



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) frente a la resistencia de *Enterobacter aerogenes*

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AUTOR:

Br. Díaz Lozano, Rogger Melanio

ASESOR:

MSc. Fupuy Chung, Jorge Antonio

Lambayeque, Perú
2023

**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA**



Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) frente a la resistencia de *Enterobacter aerogenes*

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
BIOLOGÍA

Aprobado por:

Dr. Pedro Jorge Chimoy Effio
PRESIDENTE

MSc. Roberto Ventura Flores
SECRETARIO

Lic. Roberto Díaz Sipión
VOCAL

MSc. Jorge Antonio Fupuy Chung
ASESOR

Br. Rogger Melanio Díaz Lozano
AUTOR

**Lambayeque, Perú
2023**

DEDICATORIA

Nada fue fácil, sin embargo, la perseverancia y dedicación nos permiten hoy escribir estas palabras dedicadas con mucho orgullo a las personas que siempre estuvieron presente durante toda mi formación académica. Gracias mamá **María!** Por apoyarme siempre y darme fuerzas para lograrlo. Gracias papá **Melanio!** por tus consejos y entender siempre nuestras metas. Ahora podemos decir juntos ...Lo Logramos!

También quiero dedicar esta tesis a una personita maravillosa que llegó a mi vida, es mi motivación, mis ganas de salir adelante y superación, a mi amada hija **Lía Hayzel**, gracias por regalarme muchas alegrías, sé que se vienen muchas aventuras y metas por cumplir.

Cada momento de esta bella etapa quedará grabada en mi memoria y siempre estaré agradecido con quienes me brindaron su apoyo y amistad incondicional para que esto sea posible.

¡Gracias!

AGRADECIMIENTO

- ❖ Mi sincero agradecimiento al MSc. Jorge Antonio Fupuy chung, por su valiosa guía y asesoramiento, por su tiempo y comprensión en la realización de esta tesis.
- ❖ Al Dr. Guillermo Martínez De Tejada, por permitirme realizar la ejecución de mi proyecto de tesis en el laboratorio de microbiología de la facultad de medicina de la Universidad de Navarra.
- ❖ A la Dra(c). Hawraa Shahrour, por su asesoría en el manejo de técnicas experimentales en el laboratorio de microbiología de la facultad de medicina de la Universidad de Navarra.
- ❖ Al Dr. Carlos Tirado, por ser mi asesor académico durante la formación de mi carrera profesional, por sus consejos y recomendaciones, por ser un gran amigo y una gran persona, ya que hizo posible mi aceptación en la UNAV y de este modo pude realizar esta tesis.
- ❖ A la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, que me brindo el apoyo económico para poder viajar a España y hacer realidad la ejecución de mi proyecto de investigación.

¡Muchas gracias a todos!

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
I. INTRODUCCIÓN	10
II. MARCO TEÓRICO	13
2.1. Antecedentes	13
2.2. Base teórica	15
2.2.1. <i>Enterobacter aerogenes</i>	15
2.2.2. Fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N)	16
2.2.3. Azitromicina	17
2.3. Definición de términos y conceptos.....	17
III. DISEÑO METODOLÓGICO.....	19
3.1. Población	19
3.2. Muestra	19
3.3. Materiales.....	19
3.3.1. Material Microbiológico.....	19
3.3.2. Material Bioquímico.....	19
3.4. Métodos	19
3.4.1. Activación y conservación de la cepa	19
3.4.2. Preparación y estandarización del inóculo bacteriano	20
3.4.3. Preparación de soluciones stock del antibiótico azitromicina	20
3.4.4. Preparación de soluciones stock del inhibidor de bomba de flujo PA β N.....	20
3.4.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	21
3.4.6. Cuantificación de sinergia en combinación de 2 antimicrobianos.....	21
IV. RESULTADOS	24
4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Azitromicina y PA β N frente a <i>E. aerogenes</i>	24
4.2. Sinergia en combinación del inhibidor de bomba de flujo PA β N y el antibiótico azitromicina frente a <i>E. aerogenes</i>	24
V. DISCUSIÓN	28
VI. CONCLUSIONES.....	32
VII. RECOMENDACIONES	33
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
IX. ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método del tablero <i>checkerboard test</i> para combinación de 2 antimicrobianos.....	23
Figura 2. Representación esquemática de la observación directa de la CMI de azitromicina y PAβN frente a <i>E. aerogenes</i>	24
Figura 3. Representación esquemática de la observación directa de la actividad sinérgica entre el inhibidor de bomba de flujo PAβN y el antibiótico azitromicina frente a <i>E. aerogenes</i> mediante el método <i>checkerboard</i>	25
Figura 4. Representación gráfica del proceso de sensibilización de <i>E. aerogenes</i> mediante el uso combinado de azitromicina y PAβN.....	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuantificación del ICIF del inhibidor de bombas de flujo PA β N combinado con el antibiótico azitromicina frente a <i>E. aerogenes</i>	26
Tabla 2. Cuantificación del ICIF del péptido PMBN combinado con el antibiótico azitromicina frente a <i>E. aerogenes</i>	27

RESUMEN

El flujo activo es un mecanismo antimicrobiano por el cual los patógenos bacterianos pueden volverse resistentes a múltiples fármacos. *Enterobacter aerogenes* es una bacteria nosocomial productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), asociado con altas tasas de mortalidad. Esta cuenta con una bomba de flujo específica conocida como AcrAB-TolC, lo cual brinda virulencia y resistencia a los antibióticos. Se ha demostrado que un buen inhibidor de esta bomba de flujo es la fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) y, aunque los inhibidores de bombas de flujo son fármacos prometedores, presentan un serio problema de toxicidad en células humanas. Una alternativa muy eficaz para reducir la toxicidad puede ser mediante procesos sinérgicos con antibióticos. Mostramos un diseño experimental basado en el uso combinado del PA β N en presencia de antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes*. Para el análisis de la actividad antimicrobiana de las combinaciones, se realizaron pruebas de sensibilidad microbiana determinada por concentración mínima inhibitoria (CMI) y estudios de cuantificación de sinergias. Los resultados obtenidos fueron, que la presencia de tan solo 8 μ g/ml de PA β N (CMI > 512 μ g/ml) convirtió a *E. aerogenes* en sensible al antibiótico azitromicina, reduciendo 16 veces su CMI (de 32 a 2 μ g/ml). Este trabajo demuestra la eficacia de un inhibidor de bomba de flujo para potenciar al antibiótico frente a *E. aerogenes* resistente a múltiples fármacos. Se concluye que esta estrategia experimental puede ser una alternativa para ayudar a combatir la resistencia antimicrobiana y reducir la toxicidad de los inhibidores de bombas de flujo posibilitando su empleo en terapia humana.

Palabras Clave: *Enterobacter aerogenes*; Antibacterianos; Infección hospitalaria; Pruebas de sensibilidad microbiana; Farmacorresistencia bacteriana.

ABSTRACT

Active flux is an antimicrobial mechanism by which bacterial pathogens can become multidrug resistant. *Enterobacter aerogenes* is a nosocomial bacteria that produces extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), associated with high mortality rates. It has a specific efflux pump known as AcrAB-TolC, which provides virulence and resistance to antibiotics. It has been shown that a good inhibitor of this efflux pump is phenylalanine arginine β -naphthylamide (PA β N) and, although efflux pump inhibitors are promising drugs, they present a serious problem of toxicity in human cells. A very effective alternative to reduce the toxicity can be through synergistic processes with antibiotics. We show an experimental design based on the combined use of PA β N in the presence of the antibiotic azithromycin against *E. aerogenes*. For the analysis of the antimicrobial activity of the combinations, microbial susceptibility tests determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and synergy quantification studies were carried out. The results obtained were that the presence of only 8 μ g/ml of PA β N (MIC > 512 μ g/ml) made *E. aerogenes* sensitive to the antibiotic azithromycin, reducing its MIC 16 times (from 32 to 2 μ g/ml). This work demonstrates the efficacy of an efflux pump inhibitor to potentiate the antibiotic against multidrug-resistant *E. aerogenes*. It is concluded that this experimental strategy can be an alternative to help combat antimicrobial resistance and reduce the toxicity of efflux pump inhibitors, enabling their use in human therapy.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*; Anti-bacterial agents; Cross infection; Microbial sensitivity tests; Drug resistance, bacterial.

I. INTRODUCCIÓN

Enterobacter aerogenes resistente a múltiples fármacos es predominante entre las *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), pertenece al grupo ESKAPE y con frecuencia se asocia a infecciones nosocomiales y altas tasas de mortalidad ya que ocasiona más fácilmente shock séptico (Silvano & Giuseppe, 2017). En cuanto a los contribuyentes de su resistencia resaltan los cambios en la permeabilidad de su membrana consistentemente con la presencia o ausencia de porinas y bombas de flujo (Philippe *et al.*, 2015).

La secuencia del genoma de *E. aerogenes* demuestra que la cepa alberga genes de resistencia a β -lactámicos, aminoglucósidos, sulfonamidas, trimetoprim, genes que codifican proteínas del sistema de efusión multidrogas, un transportador de amonio cuaternario, proteínas del sistema de flujo de metales pesados y genes que codifican diversos factores de virulencia (Moura *et al.*, 2017). Además, *E. aerogenes* cuenta con una bomba de flujo específica conocida como AcrAB-TolC, lo cual brinda virulencia y resistencia a los antibióticos (Masi, Pagès & Pradel, 2003).

