



REVISTA
INVESTIGACIÓN EN SALUD
UNIVERSIDAD DE BOYACÁ

ISSN: 2389 - 7325 Versión impresa
ISSN: 2539-2018 Versión electrónica en línea

PRÓXIMA PUBLICACIÓN EN LÍNEA

El Comité Editorial de la Revista de Investigación en Salud de la Universidad de Boyacá ha aprobado para publicación este manuscrito, teniendo en cuenta los conceptos de los pares evaluadores y la calidad del proceso de revisión. Se publica esta versión en forma provisional, como avance en línea de la última versión del manuscrito vinculada al sistema de gestión, previa a la estructura y composición de la maquetación y diagramación, como elementos propios de la producción editorial de la revista.

Esta versión se puede descargar, usar, distribuir y citar como versión preliminar tal y como lo indicamos, por favor, tenga presente que esta versión y la versión final digital e impresa pueden variar.

Determinación de Tolerancia a biocidas y detección de genes MdfA, TolC, MexC, MexA, acrB y oqxA en aislamientos de *Klebsiella pneumonia* y *Escherichia coli*

Sánchez-Neira Yaline¹, Urbano-Cáceres Eliana Ximena²

1. Universidad de Boyacá, Tunja. Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6848-158X>
2. Universidad de Boyacá, Tunja. Colombia. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7218-7300>

***Autor de correspondencia:** Yaline Sánchez-Neira. Universidad de Boyacá, Tunja. Correo electrónico: ysanchez@uniboyaca.edu.co

Resumen

Introducción: Los biocidas y los antibióticos son ampliamente utilizados como antimicrobianos, la diferencia entre éstos es que los biocidas no se emplean en el control de infecciones, sino en la eliminación del crecimiento microbiano, son habitualmente usados a nivel hospitalario para la inactivación y esterilización de zonas contaminadas que constituye un filtro indispensable para la no aparición de aislamientos multirresistentes. **Objetivo:** se planteó como objetivo determinar la tolerancia a biocidas y la presencia de bombas de expulsión en aislados de infecciones. **Metodología:** Es un estudio observacional, descriptivo de corte transversal, contó con 32 aislamientos de bacterias Gram negativas, de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se emplearon biocidas como Cloruro de Belzalconio, Clorexidina, Cetrimida, Cloruro de Hexadecilpiridinio y Triclosan y presencia de bombas de expulsión. **Resultados:** Se detectaron aislados tolerantes a la concentración más alta C1 (10%) de los biocidas analizados distribuidas en 15 aislados para Triclosan y 2 para clorhexidina, de estas el mayor porcentaje pertenecen a aislados de *E. coli*. **Conclusiones:** se concluye que en las 17 aislados de *Escherichia coli* y 16 a *Klebsiella pneumoniae*, se detectó la presencia de los genes *mdfA*, *ToIC*, *MexC*, *MexA*, *acrB* y *oqxA*, los cuales codifican para presencia de bombas de expulsión.

Palabras clave: triclosán; tolerancia; bacterias gramnegativas, desinfectantes, reacción en cadena de la polimerasa

Determination of tolerance to biocides and detection of MdfA, ToIC, MexC, MexA, acrB and oqxA genes in isolates of Klebsiella pneumonia and Escherichia coli

Abstract

Introduction: Biocides and antibiotics are widely used as antimicrobials, the difference between them is that biocides are not used to control infections, but rather to eliminate microbial growth. They are usually used at the hospital level for the

inactivation and sterilization of contaminated areas that constitute an essential filter for the non-appearance of multi-resistant insulation. **Objective:** The objective was to determine tolerance to biocides and the presence of efflux pumps in infection isolates. **Methodology:** It is an observational, descriptive cross-sectional study, it included 32 isolates of Gram-negative bacteria, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, biocides such as Benzalkonium Chloride, Chlorhexidine, Cetrimide, Hexadecylpyridinium Chloride and Triclosan were used and the presence of efflux pumps. **Results:** Isolates tolerant to the highest concentration C1 (10%) of the biocides analyzed were detected, distributed in 15 isolates for Triclosan and 2 for chlorhexidine, of which the highest percentage belonged to *E. coli* isolates. **Conclusions:** it is concluded that in the 17 *Escherichia coli* isolates and 16 *Klebsiella pneumoniae* isolates, the presence of the genes *mdfA*, *TolC*, *MexC*, *MexA*, *acrB* and *oqxA* was detected, which code for the presence of efflux pumps.

