	16
				AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
		SXT	AMP	CIP	32	32	32	16	8	8	≥800	4	4
				TET	64	64	64	32	16	16	≥800	4	4
	VO 2	FLR	SXT	FLR	256	256	128	128	64	64	≥800	4	4
				TET	256	128	128	128	64	32	≥800	4	8
Lujan	PE 1	FLR	SXT	FLR	256	256	256	256	128	128	≥800	2	2
				AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
		TET	256	256	256	128	128	64	≥800	2	4		
	PE 2	SXT	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				TET	128	128	128	64	64	32	≥800	2	4
		TET	256	256	256	128	128	64	≥800	2	4		
Trenque Lauquen	VO 1	FLR	SXT	FLR	256	128	128	128	64	64	≥800	4	4
				TET	64	64	64	32	16	16	≥800	4	4
	VO 2	FLR	AMP	FLR	256	128	128	128	64	64	≥800	4	4
				AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				TET	256	256	128	128	64	64	≥800	4	4
	TER 1	CIP	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				CIP	128	128	128	64	64	32	≥800	2	4
				TET	256	256	256	256	64	64	≥800	4	4
	TER 2	CIP	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
				CIP	128	128	128	64	64	32	≥800	2	4
				TET	256	256	256	128	128	64	≥800	2	4
	TER 3	CIP	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1
CIP				128	128	128	64	64	32	≥800	2	4	
TET				256	256	256	128	128	64	≥800	2	4	
TER 4	CIP	AMP	AMP	256	256	256	256	256	256	≥800	1	1	
			CIP	128	128	128	64	32	32	≥800	4	4	
			TET	256	256	128	128	64	64	≥800	4	4	

CIP: Ciprofloxacina. FLR: Florfenicol. AMP: Ampicilina. TET: Tetraciclina. ATB: antibióticos. CIM: Concentración Inhibitoria Mínima. NMP: 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine. Muestras: VO: vaca en ordeño. TER: ternero. PE: perro. SV: San Vicente. L: Luján. TQ: Trenque Lauquen.

Sin embargo, como mecanismo de resistencia único, los sistemas de eflujo, frente a dicho grupo de antimicrobianos β-lactámicos, no genera niveles de resistencia significativos (41, 46, 47, 48).

Por otro lado, ciprofloxacina, tetraciclina y florfenicol pusieron en evidencia, claramente, ser sustratos de las bombas. Nuestros resultados demostraron que puede obtenerse un bloqueo total de las bombas al combinar los antimicrobianos con 100 µg/mL de NMP. Se generaron descensos notables de la CIMs de 4 veces o más en la cepa AG112 y en la mayoría de las cepas salvajes de *E. coli* con fenotipo *MDR*.

Diversos autores evaluaron la modificación de la CIM para fluoroquinolonas (levofloxacina) en aislamientos clínicos humanos de *P. aeruginosa* (25, 49) y *E. coli* (15, 24, 25) con resultados similares a los nuestros. Es decir, un descenso de 4 veces la CIM ha sido establecido como punto de corte indicador del efecto del bloqueo de las bombas por parte del inhibidor.

Considerando que la sobreexpresión de bombas de eflujo es el único mecanismo de resistencia presente en la cepa AG112, los resultados de la CIM demostraron que NMP manifiesta un importante sinergismo al combinarse con florfenicol en particular. La reducción de la CIM modificó

el perfil de resistencia de la cepa descendiendo la misma de manera tal, que la cepa recuperó la susceptibilidad por completo al combinar el antimicrobiano con la concentración mayor de NMP. Si bien estos resultados son preliminares, pueden tener una proyección sumamente importante, debido a que el florfenicol tiene un uso muy extendido en nuestro país en medicina veterinaria tanto en explotaciones bovinas, porcinas y avícolas. El poder revertir la resistencia a florfenicol frente a microorganismos gram-negativos de importancia en salud pública, permitiría utilizar en condiciones de total susceptibilidad microbiana una molécula con excelentes características para el tratamiento de enteritis infecciosas relacionadas con *E. coli* enteropatógena y *Salmonella*; y de enfermedades respiratorias causadas por *Pasteurella* spp. entre otras (50).

Los resultados de la MEC del inhibidor para las cepas isogénicas y los aislamientos de cepas salvajes de *E. coli* MDR coinciden con otros autores que trabajaron con *E. coli* patógeno proveniente de aislamientos clínicos (24, 25, 51), con *Acinetobacter baumannii* (52) y con *Campylobacter* spp. (26). En todos los casos la concentración de NMP que redujo un mínimo de cuatro veces la CIM del antimicrobiano fue de 100 µg/mL.

En cuanto a la CIM obtenida para NMP también existe coincidencia con otros trabajos publicados (24, 52), un valor tan elevado es indicador de que el inhibidor por sí solo no tiene acción antimicrobiana.