Paulatinamente se ha incrementado la incidencia de infecciones por *E. aerogenes*, representando el 11% de las infecciones nosocomiales (Jha *et al.*, 2016). En Europa desde 1993 se vienen realizando estudios sobre las infecciones nosocomiales causadas por *E. aerogenes*. Ya en el 2003 *E. aerogenes* se consideró como una bacteria MDR emergente en pacientes con cuidados intensivos. Esta prevalencia de *Enterobacter sp.* en infecciones nosocomiales se ve aumentado por la introducción en terapias con cefalosporinas de espectro extendido y carbapenemasas. Solo en Francia desde el 2010 *E. aerogenes* es la quinta enterobacteria mas alta y el séptimo bacilo más alto responsable de infecciones nosocomiales (Davin & Pagès, 2015).

En los Estados Unidos de América las bacterias resistentes a los antibióticos causan más de 2 millones de enfermedades y 23,000 muertes cada año (Centers for Disease Control and Prevention, 2017). En el mismo país un estudio revela que *Enterobacter* es el octavo patógeno más común resistente a los antimicrobianos

representando el 5% de las infecciones asociadas a la atención médica (Hidron *et al.*, 2008).

En América Latina las infecciones bacterianas importantes comienzan a incrementar su resistencia de manera alarmante. Un estudio publicado en Brasil durante el 2016, informa que alrededor de los últimos 30 años la diseminación de BLEE en enterobacterias, es un problema muy serio que requiere acciones urgentes que incluyen un cumplimiento más estricto de las medidas de control (Mello & Gales, 2016).

. En el Perú el Ministerio de Salud a través del Instituto Nacional de Salud (INS) inició la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos en el año 1997 y desde el 2002 se sumó la vigilancia de las bacterias de origen hospitalario (Instituto Nacional de Salud, 2016). Según el INS el género *Enterobacter* constituye uno de los principales agentes infecciosos a nivel intrahospitalario y a menudo presentan mayor probabilidad de resistencia a los antibióticos. En *Enterobacter spp* se ha detectado 1% de resistencia a carbapenemes y se vienen incrementando debido a la presencia de carbapenemasas tipo KPC (Instituto Nacional de Salud, 2012).

Las bombas de flujo presentes en enterobacterias proporcionan protección de agentes nocivos que están presentes en el entorno en el que existen. A menudo una gran proporción de pacientes que ingresan a instalaciones de salud para patología no infecciosa adquieren una infección bacteriana ya que el flujo de salida sobreexpresado de las bombas hace que la terapia con antibióticos sea una problemática (Amaral & Molnar, 2012).

Se ha demostrado que los inhibidores de bombas de flujo pueden ser utilizados como nuevas alternativas que ayuden a combatir la resistencia bacteriana como es el caso del inhibidor de bomba de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N). Por otro lado, aunque los inhibidores de bombas de flujo son fármacos prometedores, presentan un serio problema de toxicidad en células humanas (Lamers, Cavallari & Burrows, 2013). Planteamos que una alternativa muy eficaz para reducir la toxicidad de los inhibidores de bombas de flujo puede ser mediante procesos sinérgicos con antibióticos.

En el contexto clínico las enterobacterias presentan una resistencia intrínseca a los macrólidos (Instituto Nacional de Salud, 2002). Es por ello que surge la necesidad de restaurar la susceptibilidad antibacteriana de azitromicina frente a *E. aerogenes*.

La siguiente investigación tuvo como objetivo general determinar el efecto sinérgico del inhibidor de bombas de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) con el antibiótico azitromicina frente a la resistencia antibiótica de *E. aerogenes*. Y los objetivos específicos fueron: 1) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la azitromicina y del inhibidor de bombas de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) frente a *E. aerogenes*. 2) Calcular el índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF) del inhibidor de bombas de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) combinado con el antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes*.

La hipótesis planteada fue: El inhibidor de bombas de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) promueve la penetración del antibiótico azitromicina al interior de *E. aerogenes* sensibilizándolo a concentraciones sinérgicas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El flujo de salida sobre expresado de las bombas hace que la terapia con antibióticos sea una problemática a nivel mundial, estudios de inhibidores se han desarrollado al pasar del tiempo, como lo investigado por Lamers, Cavallari & Burrows (2013), cuyo objetivo fue evaluar la eficacia de β -lactámicos en combinación con PA β N contra el patógeno oportunista, *Pseudomonas aeruginosa*. Donde se observó que PA β N redujo las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de varios antibióticos β -lactámicos contra *P. aeruginosa*. Y que además PA β N permeabiliza las membranas bacterianas de una manera dependiente de la concentración a niveles inferiores a los que se usan típicamente en estudios combinados.

En otro estudio desarrollado por Cortez & Kumar (2011), se analizó la actividad del inhibidor de la bomba de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) contra la bomba de flujo RND AdeFGH de *Acinetobacter baumannii*. Descubriéndose que PA β N inhibe la capacidad de la bomba AdeFGH para emitir los antibióticos clindamicina, trimetoprima y cloranfenicol probados en la cepa de *A. baumannii*.

Una investigación realizada por Ospina *et al.*, (2014), evaluaron la influencia de dos inhibidores de la bomba de flujo, fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) y 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP), sobre la expresión génica de tres sistemas de flujo multidrogas, AcrAB, AcrEF y EmrAB en *Escherichia coli* aislamientos de mastitis bovina resistentes a ampicilina y sulfametoxazol / trimetoprima simultáneamente. Los inhibidores de bomba de flujo contribuyeron a la disminución de la expresión de AcrF cuando se usa en combinación con ampicilina. Sin embargo, PA β N mostró efectos más fuertes que NMP, de modo que puede servir como una alternativa para ayudar en la terapia antimicrobiana de la mastitis.

Gomes *et al.*, (2013), desarrollaron in vitro mutantes resistentes a la azitromicina en *Escherichia coli* y *Shigella spp* en presencia de PA β N para observar qué mecanismos de resistencia a azitromicina distintos de las bombas de expulsión

fueron inhibidos por PA β N. La frecuencia de mutación osciló entre $<6,32 \times 10^{-10}$ y $5,22 \times 10^{-7}$ para *E. coli* y entre $<5,32 \times 10^{-10}$ y $1,69 \times 10^{-7}$ para *Shigella spp.* Los mutantes de *E. coli* mostraron un aumento en la CMI de azitromicina de hasta 128 veces, mientras que *Shigella spp.* los mutantes presentaron aumentos en los niveles de CMI de hasta 8 veces. En un mutante, se encontró la inserción de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos IMPRAS en el gen *rplV*. Se observaron aumentos en la expresión de *OmpW* en todos los mutantes de *E. coli* en comparación con sus respectivos aislados parentales. Lograron concluir que la combinación de antibióticos e inhibidores de la bomba de expulsión parece ser una buena opción para reducir la frecuencia de mutación en aislados clínicos.

Kuan *et al.*, (2020), evaluaron la eficacia del isotiocianato de bencilo (BITC) en combinación con inhibidores de bombas de flujo y quelantes de metales contra *Escherichia coli* multirresistente. BITC solo exhibió actividad antibacteriana moderada contra cepas de *E. coli* con valores CMI y CMB de 0,625-1,25 μ M y 1,25-2,5 μ M, respectivamente. Por el contrario, las combinaciones dobles y triples de BITC, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y fenilalanina-arginina β -naftilamida (PA β N) dieron como resultado actividades sinérgicas con valores de ICIF entre 0,18 y 0,5. Los datos demuestran que el posible uso de agentes adyuvantes, como el agente quelante EDTA y el inhibidor de bomba de flujo PA β N mejoran el potencial antibacteriano del isotiocianato de bencilo y pueden ayudar a desarrollar una estrategia alternativa para reducir la aparición de resistencia a múltiples fármacos.

Nanmeni *et al.*, (2021), investigaron la actividad antibacteriana del extracto, las fracciones y los fitoquímicos de *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) contra fenotipos gramnegativos MDR que expresan bombas de flujo. Se llevaron a cabo ensayos antibacterianos de muestras solas y en presencia de un inhibidor de la bomba de flujo PA β N. El estudio fitoquímico del extracto de *P. glandulosus* proporcionó siete fracciones principales (A-G) que condujeron al aislamiento de diecisiete compuestos. El extracto etanólico de *P. glandulosus* no fue activo hasta 1024 μ g/ml, mientras que sus fracciones mostraron CMI que variaban de 32 a 512 μ g/ml en las bacterias estudiadas. La fracción C de *P. glandulosus* mostró la

CMI más baja (32µg/ml) en la cepa *E. coli* ATCC8739. La fracción D presentó el mayor espectro de actividad al inhibir el crecimiento del 90% (9/10) de las bacterias estudiadas. Concluyendo que la presencia de PAβN mejora la actividad del extracto y de todas las fracciones.