Keywords: triclosan; tolerance; Gram-Negative bacteria, disinfectants, polymerase chain reaction

INTRODUCCIÓN

Los biocidas hacen parte importante de los protocolos y estrategias que se utilizan para disminuir la adquisición y diseminación de las infecciones asociadas a la atención de salud (IAAS) y se ha venido documentado la eficacia de estos compuestos en los procesos de desinfección (1). La sensibilidad a estos compuestos de los principales patógenos del ser humano ha sido poco explorada, a diferencia de lo que sucede con los antibióticos (2,3).

La tolerancia a biocidas fue demostrada por primera vez mediante el triclosan en aislados de *Escherichia coli*, lo que permitió identificar bacterias tolerantes a éste agente químico (4). Posteriormente, numerosos estudios han documentado el desarrollo de resistencias cruzadas a antibióticos en aislados de diferentes especies

como *Salmonella enterica*, *Salmonella marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Enterobacter asburiae*, *Aranicola proteolyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp. y *Enterococcus* spp. de diversos orígenes con importancia clínica (5).

Es así como en la medida que se conocen los mecanismos de resistencia a los antibióticos y biocidas, se puede esperar el desarrollo de aislados altamente resistentes, debido a que los mecanismos que genéticamente se activan para uno de éstos compuestos se puede emplear en el otro, se establece entonces una posible resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas, que llevarían a un incremento en la resistencia a antibióticos y al aumento en la prevalencia de microorganismos resistentes en los hospitales (6).

El fenómeno de multiresistencia está frecuentemente asociado con la hiperpresencia de los transportadores que reconocen y expulsan eficientemente al exterior de la célula un amplio rango de compuestos estructuralmente no relacionados, dentro de estos transportadores se encuentran las bombas de expulsión; que son sistemas capaces de exportar un amplio rango de compuestos como biocidas, colorantes o antibióticos mediante gradientes de iones transmembrana (protones o sodio) o por la hidrólisis del ATP, están formadas de 3 proteínas estructurales: un canal o porina en la membrana externa, una proteína adaptadora situada en el periplasma y una proteína transportadora en la membrana interna, encargadas de expulsar moléculas que al pasar hacia citoplasma afecten la integridad de la bacteria (7).

La presencia de bombas de expulsión se considera un mecanismo de resistencia mixto porque puede ser adquirido, cuando están presentes en un elemento genético móvil o una mutación que ocasiona su sobrepresencia, o intrínseco, si están codificadas por el propio ADN del microorganismo; la presencia de las bombas de

exporte suele estar sometida a regulación transcripcional a través de productos de genes activadores o represores que se unen al ADN (8). Los genes de bombas de expulsión, localizados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano, se dividen en cinco grandes familias de acuerdo con su composición, número de regiones transmembrana, fuentes de energía y sustratos (9).

En el País, surge la preocupación por la creciente tolerancia a biocidas que están desarrollando las bacterias en especial las bacterias Gram negativas; no obstante, las herramientas epidemiológicas usadas para monitorear la resistencia a los antibióticos pueden a su vez servir para vigilar los cambios en la susceptibilidad de los patrones a los biocidas (6), por lo cual, la presente investigación busca determinar la tolerancia a biocidas y la presencia de bombas de expulsión en aislados clínicos provenientes de infecciones, de manera tal se pueda establecer datos que sean útiles a nivel regional y nacional.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se planteó un estudio observacional, descriptivo de corte transversal, a partir de aislamientos bacterianos de origen clínico los cuales ya contaban con confirmación de fenotipo y genotipo de resistencia antimicrobiana, provenientes de servicios de urgencias, consulta externa, urgencias pediátricas, cirugía, hospitalización, ginecología, hospitalización pediatría y UCI de un centro hospitalario de segundo nivel del departamento de Boyacá las cuales correspondían a aislados de bacilos Gram negativos con presencia de más de un gen de resistencia aislados de infecciones (*AmpC*, *bla TEM*, *bla CTXM1*, *bla SHV*), esta identificación se realizó por PCR convencional, como control interno, se utilizó aislados de referencia. Para la determinación de tolerancia se seleccionaron los biocidas: Cloruro de Belzalconio 63249 SIGMA-ALDRICH, Clorhexidina C9394 SIGMA-ALDRICH, Cetrimide M 7635 SIGMA-ALDRICH, Cloruro de Hexadecilpiridinio monohidratado C 9002 SIGMA-

ALDRICH y Triclosan 72779 SIGMA-ALDRICH por ser estos ampliamente utilizados como compuestos químicos en instituciones prestadoras de servicios de salud.