Por sí solos los sistemas de eflujo confieren de bajos a moderados niveles de resistencia (incrementos de la CIM de 1 a 64 veces). Razón por la cual su relevancia fue cuestionada. En general estos sistemas de resistencia se presentan en cooperación con otros mecanismos para conferir, no solamente elevados niveles de resistencia, sino también un mayor espectro de acción (21, 44). Sin embargo, en el caso de florfenicol cuando las bombas de eflujo se presentan como mecanismo principal responsable de la resistencia bacteriana, es posible retornar completamente el fenotipo hacia la susceptibilidad. Lo mencionado quedó claramente expuesto para la cepa con sobreexpresión de bombas.

Esto demuestra que NMP puede revertir parcialmente la multiresistencia a los antimicrobianos en *E. coli*, probablemente por no presentarse como mecanismo único de resistencia sino por complementar la acción de otros mecanismos de defensa, lo cual coincide con los resultados presentados por Kern et al en 2006, quienes emplearon NMP combinado con tetraciclina y levofloxacina (24).

Existe creciente evidencia acerca del significativo rol del eflujo por sobreexpresión de bombas en la resistencia bacteriana (21, 53, 54, 55, 56). En el presente trabajo quedó demostrado que el

inhibidor de bombas de eflujo NMP puede revertir la resistencia parcial o completamente hacia un perfil susceptible en bacterias multiresistentes. Es por ello que este mecanismo de resistencia debe ser tenido en cuenta en el desarrollo y diseño de futuros antimicrobianos o estrategias antimicrobianas con el fin de maximizar la eficacia y disminuir el desarrollo de resistencia a múltiples drogas.

Por todo lo expuesto, consideramos de relevancia continuar con la investigación del inhibidor de bombas NMP debido a que no existen en la actualidad estudios *in vivo* de ningún tipo. En forma preliminar podríamos decir que los pasos siguientes a esta investigación serían estudios *ex vivo*, que permitan una aproximación farmacocinética-farmacodinámica, estudios *in vivo* para determinar la seguridad de la droga, y establecer la concentración máxima capaz de producir eficacia sin toxicidad en asociación con el antimicrobiano.

Los resultados presentados en este trabajo podrán sentar las bases de nuevas estrategias para el combate contra los microorganismos, permitiendo la utilización de antimicrobianos en forma racional, utilizando al máximo sus características terapéuticas y minimizando la emergencia y diseminación de cepas resistentes.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento al Prof. Dr. Jorge Errecalde por guiarnos incondicionalmente en este camino.

Especial agradecimiento al Prof. Hiroshi Nikaido de la Universidad de California, Berkeley; y a Laura McMurry de Tufts University School of Medicine, Boston quienes gentilmente nos donaron las cepas isogénicas y la cepa con fenotipo wild type.

Nuestra gratitud a la entidad CEDIQUIFA por el "Premio a trabajo científico" recibido el pasado octubre del año 2011, que sentó las bases del presente estudio.

Los autores agradecen a CONICET por su colaboración, garantizando durante los periodos de 2006-2011 la beca doctoral a la Médica Veterinaria María Laura Marchetti. Las investigaciones en el Departamento de Farmacología son parcialmente solventadas por la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires, Argentina) (V180).

Nuestro agradecimiento también a Bárbara Huber, Nadia Remezovsky y los docentes e investigadores de la Cátedra de Farmacología por su colaboración constante.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Casal M, Causse M, Solís F, Rodríguez F, Casall M. Investigación de las resistencias a antimicrobianos en *Enterococcus faecalis*. Rev Esp Quimioter 2009; 22 (3):117-19.