Estudio realizado por Plasencia (2019), estudiaron la expresión de bombas de flujo en cepas de *Acinetobacter baumannii* obtenidas de un hospital en Lima, Perú entre 2014 y 2016. La susceptibilidad a fluoroquinolonas y aminoglucósidos fueron evaluadas mediante ensayos de microdilución en caldo y la actividad del sistema de bombas de flujo mediante la adición del inhibidor de bomba de flujo PAβN. Como resultado encontraron que, ocho cepas (42,1%) demostraron un aumento en las tasas de susceptibilidad y dieciséis (84,2%) expresaron bombas de flujo. Concluyeron que las tasas de resistencia antimicrobiana para quinolinas y aminoglucósidos disminuyeron tras la adición del inhibidor de la bomba de flujo PAβN.

Investigación realizada en Cajamarca, Perú por Peña (2021), evaluó el efecto del inhibidor de bombas de flujo PAβN sobre la resistencia bacteriana de levofloxacina y tetraciclina en cepas de *Acinetobacter baumannii*, aisladas de pacientes hospitalizados en el Hospital Regional Docente de Cajamarca durante 2018. Los resultados indicaron que un total de 91.49% (43/47) de las cepas incluidas en el estudio expresaron la presencia de bombas de flujo y se observó que un 17.02% (8/47) mostraron una reducción significativa de la CMI con ambos antibióticos. Concluyó que las bombas de flujo es un mecanismo importante para el desarrollo de la multirresistencia y que el inhibidor de bomba de flujo PAβN ayuda a combatir este mecanismo y a reducir la resistencia antibiótica.

2.2. Base teórica

2.2.1. *Enterobacter aerogenes*

Enterobacter aerogenes perteneciente al género *Enterobacter* es un bacilo gramnegativo anaerobio facultativo de 2 micras de largo aproximadamente, son móviles mediante flagelos peritricos y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. *E. aerogenes* se asocia frecuentemente con un fenotipo de resistencia a múltiples

fármacos (MDR), principalmente debido a su adaptación al entorno hospitalario y su capacidad para adquirir fácilmente numerosos genes de resistencia y virulencia. Esta especie tiene una resistencia intrínseca a la ampicilina, amoxicilina, macrólidos, cefalosporinas de primera generación y cefoxitina debido a la expresión de una β -lactamasa AmpC constitutiva (Davin & Pagès, 2015). Además, *E. aerogenes* es productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), asociado con altas tasas de mortalidad (Philippe et al., 2015).

E. aerogenes cuenta con una bomba de flujo específica conocida como AcrAB-TolC, donde AcrA es una lipoproteína periplasmática trimérica anclada en la membrana interna, AcrB es un transportador de membrana interna y TolC es un canal de membrana externa, por lo que genera mayor virulencia y resistencia a los antibióticos (Masi, Pagès & Pradel, 2003).

2.2.2. Fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N)

Fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N, también llamada MC-207,110) se descubrió como tal mediante el análisis empírico de una biblioteca de moléculas pequeñas. Fue originalmente identificado como un inhibidor de bomba de flujo en 1999, al actuar como un potenciador eficiente de fluoroquinolonas (en particular, levofloxacina) en *P. aeruginosa*. Los informes sugieren que el PA β N puede inhibir el flujo de salida de manera competitiva, al desplazar otros sustratos de bombeo (Lomovskaya et al., 2001).

La actividad de permeabilización de la membrana de PA β N podría considerarse un activo, ya que promovería su propia entrada en las células donde puede acceder a sus objetivos de bombeo de flujo de salida. Se ha evidenciado que las moléculas pequeñas como PA β N, tienen un potencial excelente como adyuvantes antibióticos que pueden reducir las dosis efectivas de los fármacos actuales. También pueden ampliar el rango de antibióticos utilizables a aquellos que hasta ahora tienen una efectividad limitada contra los patógenos gramnegativos debido a una incapacidad para romper la barrera de la membrana externa. La cristalización de AcrB de *E. coli* con PA β N mostró unión a sitios específicos que podrían causar la exclusión de algunos sustratos al tiempo que permiten que otros

se unan y obstruyan (Yu *et al.*, 2005). Demostrando que un buen inhibidor de bomba de flujo es la PA β N y, aunque los inhibidores de bomba de flujo son fármacos muy prometedores, presentan un serio problema de toxicidad en células humanas (Lamers, Cavallari & Burrows, 2013).

2.2.3. Azitromicina

La azitromicina es un antibiótico macrólido semisintético derivado de la eritromicina con actividad bacteriostática frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, su acción se ve involucrada con la unión a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano y, por lo tanto, inhibe la traducción del ARNm interfiriendo en la síntesis de proteínas y evitando el crecimiento bacteriano. La azitromicina es usada para tratar ciertas infecciones bacterianas como faringitis estreptocócica, neumonía, fiebre tifoidea, bronquitis, sinusitis y del oído medio. También ha sido utilizado para prevenir infecciones bacterianas en bebés y en personas con sistemas inmunitarios débiles (Ahmed, Badraddin & Ahmed, 2014).

2.3. Definición de términos y conceptos

- **Antibiótico:** Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento biológico (Instituto Nacional de Salud, 2002).
- **Betalactamasas de espectro extendido (BLEE):** Son enzimas producidas por bacilos gran negativos fundamentalmente enterobacterias (Instituto Nacional de Salud, 2002).
- **Bombas de flujo:** Son proteínas de membrana encargadas del transporte de distintos compuestos desde el interior de las bacterias al exterior, contribuyendo de esta forma a la resistencia bacteriana (Xian, Plésiat & Hiroshi, 2015).
- **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento (Instituto Nacional de Salud, 2002).
- **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente (Instituto Nacional de Salud, 2002).

- **Concentración mínima inhibitoria (CMI):** Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana de 18 a 24 horas de incubación (Instituto Nacional de Salud, 2002).
- **Incubación:** Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación (Instituto Nacional de Salud, 2002).
- **Infección Nosocomial:** Del latín nosocomium «hospital», son infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital y que no estaban presentes ni en el período de incubación ni en el momento del ingreso del paciente. Las infecciones que ocurren más de 48h después del ingreso suelen considerarse nosocomiales (Fu & Wang, 2016).
- **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferida a un medio de cultivo (Instituto Nacional de Salud, 2002).
- **Medio de cultivo:** Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro (Instituto Nacional de Salud, 2002).

III. DISEÑO METODOLÓGICO

Esta investigación se clasificó según al fin que persigue como aplicada y de acuerdo a la técnica de contrastación como experimental y estímulo creciente.

3.1. Población

Estuvo constituido por cepas de *Enterobacter aerogenes* (ATCC® 13048™) de la casa comercial ATCC Product Sheet (**Anexo 1**), proporcionada por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra. Pamplona - España.

3.2. Muestra

El tamaño de la muestra estuvo constituido por 1 especie bacteriana proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, 2 cepas de la especie; 1 antibiótico macrólido y 1 inhibidor de bomba de flujo a 10 concentraciones diferentes.

3.3. Materiales

3.3.1. Material Microbiológico.

Estuvo constituido por 1 cepa de *Enterobacter aerogenes* (ATCC® 13048™) de la casa comercial ATCC Product Sheet. Recomendada para ensayos y pruebas de resistencia bacteriana, y como control de calidad (Anexo 1).

3.3.2. Material Bioquímico.

Estuvo conformado por 1 antibiótico macrólido azitromicina y 1 inhibidor de bomba de flujo Fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N). Proporcionados por la biblioteca peptídica y farmacológica del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra. Pamplona - España.

3.4. Métodos

3.4.1. Activación y conservación de la cepa

La cepa de *E. aerogenes* se cultivó en 2 placas con medio de cultivo Agar Tripticosa Soya (TSA) a 37°C durante 24 horas. Posterior a la incubación se tomaron todas las colonias de una placa y se colocaron en un vial conteniendo leche

descremada estéril al 10% “stock” y se almacenó a -80°C. Una segunda placa se colocó a 4°C para su uso continuo.

3.4.2. Preparación y estandarización del inóculo bacteriano

Con un asa estéril se tomó unas colonias de *E. aerogenes* de la placa de agar TSA y se mezcló en 1.5ml de medio en caldo Mueller-Hinton (MHB), posteriormente se ajustó en el espectrofotómetro con D.O.600nm = 55 a 75nm aproximadamente de absorbancia hasta obtener una densidad poblacional semejante al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL. A continuación, se logró diluir 1:100 añadiendo 100µl del inóculo en 9,9ml de MHB para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos. De igual manera se logró diluir 1:50 añadiendo 200µl del inóculo a un tubo falcón conteniendo 9.8ml de MHB para determinar la CMI en combinación de 2 antimicrobianos.

3.4.3. Preparación de soluciones stock del antibiótico azitromicina

Se preparó una solución stock de 10mg/ml del antibiótico, utilizando como diluyente agua destilada estéril, de manera que al agregar 20µl de antibiótico en el primer pocillo de 180µl de MHB se obtuvo una concentración de 1024µg/ml (1:10). La preparación de las soluciones se realizó utilizando la siguiente fórmula: $V_i = C_f \times V_f / C_i$, donde V_i es el volumen inicial, C_f es la concentración final, V_f es el volumen final y C_i la concentración inicial (teniendo en cuenta la pureza del antibiótico). Las soluciones se pudieron conservar a -20°C para su uso continuo.