Para los ensayos de microtitulación de los Biocidas (adaptado de Lerma, L. L., Benomar, N., Valenzuela, A. S., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., Abriouel, H. 2014), se empleó medio nutritivo líquido estéril BHI. (Ver tabla 1).

Tabla 1. Preparación de diluciones de los biocidas

Concentración		Biocida	BHI
Ci	10%	1 ml o 1 g	9 ml
C1	1%	1 ml (de Ci)	9 ml
C2	0.25%	250 µl (de Ci)	9750 µl
C3	0.025%	50 µl (de Ci)	9950 µl
C4	0.0025%	25 µl (de C1)	9975 µl
C5	0.00025%	100 µl (de C3)	9900

Fuente. Ensayo microtitulación para biocidas ⁽⁹⁾

Para el montaje en placa se agregó en el pocillo de microtitulación 180 µl de Ci (1ml o 1g del Biocida + 9 ml de alcohol etílico 96° = Ci) de la dilución del biocida, desde la fila A a la F (C1 a C5) para cada aislado bacteriana llenando la columna 1 a la 11. Se inoculó 20 µl de la dilución 1/10 del cultivo bacteriano puro en todos los pocillos de la fila A - F, llenando así de la columna 1 a la 11, mientras que para el control negativo se adicionó 200 µl de caldo BHI estéril en la fila G, 180µl de caldo BHI estéril con 20 µl de la aislado en la fila H como control positivo y un control negativo del biocida a ensayar en distintas concentraciones desde el C1 – C5 en la columna 12. Una vez completada la microplaca se incubaron a 37°C durante 24 horas según el crecimiento de cada bacteria a analizar. Para la lectura se empleó el lector de microplacas (equipo microplate Reader) a 595 nm.

Pruebas moleculares

Para la identificación de los genes de resistencia, se realizó una extracción de ADN empleando el kit de extracción de Promega “Wizard” Genomic DNA Purification siguiendo las instrucciones del fabricante (11). El ADN obtenido fue cuantificado empleando un protocolo basado en un marcador fluorescente intercalante (12). Para esto se empleó el equipo de Quantus™ Fluorometer (Promega) y el kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR convencional, con el reactivo Safe-Green™ 2X PCR Taq MasterMix (ABM) siguiendo las instrucciones del fabricante, en un termociclador Labocon y se evidenciaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en TAE 1%, empleando safeview classic (ABM) como agente intercalante, y opti DNA Marker 1Kb (ABM) como marcador de peso molecular. Las bandas se evidenciaron en un transiluminador UltraSlim Led Illuminator Maestrogen.

Para la detección molecular de genes que codifican para la tolerancia a biocidas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se realizaron según el protocolo 005 del laboratorio de epidemiología molecular empleando los iniciadores y condiciones establecidas por Paterson 2003 (13) y cada biocida tiene una concentración mínima inhibitoria (CIM) frente a un microorganismo específico que define la capacidad para inhibir el crecimiento microbiano (2,13).