2. Piffano Costa Pellegrino F, Martins Teixeira L, Siqueira Carvalho M, Nouer S, Pinto de Oliveira M, Mello Sampaio J et al. Occurrence of a Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clone in Different Hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clinical Microbiology* 2002; 40 (7): 2420–24.
3. Urvashi S & Dutta R. Antimicrobial resistance pattern of *Shigella* species over five years at a tertiary-care Teaching Hospital in North India. *J Health Popul Nutr* 2011; 29 (3): 292-5
4. Zhanel G, DeCorby M, Adam H, Mulvey M, McCracken M, Lagace-Wiens P et al. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: Results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54 (11): 4684–93.
5. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en salud pública, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO. Roma, Italia, 2004.
6. Mestorino N. Uso de antimicrobianos en grandes animales y en alimentos agropecuarios y su implicancia en humanos. En: Documento final “La multirresistencia: un problema a abordar en forma interdisciplinaria e interinstitucional”, Taller Post-Congreso SADI-INE 2011: 24-30.
7. Miller MA & Flynn WT. Regulation of antibiotic use in animals. In: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, eds. *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 3rd ed. Ames: Iowa State University Press 2000: 760-73.
8. Visek W. The mode of growth promotion by antibiotics. *J Anim Sci* 1978; 46: 1447-69.
9. Prescott J, Baggot J, Walter, R. *Terapéutica antimicrobiana en medicina veterinaria*. 3° edición. Argentina. Ed. Intermédica. Buenos Aires 2002.
10. Moreno MA, Domínguez L, Teshager T, Herrero IA, Porrero MC. Antibiotic resistance monitoring. The Spanish programme. The VAV Network. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14 (4): 285-90.
11. Nikolich MP, Hong G, Shoemaker NB, Salyers AA. Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 3255-326.
12. Levy SB. Emergence of antibiotic-resistance bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants. *J Infect Dis* 1978; 137: 689-90.
13. van den Bogaard AE, Jensen LB, Stobbering EE. Vancomycin-resistant enterococci in turkeys and farmers. *N Engl J Med* 1997; 337:1558–59.
14. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gramnegative bacteria. *J Bacteriol* 1996; 178: 5853-59.
15. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 544-45.
16. Yu EW, Aires JR, Nikaido H. AcrB multidrug efflux puma of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of excepcional flexibility generates its extremely Wide substrate specificity. *J Bacteriol* 2003; 185: 5657-64.
17. Marchetti, ML, Mestorino N, Errecalde J. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *Analecta Vet*, 2011 31 (2): 40-53.
18. Delcour A. Outer membrana permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 808–16.
19. Poole K. Efflux mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 20-51.
20. Scatamburlo Moreira M, Chartone de Souza E, Alencar de Moraes C. Multidrug efflux systems in gram – negative bacteria. *Braz J Med Biol Res* 2004; 35: 19-28.
21. Webber M, Piddock L. The importante of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 9-11.
22. Bean DC & Wareham DW. Paradoxical effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine on resistance to tetracyclines in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 349-52.
23. Coban AY. Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine to MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant gram-negative bacteria. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43: 457-61.
24. Kern W, Steinke P, Schumacher A, Schuster S, Baum H, Bohnert J. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 339-43.
25. Schumacher A, Steinke P, Bohnert J, Akova M, Jonas D, Kern W. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 344–48.
26. Hannula M, Hanninen ML. Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Med Microbiol* 2008; 57:851-5.
27. OIE. Collection and shipment of diagnostic specimens. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*, 6th edition 2008. Paris, France.
28. OPS. Manual para análisis básicos de calidad del agua de bebida de la OPS 2004 CEPIS/PUB/02.93 Lima.
29. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals 2008; app std-3ed. Document M31-A3; Wayne, Pennsylvania, USA.
30. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement 2009. Document M100-S19 Wayne, Pennsylvania, USA.

## M. Marchetti y col.

31. NCCLS, 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard-second edition. NCCLS document M31-A2 Wayne, Pennsylvania, USA, National Committee for Clinical Laboratory Standards.
32. Kijimi-Tanaka M, Ishihara K, Morioka A, Kojima A, Ohzono T, Ogikubo K et al. A nacional surveillance of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from food-producing animals in Japan. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51, 447-51.
33. Knezevic P & Petrovic O. Antibiotic resistance of commensal *E. coli* of food-producing animals from three Vojvodinian farms, Serbia, *Int. J Antimicrob Agents*, 2008; 31: 360-63.
34. Moredo FA, Vigo GB, Cappuccio JA, Piñeyro P, Perfumo CJ, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *E. coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39:227-29.
35. San Martín B, Bravo V, Borie C. Evaluación de la resistencia antimicrobiana en ganado bovino en Chile, utilizando *E. coli* como bacteria indicadora. *Arch Med Vet* 2005; 37: 117-123.
36. Sayah RS, Kaneene JB, Johnson Y, Miller R. Patterns of Antimicrobial Resistance observed in *Escherichia coli* isolates obtained from domestic- and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Appl Environ Microbiol* 2008; 71 (3): 1394-1404.
37. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants. *J Bacteriol* 1996; 178:306-08.
38. Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 382-402.
39. Putman M, van Veen H, Konings W. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672- 93.
40. Randall L, Ridley A, Cooles S, Sharma M, Sayers A, Pumbwe L et al. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 507-10.
41. Lomovskaya O, Warren M, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 105-16.
42. Bina XR, Philippart JA, Bina JE. Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholera*. *J Antimicrob. Chemother* 2009; 63: 103-8.
43. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2242-46.
44. Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P. Antibiotic efflux pumps in procaryotic cells: occurrence, impact for resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51:1167-73.
45. Van Bambeke F. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibacterial therapy and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery* 2010; 1: 138-75.13.
46. Li X, Zhang L, Srikumar R, Poole K. Beta -lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 399-403.
47. Nakae T, Nakajima A, Ono T, Saito K, Yoneyama H. Resistance to beta -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1301-03.
48. Xiaowen. Effect of the efflux inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-b-naphthylamide on antimicrobial susceptibility and virulence factor production in *Vibrio cholera*. *J Antimicrob. Chemother* 2009; 63: 103-8.
49. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 565-70.
50. Mestorino N, Pesoa J, Turic E, Errecalde J. Florfenicol: Aspectos Farmacológicos. *Veterinaria Argentina* 1999; 16 (152): 127-139.
51. Bohnert J & Kern W. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 849-52.
52. Pannek S, Higgins PG, Steinke P, Jonas D, Akova M, Bohnert JA, et al. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-naphthylamide. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:970-4.
53. Elkins C & Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol* 2002; 184: 6490-98.
54. Everett M, Jin Y, Ricci V, Piddock L. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* isolates from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2380-86.
55. Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem* 2008; 283: 24245-53.
56. Zihra-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 287-91.