3.4.4. Preparación de soluciones stock del inhibidor de bomba de flujo

PAβN

Se preparó una solución stock de 10mg/ml de PAβN utilizando como diluyente dimetil sulfóxido (DMSO), de manera que al añadir 20µl de PAβN en el primer pocillo de 180µl de MHB se obtuvo una concentración de 1024µg/ml (1:10). También se preparó una solución intermedia de 5mg/ml del inhibidor de bomba de flujo, de modo que se pudo trabajar volúmenes más altos a concentraciones más reducidas para las combinaciones con el antibiótico. De igual manera la preparación de las soluciones se realizó utilizando la siguiente fórmula: $V_i = C_f \times V_f / C_i$, donde V_i

es el volumen inicial, C_f es la concentración final, V_f es el volumen final y C_i la concentración inicial (teniendo en cuenta la pureza de la PAβN). Estas soluciones también se conservaron a -20°C para su uso continuo.

3.4.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó según el método de microdilución en caldo de acuerdo con las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2011). Se utilizó el medio de cultivo MHB y el protocolo descrito por (Sánchez *et al.*, 2008). Se realizaron diluciones dobles seriadas de los antimicrobianos en placas multipocillos (TPP) de 96 pocillos con fondo “U”, que consta de 12 columnas y 8 filas. Estas diluciones se mezclaron con 100µl del inóculo de la cepa *E. aerogenes* de manera que se redujo la concentración de 1024µg/ml a 512µg/ml en el primer pocillo. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 a 24 horas y posteriormente se procedió a realizar la lectura visual de los resultados. También se realizó controles de crecimiento (inoculo sin antimicrobiano) y de esterilidad (medio sin inoculo) en la misma placa. La CMI se definió como la concentración de antimicrobiano más baja que impidió la formación de turbidez en el pocillo.

A manera de referencia y complemento se realizó un estudio de la CMI del antibiótico eritromicina y del péptido nonapéptido de polimixina B (PMBN).

3.4.6. Cuantificación de sinergia en combinación de 2 antimicrobianos

Para estudiar la existencia de actividad sinérgica entre dos compuestos, se utilizó el método del tablero *checkerboard test*. Los estudios se realizaron para combinar antibiótico azitromicina con inhibidor de bomba de flujo PAβN, en cuyo ensayo se utilizó las mismas placas que para el cálculo de la CMI, con la particularidad de que, en este caso, además de generar un gradiente de antimicrobiano horizontal (de izquierda a derecha de la placa), se incluyó en los pocillos un segundo compuesto diluido de forma que se generó un gradiente vertical (de arriba a abajo) (**Figura 1**).

Los rangos de concentraciones de los antimicrobianos se seleccionaron sobre la base de sus CMIs previamente descritos:

- Añadiendo 2.56µl de azitromicina en los pocillos de la primera columna de 197.44µl de MHB, se realizaron diluciones seriadas generando un gradiente de concentraciones horizontal (64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml, 2µg/ml, 1µg/ml, 0.5µg/ml, 0.25µg/ml, 0.125µg/ml) (Columna 1 - 10).
- En 6 viales se preparó las diluciones añadiendo 7.68µl de PAβN en el primer vial de 1192.32µl de MHB, se realizaron diluciones seriadas y se mezclaron con 600µl del inóculo de la cepa *E. aerogenes*. Posteriormente se agregó 100µl de diluido con inóculo preparado a cada pocillo en forma ordenada de la columna 1 a 10, generando un gradiente de concentraciones vertical (16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml, 2µg/ml, 1µg/ml, 0.5µg/ml) (Fila 1 - 6).
- También se logró reafirmar la CMI de los antimicrobianos (Fila 7-8) y los controles de esterilidad (Columna 11) y crecimiento (Columna 12).

Para cuantificar la actividad sinérgica de los dos compuestos en combinación se utilizó el índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF), calculado del siguiente modo:

$$ICIF = \frac{CIM \text{ antimicrobiano 1 en la combinación}}{CIM \text{ antimicrobiano 1}} + \frac{CIM \text{ antimicrobiano 2 en la combinación}}{CIM \text{ antimicrobiano 2}}$$

Este índice relaciona las CMIs de dos compuestos antimicrobianos por separado y en combinación, siguiendo las recomendaciones de (Odds, 2003; Sánchez *et al.*, 2008). Los valores del ICIF se interpretarán de la siguiente manera: ICIF ≤ 0,5, efecto sinérgico; ICIF entre 0,5 y 4, efecto aditivo o indiferente; ICIF > 4, efecto antagónico.

Se realizó un ensayo complementario donde se determinó la cuantificación sinérgica entre el antibiótico azitromicina combinado con el péptido nonapéptido de polimixina B (PMBN) frente a la resistencia de *E. aerogenes*.

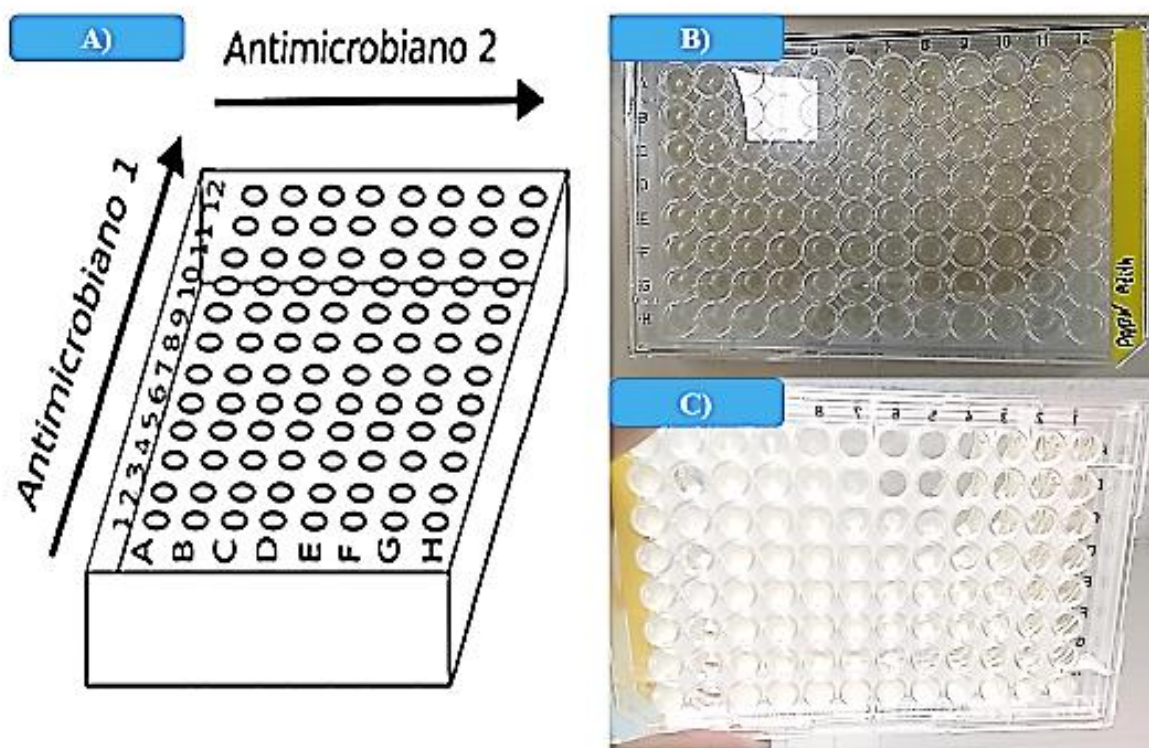


Figura 1. Método del tablero *checkerboard test* para combinación de 2 antimicrobianos. A. Las concentraciones de cada antimicrobiano disminuyen en la dirección de la fecha. B. Combinación de azitromicina y PAβN frente a *E. aerogenes*. C. Proceso de lectura visual de la formación de turbidez en presencia de luz.

IV. RESULTADOS

4.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de Azitromicina y PAβN frente a *E. aerogenes*.

El resultado de la investigación determinó que la cepa de *E. aerogenes* después de tener interacción con diluciones en las 10 primeras columnas de los antimicrobianos respectivamente (512µg/ml, 256µg/ml, 128µg/ml, 64µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 8µg/ml, 4µg/ml, 2µg/ml, 1µg/ml), la CMI del antibiótico azitromicina fue de 32µg/ml y el inhibidor de bomba de flujo PAβN alcanzó una CMI mayor a 512µg/ml. También se observó el control de esterilidad (medio sin inóculo) en la columna 11 y de crecimiento (inóculo sin antimicrobiano) en la columna 12 de la misma placa (**Figura 2**).

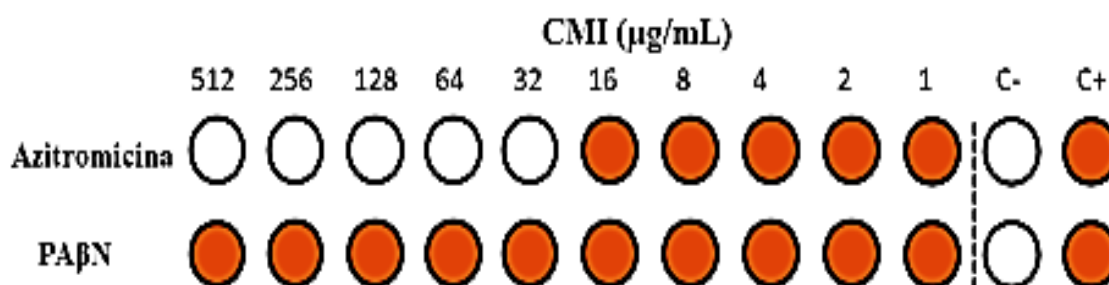


Figura 2. Representación esquemática de la observación directa de la CMI de azitromicina y PAβN frente a *E. aerogenes*.