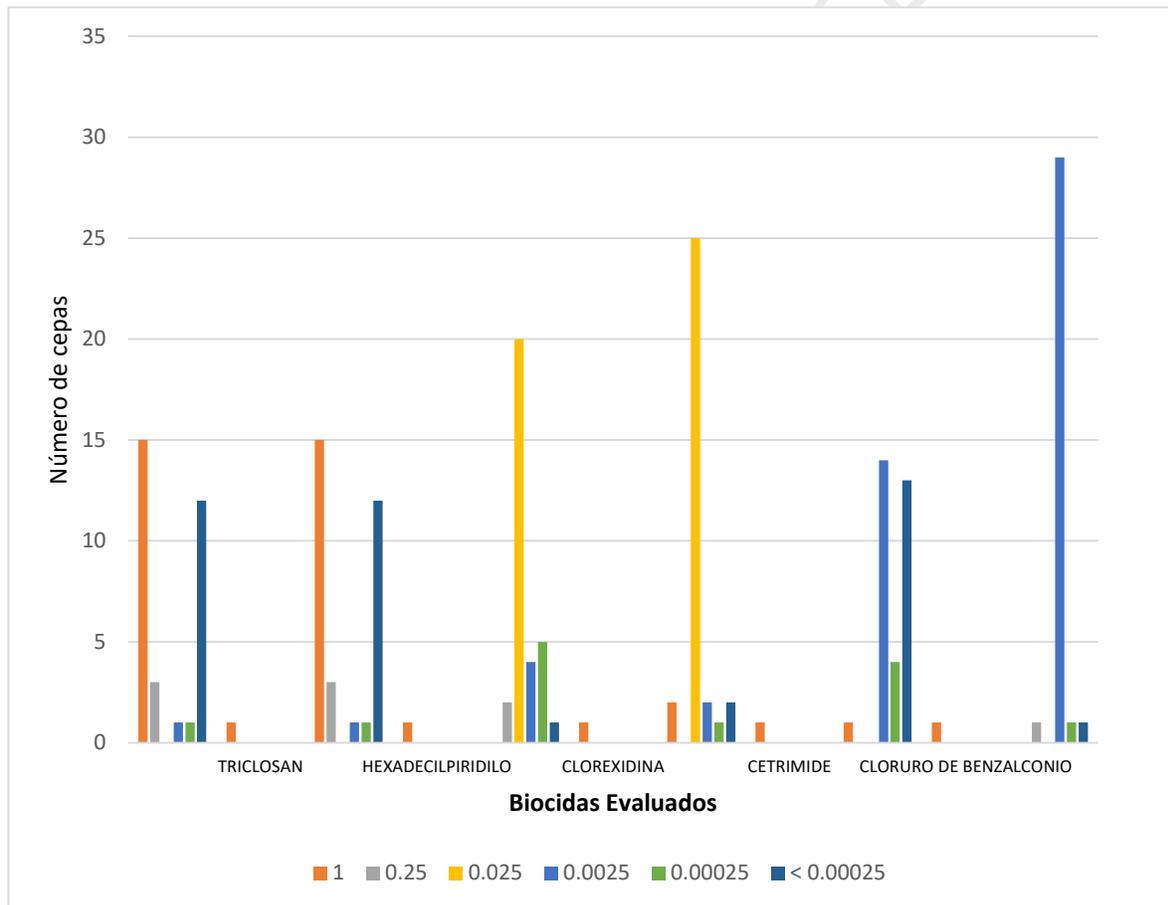
RESULTADOS

Se contó con un total de las 36 aislamientos bacterianos el 55.6 % (n= 20) correspondió a *Escherichia coli* (*E.coli*) y el 41.7 % (n=15) a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), mientras que la bacteria de *Klebsiella oxytoca* con un 2.8 % (n=1).

Perfiles de tolerancia

En el presente estudio se detectaron aislados tolerantes a la concentración más alta C1 (1%) de los biocidas analizados distribuidas en 15 aislados para Triclosan y 2 para Clorhexidina, de estas el mayor porcentaje pertenecen a aislados de *E. coli*. Por el contrario, la tolerancia a concentraciones más bajas C5 (0,00025%), en donde, se esperaba hallar un número de aislados considerables se encontró que tan sólo 17 de ellos fueron tolerantes al biocida cetrimide, 13 aislados a triclosan y 6 para cloruro de hexadecilpiridinio cloruro de hexadecilpiridinio (Figura 1).