En el ensayo previo se determinó la CMI del antibiótico eritromicina siendo 512µg/ml y del péptido nonapéptido de polimixina B (PMBN) alcanzando también 512µg/ml.

4.2. Sinergia en combinación del inhibidor de bomba de flujo PAβN y el antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes*.

La actividad del antibiótico azitromicina resultó potenciada en combinación con el inhibidor de bomba de flujo PAβN, siendo la ICIF $\leq 0,5$ de 3 cálculos de combinaciones dando como resultado efecto sinérgico (0.063, 0.078, 0.258). También se determinó efecto aditivo o indiferente en 3 cálculos de combinaciones donde la ICIF osciló entre 0,5 y 4. Según los datos obtenidos no se encontró efecto

antagónico. La ICIF se calculó en las 6 filas para considerar todas las concentraciones más bajas en las combinaciones que fueron posibles de sensibilizar a *E. aerogenes* (**Figura 3**).

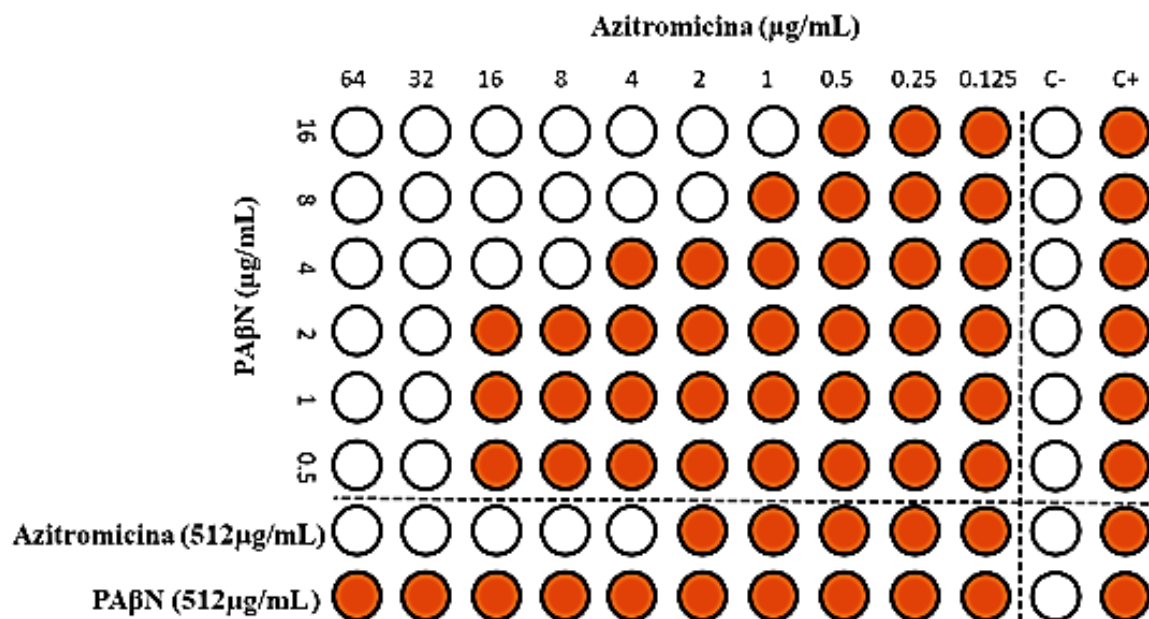


Figura 3. Representación esquemática de la observación directa de la actividad sinérgica entre el inhibidor de bomba de flujo PAβN y el antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes* mediante el método *checkerboard*.

El resultado de la sinergia más representativa fue, que la presencia de tan solo 8μg/ml de PAβN (CMI > 512μg/ml) convirtió a *E. aerogenes* en sensible al antibiótico azitromicina, reduciendo 16 veces su CMI (de 32 a 2 μg/ml) (Fila 2) (**Tabla 1**). El esquema de sensibilización de *E. aerogenes* mediante el uso combinado de los antimicrobianos se representa en la **figura 4**.

Tabla 1. Cuantificación del ICIF del inhibidor de bombas de flujo PA β N combinado con el antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes*.

Azitromicina ($\mu\text{g/ml}$)	PA β N ($\mu\text{g/ml}$)	ICIF	Efecto
1	16	0.063	Sinérgico
2	8	0.078	Sinérgico
8	4	0.258	Sinérgico
32	2	1.004	Aditivo
32	1	1.002	Aditivo
32	0.5	1.001	Aditivo

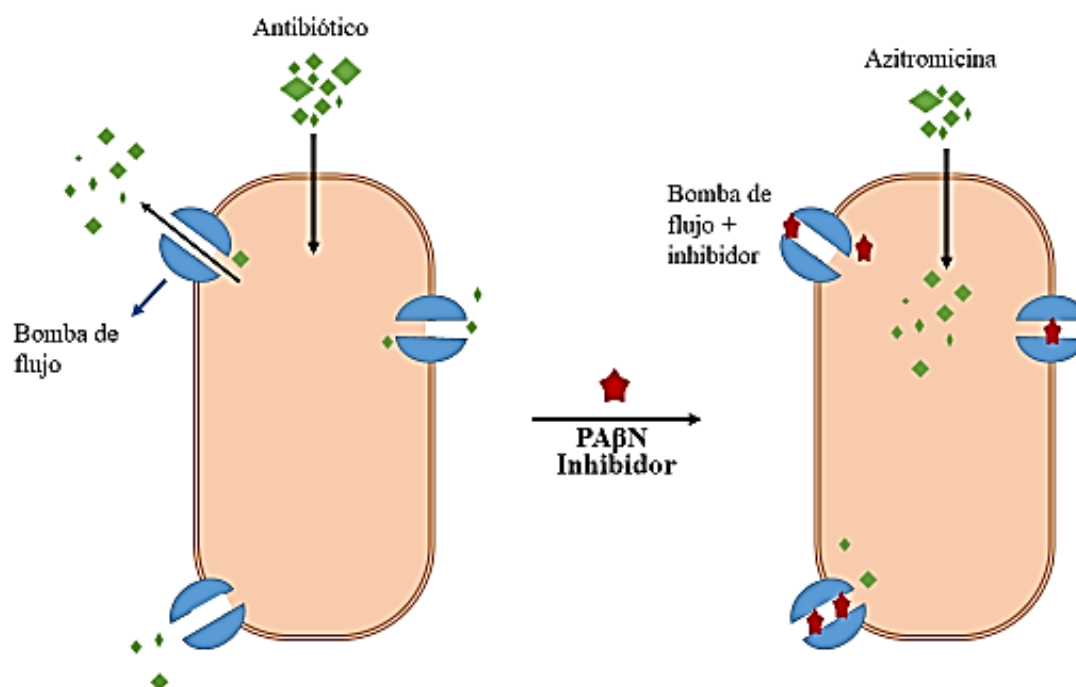


Figura 4. Representación gráfica del proceso de sensibilización de *E. aerogenes* mediante el uso combinado de azitromicina y PA β N.

Fuente: Elaboración propia

Adicionalmente se determinó que el péptido PMBN combinado con el antibiótico azitromicina reduce su CMI de ambos antimicrobianos frente a *E. aerogenes*, como consecuencia la ICIF fue menor a 0,5 de 3 cálculos de combinaciones resultando efecto sinérgico (0.252, 0.129, 0.094). Los otros 3 cálculos de combinaciones dieron efecto aditivo o indiferente oscilando la ICIF entre 0,5 y 4 (**Tabla 2**).

Tabla 2. Cuantificación del ICIF del péptido PMBN combinado con el antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes*.

Azitromicina (µg/ml)	PMBN (µg/ml)	ICIF	Efecto
64	1	2.002	Aditivo
32	1	1.002	Aditivo
16	1	0.502	Aditivo
8	1	0.252	Sinérgico
4	2	0.129	Sinérgico
2	16	0.094	Sinérgico

V. DISCUSIÓN

La resistencia a los antibióticos es un desafío importante en el tratamiento de infecciones nosocomiales causadas por *E. aerogenes*, como se observa también en varias otras especies de bacterias gramnegativas. La bomba de flujo es un importante contribuyente a la resistencia a múltiples fármacos entre los patógenos bacterianos. Siendo el descubrimiento y desarrollo de inhibidores de bombas de flujo una estrategia importante.