Figura 1. Perfil de tolerancia a biocidas

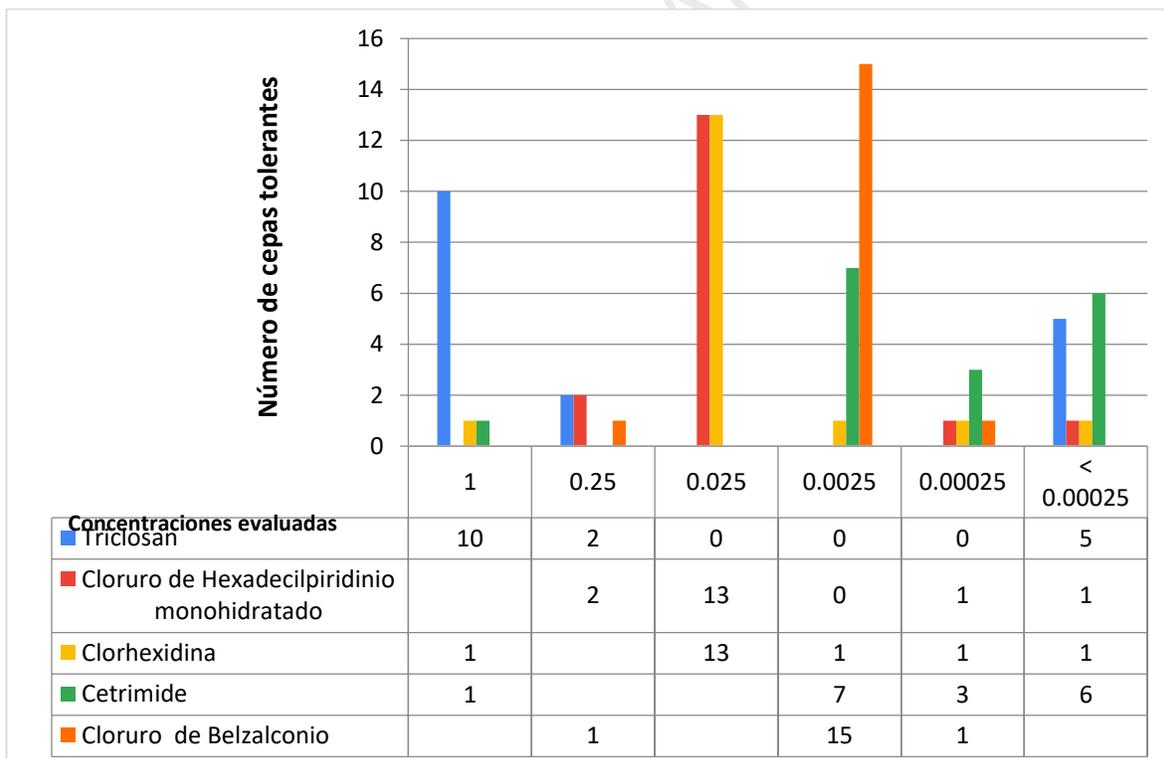


Fuente: El estudio

Tolerancia de *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos para los diferentes cultivos bacterianos de *E. coli*, mostraron que determinados biocidas como Cloruro de Benzalconio, Cloruro de Hexadecilpiridinio monohidratado y Clorhexidina inhiben a la mayoría de los aislados a una concentración de 0.025% y 0.0025% (figura 2), lo que permite distinguir los aislados de *E. coli* patógenos de los demás por la capacidad que poseen de producir enfermedades severas como consecuencia de su información genética para la creación de toxinas (15-17).