Inhibidores de bombas de flujo como PA β N han sido empleados en determinar la presencia de bombas de flujo en diferentes bacterias gramnegativas. Demostrando que las bombas de flujo tienen un papel muy importante en la resistencia antibiótica tanto para *E. aerogenes* y otras bacterias (Masi, Pagès & Pradel, 2003; Plasencia, 2019)

Deseando lograr una eliminación bacteriana efectiva, se desarrolló la combinación de dos agentes antimicrobianos frente a *E. aerogenes*. Considerando que la fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) es un inhibidor específico de la bomba de flujo AcrAB-TolC perteneciente a la familia de resistencia nodulación división (RND), se puede aplicar como agente adyuvante para compuestos antibacterianos. Las bombas de flujo multifármaco tipo RND son un contribuyente crítico para la resistencia intrínseca a los antibióticos en *Enterobacteriaceae*. De modo que el uso de PA β N promueve la acumulación intracelular de los compuestos antibacterianos y reduce efectivamente la concentración requerida para la erradicación bacteriana (Yu *et al.*, 2005; Cortez & Kumar, 2011; Ospina *et al.*, 2014; y Kuan *et al.*, 2020).

Según los datos obtenidos en esta investigación, se determinó que el inhibidor de bomba de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) combinado con el antibiótico azitromicina generó efecto sinérgico frente a *E. aerogenes* sensibilizándolo con ICIF de 0.063, 0.078 y 0.258. Demostrando que la presencia de tan solo 8 μ g/ml de PA β N convirtió a *E. aerogenes* en sensible al antibiótico azitromicina, reduciendo 16 veces su CMI alcanzando 2 μ g/ml. Sin embargo, la actividad antimicrobiana de la azitromicina por si sola alcanzó una CMI de 32 μ g/ml

y la CMI del PA β N fue mayor a 512 μ g/ml. De modo que el PA β N empleado por sí solo no cuenta con actividad antimicrobiana, pero si se emplea como agente adyuvante puede potenciar la actividad antibiótica y reducir su propia concentración, del mismo modo reducir su toxicidad para ser empleado en células humanas. La azitromicina por otro lado, mediante este enfoque experimental volvería a ser un fármaco prometedor para combatir las infecciones causadas por enterobacterias resistentes a múltiples fármacos.

Informes anteriores sugieren que PA β N puede inhibir el flujo de salida de manera competitiva, al desplazar otros sustratos de bombeo. La cristalización de AcrB de *E. coli* con PA β N mostró unión a sitios específicos que podrían causar la exclusión de algunos sustratos al tiempo que permiten que otros se unan y obstruyan (Yu *et al.*, 2005). Además, en una investigación se reportó que PA β N mostró efectos más fuertes que el inhibidor de bomba de flujo 1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP), sobre la expresión génica de tres sistemas de flujo multidrogas, AcrAB, AcrEF y EmrAB en *E. coli* (Ospina *et al.*, 2014).

Cuando PA β N fue originalmente identificado como un inhibidor de bomba de flujo en 1999, se determinó como un potenciador eficiente de fluoroquinolonas (en particular, levofloxacina) en *P. aeruginosa* (Lomovskaya *et al.*, 2001). Lamers, Cavallari & Burrows (2013), descubrieron que PA β N reduce la CMI de β -lactámicos incluyendo aquellos que sobreexpresan AmpC frente a cepas de *P. aeruginosa*. También se ha demostrado que PA β N inhibe la capacidad de la bomba AdeFGH como una de las bombas RND para potenciar los antibióticos clindamicina, trimetoprima y cloranfenicol frente a la cepa *A. baumannii* (Cortez & Kumar, 2011).

En aislados clínicos, las bombas de flujo juegan un papel destacado en la resistencia a los antibióticos. En aislamientos de *E. aerogenes* investigados por Malléa, *et al.*, (2002), identificaron un mecanismo de resistencia debido a la presencia de bombas de flujo que contribuyen a la resistencia al cloranfenicol. Se determinó que estas bombas de flujo fueron inhibidas en presencia de PA β N, consistente con la disminución de la CMI de cloranfenicol. Estos hallazgos son consistentes con la capacidad que tuvo PA β N para unirse con afinidad a las bombas

de flujo RND de *E. aerogenes* obstruyendo y resultando en una inhibición. Del mismo modo, potencia la actividad del antibiótico azitromicina reduciendo sus concentraciones a niveles sinérgicos.

La bomba de flujo multidrogas AcrAB-TolC presente en *E. aerogenes* es un mecanismo de resistencia que evita la actividad antibiótica de la azitromicina al interior de la célula bacteriana. La subunidad AcrB tiene poliespecificidad de múltiples fármacos para la translocación de protones que impulsa el movimiento del sustrato; si se inhibe AcrB, se inhibirá todo AcrAB-TolC. AcrB tiene una trampa hidrofóbica lo que permite que los inhibidores de bomba de flujo como PAβN se unan con la fenilalanina que se encuentra dentro de esta trampa, conduciendo su inhibición del cambio conformacional y, por lo tanto, impidiendo el mecanismo de rotación funcional. La trampa hidrofóbica tiene un aminoácido clave que es Phe 178, que juega un papel importante en la unión del inhibidor. Este mecanismo de unión e inhibición de la bomba de flujo AcrAB-TolC fue descrito por Venter *et al.*, (2015) y Alenazy, (2022).

Nuestros resultados demostraron cálculos de ICIF menor a 0.5, lo que nos permitió observar la disminución de la concentración del PAβN a niveles sinérgicos frente a *E. aerogenes*. Estos niveles de concentración también permitirían su empleo en la terapia humana teniendo en cuenta la toxicidad de este fármaco en células humanas (Lomovskaya & Zgurskaya, 2011). A diferencia del estudio realizado por Peña (2021), donde muestra la eficacia del PAβN para potenciar a los antibióticos levofloxacin y tetraciclina contra *A. baumannii*, no consideró los cálculos de ICIF donde se demuestre el empleo del inhibidor a niveles sinérgicos, siendo este un parámetro importante para evaluar el nivel de citotoxicidad de PAβN. Para los procesos combinados de 2 antimicrobianos según Odds, (2003); Sánchez *et al.*, (2008) y Venter *et al.*, (2015), se deben tener en cuenta los cálculos de ICIF para valorar el posible efecto sinérgico y de este modo se posibilite su empleo futuro en el campo clínico.

Aunque el potencial del PAβN para restaurar la susceptibilidad a la azitromicina frente a *E. aerogenes* depende de la presencia de mecanismos

adicionales de resistencia, como la impermeabilidad y degradación enzimática, los hallazgos obtenidos aquí son prometedores debido al efecto sinérgico encontrado entre los antimicrobianos reduciendo sus concentraciones y posibilitando su empleo en el campo clínico. Los datos disponibles respaldan el desarrollo de inhibidores de la bomba de flujo para su uso en combinación con antibióticos.

Con respecto al péptido nonapéptido de polimixina B (PMBN) combinado con el antibiótico azitromicina se determinó efecto sinérgico frente a *E. aerogenes* sensibilizándolo con ICIF de 0.252, 0.129, 0.094. La actividad antimicrobiana del PMBN por si solo alcanzo una CMI de 512µg/ml y en la combinación se redujo a 2µg/ml. Sin embargo, la azitromicina se redujo de 32µg/ml a 4µg/ml. Cabe mencionar que el péptido PMBN tiene la capacidad de permeabilizar la membrana externa de las bacterias gramnegativas. Huang *et al.*, (2022), también mostró datos donde PMBN potenciaba sinérgicamente a un antibiótico frente a la resistencia de una enterobacteria. Concordando que esta estrategia proporcionó una mejora de la actividad antibacteriana de los antibióticos y representa una potente alternativa para superar la resistencia a los antibióticos en el futuro. Estos hallazgos se relacionan al combinar dos agentes antimicrobianos capaces de potenciarse y generar un efecto sinérgico, semejante con los resultados obtenidos de la combinación de PAβN con azitromicina frente a la resistencia de *E. aerogenes*.

Este estudio es el primer reporte de efecto sinérgico que demuestra que el PAβN restaura la susceptibilidad antibiótica de azitromicina frente a *E. aerogenes*. Por otro lado, se necesitan estudios de la secuencia del genoma para identificar las mutaciones que causaron la aparición de bombas de flujo como un mecanismo de resistencia a múltiples fármacos. Además, es necesario superar los obstáculos que se interponen en el uso de inhibidores como ayudas terapéuticas y liberarlos de la citotoxicidad.

Estos resultados resaltan la importancia de la utilización de los inhibidores de bombas de flujo en procesos combinados con antibióticos frente a la resistencia bacteriana.

VI. CONCLUSIONES

1. Se concluyó que el PA β N por sí solo inhibe a *E. aerogenes* a elevadas concentraciones; sin embargo, en proceso combinado con el antibiótico azitromicina redujo su CMI a niveles sinérgicos.
2. El efecto sinérgico del inhibidor de bombas de flujo PA β N restauró la actividad antibacteriana de azitromicina frente a la resistencia de *E. aerogenes*.
3. El ensayo complementario demostró que el péptido PMBN combinado con el antibiótico azitromicina también tuvo efecto sinérgico frente a *E. aerogenes*.
4. Esta estrategia experimental puede ser una alternativa para ayudar a combatir la resistencia antimicrobiana y reducir la citotoxicidad de los inhibidores de bomba de flujo posibilitando su empleo en terapia humana.

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios automatizados de comprobación de la cinética de crecimiento mediante *Bioscreen C* del inhibidor de bomba de flujo PA β N combinado con el antibiótico azitromicina frente a *E. aerogenes*, debido a que los ensayos por método *checkerboard* mostraron efecto sinérgico.
2. Combinar PA β N con otros antibióticos frente a diferentes enterobacterias de importancia clínica que expresen bombas de flujo. Del mismo modo probar otros inhibidores de bombas de flujo o péptidos antimicrobianos.
3. Utilizar el método experimental para buscar nuevas alternativas farmacéuticas y para devolver la eficacia a los antimicrobianos convencionales que están siendo desplazados debido a la resistencia bacteriana.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alenazy R. (2022). Drug Efflux Pump Inhibitors: A Promising Approach to Counter Multidrug Resistance in Gram-Negative Pathogens by Targeting AcrB Protein from AcrAB-TolC Multidrug Efflux Pump from *Escherichia coli*. Biology. Disponible en <https://doi.org/10.3390/biology11091328>
- Ahmed, B., Badraddin, A., & Ahmed A. (2014). Chapter One – Azithromycin. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800173-8.00001-5>
- Amaral, L., & Molnar, J. (2012). Inhibitors of efflux pumps of gram-negative bacteria inhibit quorum sensing. Open Journal of Pharmacology. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/232723653_Inhibitors_of_efflux_pumps_of_Gram-negative_bacteria_inhibit_Quorum_Sensing
- Centers for Disease Control and Prevention. (2017). Antibiotic Use in the United States, 2017: Progress and Opportunities. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services. Disponible en <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/stewardship-report/pdf/stewardship-report.pdf>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2011). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 21st Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Disponible en <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=50f0395de39d5e8368000022&assetKey=AS%3A272179910905873%401441904155623>
- Cortez, J., & Kumar, A. (2011). Activity of the efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β -naphthylamide against the AdeFGH pump of *Acinetobacter baumannii*. International Journal of Antimicrobial Agents. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.01.006>
- Davin, A., & Pagès, J.-M. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Frontiers in Microbiology. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392>

- Fu, C., & Wang, S. (2016). Nosocomial infection control in healthcare settings: Protection against emerging infectious diseases. PMC US National Library of Medicine. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s40249-016-0118-9>
- Gomes, C., Martínez, S., Durand, D., Lluque, A., Mosquito, S., Ochoa, T., & Ruiz, J. (2013). Which mechanisms of azithromycin resistance are selected when efflux pumps are inhibited? International Journal of Antimicrobial Agents. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.05.012>
- Hidron, A., Edwards, J., Patel, J., Horan, T., Sievert, D., Pollock, D., & Fridkin, S. (2008). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. Infection Control & Hospital Epidemiology. Disponible en <https://doi.org/10.1086/591861>
- Huang, T., Lv, Z., Lin, J., Zhao, K., Zhai, L., Wang, X., & Chu, Y. (2022). A Potent Antibiotic Combination of Linezolid and Polymyxin B Nonapeptide Against *Klebsiella pneumoniae* Infection In Vitro and In Vivo. Frontiers in Pharmacology. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9086963/pdf/fphar-13-887941.pdf>
- Instituto Nacional de Salud. (2002). Manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión. Disponible en <https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/417394/439893732843877347520191106-32001-1v6txak.pdf?v=1573077224>
- Instituto Nacional de Salud. (2012). Informe de la resistencia antimicrobiana en bacterias de origen hospitalario - 2012. Disponible en https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/informacion/INFORME_RESISTENCIA_ANTIMICROBIANA_2012.pdf
- Instituto Nacional de Salud. (2016). Plan nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2017 – 2021. Disponible en

<https://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Acceso/URM/GestionURMTrabSalud/ReunionTecnica/VIII/Dia2/Antimicrobianos/PlanNacionalATM-2017-2021.pdf>

- Jha, P., Kim, C. M., Kim, D. M., Chung, J. H., Yoon, N. R., Jha, B., Kim, S. W., Jang, S. J., Ahn, Y. J., Chung, J. K., & Jeon, D. Y. (2016). Transmission of *Enterobacter aerogenes* septicemia in healthcare workers. SpringerPlus. Disponible en <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3011-x>
- Kuan, L., Chung, L., Miao, C., Tzu, Y., Kai, C., Wan, L., & Horng, L. (2020). Synergistic Actions of Benzyl Isothiocyanate with Ethylenediaminetetraacetic Acid and Efflux Pump Inhibitor Phenylalanine-Arginine β -Naphthylamide Against Multidrug-Resistant *Escherichia coli*. Microbial Drug Resistance. Disponible en <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0118>
- Lamers, R., Cavallari, J., & Burrows, L. (2013). The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. PLOS ONE. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060666>
- Lomovskaya, O., Warren, M., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., Leger, R., Hecker, S., Watkins, W., Hoshino, K., Ishida, H., & Lee, V. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy. Disponible en <https://doi.org/10.1128/AAC.45.1.105-116.2001>
- Lomovskaya, O., & Zgurskaya, H. (2011). Efflux Pumps from Gram-negative Bacteria: From Structure and Function to Inhibition. Emerging Trends in Antibacterial Discovery. Disponible en <https://www.caister.com/hsp/abstracts/antibacterial-discovery/04.html>
- Malléa, M., Chevalier, J., Eyraud, A., & Pagès, J-M. (2002). Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. Biochemical and

- Biophysical Research Communications. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00404-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00404-7).
- Masi, M., Pagès, J.-M., & Pradel, E. (2003). Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA–AcrB–TolC multidrug efflux pump. *Journal of Chromatography B*. Disponible en [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00746-8)
- Mello, J., & Gales, A. (2016). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: Focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>
- Moura, Q., Fernandes, M., Cerdeira, L., Nhambe, L., lenne, S., Souzac, T., & Lincopan, N. (2017). Draft genome sequence of a multidrug-resistant kpc-2-producing *Enterobacter aerogenes* isolated from a hospitalised patient in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.016>
- Nanmeni, G., Tedonkeu, A. T., Fankam, A. G., Mbaveng, A. T., Wamba, B. E., Nayim, P., Bitchagno, G. T., Nzogong, R. T., Awouafack, M. D., Tene, M., Beng, V. P., & Kuete, V. (2021). An efflux pumps inhibitor significantly improved the antibacterial activity of botanicals from *Plectranthus glandulosus* towards MDR phenotypes. *The Scientific World Journal*. Disponible en <https://doi.org/10.1155/2021/5597524>
- Odds, F. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Disponible en <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>
- Ospina, M., Pietralonga, P., Schwarz, D., Silva, A., Paula, S., & Moreira, M. (2014). Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl β -naphthylamide (PA β N) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. *Research in Veterinary Science*. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.05.013>

- Peña, I. (2021). Tratamiento con inhibidor fenilalanina-arginina β -naftilamida sobre resistencia bacteriana en cepas de *Acinetobacter baumannii* aisladas Hospital Regional Docente de Cajamarca 2018. Universidad de San Martín de Porres (USMP). Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12727/8565>
- Plasencia, S. (2019), Presentación clínica, epidemiología molecular y sensibilidad antimicrobiana de *Acinetobacter baumannii* en muestras de pacientes provenientes del instituto nacional de enfermedades neoplásicas (INEN). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC). Disponible en <http://hdl.handle.net/10757/648790>
- Philippe, N., Maigre, L., Santini, S., Pinet, E., Claverie, J.-M., Davin-Régli, A.-V., Pagès, J.-M., & Masi, M. (2015). In vivo evolution of bacterial resistance in two cases of *Enterobacter aerogenes* infections during treatment with imipenem. PLOS ONE. Disponible en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138828>
- Sanchez, S., Lamata, M., Leiva, J., Blondelle, S.E., Jerala, R., Andrä, J., Brandenburg, K., Lohner, K., Moriyón, I., & Martínez-de-Tejada, G. (2008). Comparative analysis of selected methods for the assessment of antimicrobial and membrane-permeabilizing activity: a case study for lactoferricin derived peptides. BMC Microbiology. Disponible en <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-196>
- Silvano, E., & Giuseppe D. (2017). Update on the main MDR pathogens: prevalence and treatment options. Le Infezioni in Medicina (InfezMed). Disponible en https://www.infezmed.it/index.php/article?Anno=2017&numero=4&ArticoloDaVisualizzare=Vol_25_4_2017_301
- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T., & Ma, S. (2015). RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. Frontiers in microbiology. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00377>

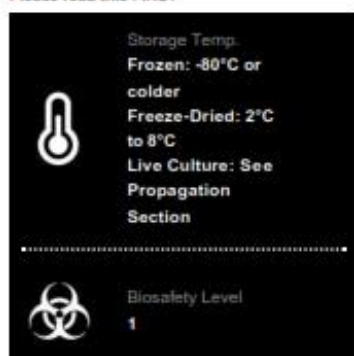
- Xian, L., Plésiat, P., & Hiroshi, N. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. Disponible en <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Yu, E., Aires, J., McDermott, G., & Nikaido, H. (2005). A Periplasmic Drug-Binding Site of the AcrB Multidrug Efflux Pump: A Crystallographic and Site-Directed Mutagenesis Study. *Journal of Bacteriology*. Disponible en <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/jb.187.19.6804-6815.2005>

IX. ANEXOS

Anexo 1. Inserto de la cepa *Enterobacter aerogenes* (ATCC® 13048™) empleada en la investigación.



Please read this FIRST



Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Enterobacter aerogenes* (ATCC® 13048™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.858.8597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor



Description

Designation: NCDC 819-56 [Cloaca B, IFO 13534, NCTC 10006]

Deposited Name: *Aerobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards

Product Description: Type strain. Used in assays and bacterial resistance testing, and as a quality control strain for BD and bioMérieux Vitek products. This strain is recommended by ATCC® for use in the tests described in ASTM Standard Test Method D4783-89 where only the taxon is specified.



Propagation

Medium

ATCC® Medium 3: Nutrient agar or nutrient broth

Growth Conditions

Temperature: 30°C

Atmosphere: Aerobic

Propagation Procedure

1. Open vial according to enclosed instructions.
2. Using a single tube of #3 broth (5 to 6 mL), withdraw approximately 0.5 to 1.0 mL with a Pasteur or 1.0 mL pipette. Rehydrate the entire pellet.
3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.
4. Use several drops of the suspension to inoculate a #3 agar slant and/or plate.
5. Incubate all tubes and plate at 30°C for 24 hours.



Notes

Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at www.atcc.org.



References

References and other information relating to this product are available online at www.atcc.org.



Biosafety Level: 1

Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.

ATCC Warranty

ATCC® products are warranted for 30 days from the date of shipment, and this warranty is valid only if the product is stored and handled according to the information included on this product information sheet. If the ATCC® product is a living cell or microorganism, ATCC lists the media formulation that has been found to be effective for this product. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this product. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.

This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at www.atcc.org.




Product Sheet


Enterobacter aerogenes
(ATCC® 13048™)

Additional information on this culture is available on the ATCC web site at www.atcc.org.
© ATCC 2018. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection. [01/26]

Please read this FIRST



Storage Temp.
Frozen: -80°C or colder
Freeze-Dried: 2°C to 8°C
Live Culture: See Propagation Section



Biosafety Level
1

Intended Use

This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Citation of Strain

If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: *Enterobacter aerogenes* (ATCC® 13048™)

American Type Culture Collection
PO Box 1549
Manassas, VA 20108 USA
www.atcc.org

800.638.8597 or 703.365.2700
Fax: 703.365.2750
Email: Tech@atcc.org

Or contact your local distributor



ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACION N° 001-2023-FCCBB-UI

Siendo las 15:00 horas del día 12 de junio de 2023, se reunieron los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada **"Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de flujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) frente a la resistencia de *Enterobacter aerogenes*"**, designados por Resolución 281-2022-VIRTUAL-FCCBB/D de fecha 16 de agosto de 2022, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dr. Pedro Jorge Chimoy Effio
MSc. Roberto Ventura Flores
Lic. Roberto Díaz Sipión
MSc. Jorge Antonio Fupuy Chung

Presidente
Secretario
Vocal
Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 129-2023-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 09 de junio de 2023.

La Tesis presentada y sustentada por el **Bachiller ROGGER MELANIO DÍAZ LOZANO** tuvo una duración de 30... minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurados; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de *(MUY BUENO)* (18/26) en la escala vigesimal.

Por lo que el Bachiller **ROGGER MELANIO DÍAZ LOZANO** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman

Dr. Pedro Jorge Chimoy Effio,
Presidente

Lic. Roberto Díaz Sipión,
Vocal

MSc. Roberto Ventura Flores
Secretario

MSc. Jorge Antonio Fupuy Chung
Asesor

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, Jorge Anotnio Fupuy Chung, Asesor(a) de Tesis, del bachiller Rogger Melanio Díaz Lozano

Titulada: Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de eflujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) frente a la resistencia de *Enterobacter aerogenes*, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 18% verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 15 de mayo del 2023.



Fupuy Chung, Jorge Antonio
DNI:16720210
ASESOR

Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de eflujo fenilalanina arginina β -naftilamida (PA β N) frente a la resistencia de Enterobacter aerogenes

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%	EN	17%	14%	%
INDICE DE SIMILITUD		FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	uknowledge.uky.edu	1%
	Fuente de Internet	
2	www.ncbi.nlm.nih.gov	1%
	Fuente de Internet	
3	Kuan-Hua Lin, Chung-Cheng Lo, Miao-Chen Chou, Tzu-Hui Yeh, Kai-Lin Chen, Wan-Yu Liao, Horng-Ren Lo. " Synergistic Actions of Benzyl Isothiocyanate with Ethylenediaminetetraacetic Acid and Efflux Pump Inhibitor Phenylalanine-Arginine β -Naphthylamide Against Multidrug-Resistant ", Microbial Drug Resistance, 2020	1%
	Publicación	
4	www.frontiersin.org	1%
	Fuente de Internet	
5	repositorio.upch.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	

www.hindawi.com

Salazar J.

6	Fuente de Internet	1 %
7	digital.library.adelaide.edu.au Fuente de Internet	1 %
8	www.univ-dschang.org Fuente de Internet	1 %
9	ujcontent.uj.ac.za Fuente de Internet	1 %
10	www.mdpi.com Fuente de Internet	<1 %
11	www.locus.ufv.br Fuente de Internet	<1 %
12	sciencepubco.com Fuente de Internet	<1 %
13	www.dspace.uce.edu.ec:8080 Fuente de Internet	<1 %
14	dokumen.pub Fuente de Internet	<1 %
15	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
16	doku.pub Fuente de Internet	<1 %
17	digitalscholarship.unlv.edu Fuente de Internet	<1 %

Salazar J.

18	psecommunity.org Fuente de Internet	<1 %
19	cyberleninka.org Fuente de Internet	<1 %
20	hal-amu.archives-ouvertes.fr Fuente de Internet	<1 %
21	shura.shu.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
22	Davin-Regli, Anne, and Jean-Marie Pagès. "Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment", Frontiers in Microbiology, 2015. Publicación	<1 %
23	peerj.com Fuente de Internet	<1 %
24	Quézia Moura, Miriam R. Fernandes, Louise Cerqueira, Lúcia F. Nhambe, Susan lenne, Tiago A. Souza, Nilton Lincopan. "Draft genome sequence of a multidrug-resistant KPC-2- producing Enterobacter aerogenes isolated from a hospitalised patient in Brazil", Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2017 Publicación	<1 %
25	m.scirp.org Fuente de Internet	<1 %

Handwritten signature

26	edepot.wur.nl Fuente de Internet	<1 %
27	repositorioacademico.upc.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
28	scholar.sun.ac.za Fuente de Internet	<1 %
29	www.biorxiv.org Fuente de Internet	<1 %
30	Gravalain Nanmeni, Alex T. Tedonkeu, Aimé G. Fankam, Armelle T. Mbaveng et al. "An Efflux Pumps Inhibitor Significantly Improved the Antibacterial Activity of Botanicals from <i>Plectranthus glandulosus</i> towards MDR Phenotypes", The Scientific World Journal, 2021 Publicación	<1 %
31	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
32	followscience.com Fuente de Internet	<1 %
33	scholar.unair.ac.id Fuente de Internet	<1 %
34	uthealth.influent.utsystem.edu Fuente de Internet	<1 %
35	www.unboundmedicine.com	

Handwritten signature

	Fuente de Internet	<1 %
36	"Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight", Springer Science and Business Media LLC, 2015 Publicación	<1 %
37	www.springerprofessional.de Fuente de Internet	<1 %
38	discovery.dundee.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
39	dspacetest.cgiar.org Fuente de Internet	<1 %
40	ugspace.ug.edu.gh Fuente de Internet	<1 %
41	www.igi-global.com Fuente de Internet	<1 %
42	etheses.bham.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
43	www.labome.org Fuente de Internet	<1 %
44	www.tandfonline.com Fuente de Internet	<1 %
45	studyres.com Fuente de Internet	<1 %

Salvador J.

46	Anne Davin-Regli, Jean-Philippe Lavigne, Jean-Marie Pagès. " spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance ", Clinical Microbiology Reviews, 2019 Publicación	<1 %
47	link.springer.com Fuente de Internet	<1 %
48	eprints.aston.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
49	Avantika Mann, Kiran Nehra, J.S. Rana, Twinkle. "Antibiotic resistance in agriculture: Perspectives on upcoming strategies to overcome upsurge in resistance", Current Research in Microbial Sciences, 2021 Publicación	<1 %
50	aricjournal.biomedcentral.com Fuente de Internet	<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

Apagado

Excluir bibliografía

Apagado

Salvador J.



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Rogger Diaz Lozano
Título del ejercicio: borrador 4
Título de la entrega: Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba ...
Nombre del archivo: D_az_Lozano_Rogger_Melanio_-_Informe_de_tesis_1.docx
Tamaño del archivo: 1,016.09K
Total páginas: 41
Total de palabras: 8,210
Total de caracteres: 48,854
Fecha de entrega: 15-may.-2023 10:50a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entre... 2093854346



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



Efecto sinérgico de la azitromicina con inhibidor de bomba de
eflujo tetratricarboxilato (PTC) frente a la
resistencia de *Enterobacter aerogenes*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AUTOR:

Dr. DIAZ LOZANO, Rogger Melanio

ASESOR:

MSc. FUPUY CHUNG, Jorge Antonio

Lambayeque, Perú
2023

Fupuy Chung, Jorge Antonio
DNI: 16720210