Figura 2. Perfil de tolerancia de *E. coli* a los biocidas

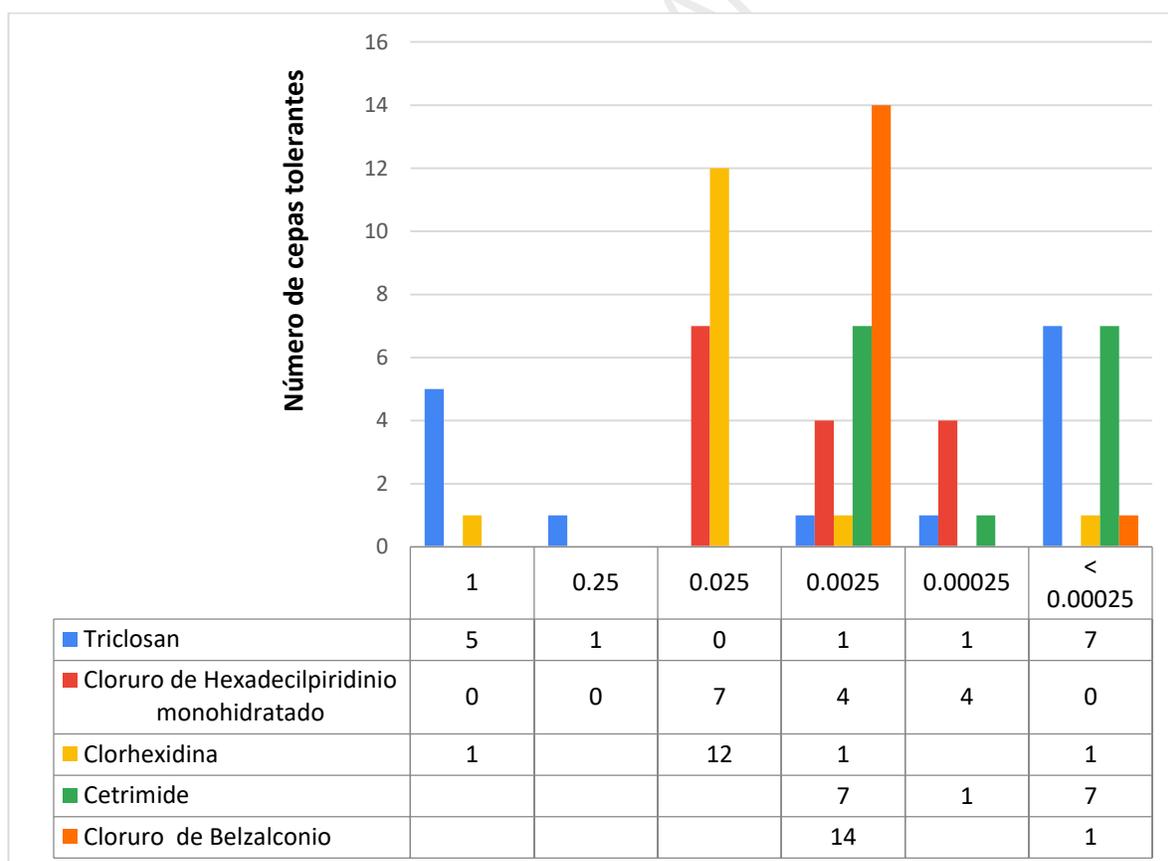


Fuente: El estudio

Tolerancia de *Klebsiella pneumoniae*

En el presente estudio se observó que la mayoría de los aislados es tolerante a concentraciones entre 0.025 % y 0.0025 % de biocidas como el Cloruro de Benzalconio y el Cloruro de Hexadecilpiridinio, como se muestra en la figura 3, esta bacteria se encuentra asociada a infecciones oportunistas, convirtiéndose en una importante amenaza clínica y para la salud pública debido a la creciente prevalencia de infecciones asociadas a la asistencia sanitaria causadas por aislados multirresistentes y tolerantes a los biocidas como se evidencia en los resultados obtenidos (18).

Figura 3. Perfil de tolerancia de *K. pneumoniae* a los biocidas



Fuente: el estudio

Tolerancia a Biocidas

Triclosán

La presente sustancia química, presenta un crecimiento en las diluciones extremas de tolerancia (C1 – <C5), donde 12 de los 36 aislamientos bacterianos fueron sensibles a concentraciones utilizadas por este biocida ya que no se evidencia crecimiento bacteriano y 15 de ellas como tolerantes al biocida por presentar crecimiento en la dilución más concentrada (10 %), en la que la tolerancia por aislado estudiada, permite observar, que la aislado de *E. coli* evaluadas presentan una mayor tolerancia al Triclosán; con respecto a las aislados de *K. pneumoniae*, esto debido a la evidencia de crecimiento en las concentraciones evaluadas, principalmente por la formación de biopelículas (biofilm), que se considera un mecanismo de tolerancia propio de las aislados bacterianas (14).

Cloruro de Hexadecilpiridinio monohidratado

Respecto a este biocida se observó que, de las 32 aislados evaluadas, se presentó crecimiento de 20 de ellas en la concentración C3 (0.025 %), resultados importantes; teniendo en cuenta que es un antiséptico, utilizado como medida profiláctica en algunos tipos de enjuagues bucales y usado como ingrediente de algunos pesticidas.

Al realizar el análisis de la tolerancia por aislados se encontró que las aislados de *E. coli* son las que presentan mayor crecimiento en la concentración C3 (0.025%), con un 40.6%; demostrando una vez más la capacidad de este patógeno de crear estrategias de evasión frente a los diferentes biocidas empleados en la presente investigación.

Clorhexidina

Se encontró una tolerancia relevante en la presente investigación a este biocida que podría asociarse con los perfiles de resistencia a antibióticos de las aislados evaluadas en la cual, de las 32 aislados 25 de ellas crecieron en la concentración C3= 0.025 %, que el 40.6% correspondió a *E. coli*, mientras que el 37.5% fue para *K. pneumoniae*, por lo cual, que se describe una alta relación entre la resistencia a Antimicrobianos y la tolerancia a los biocidas por una posible resistencia inducida (19).

Cetrimide

En este biocida, se presentó crecimiento en 14 aislados en la concentración C4, y 13 aislados en la concentración <C5, pudiendo inferir que este compuesto tiene mayor especificidad en bacterias Gram positivas, por lo cual se debe tener en cuenta la acción antiséptica y bactericida que actúa de forma más marcada sobre bacterias Gram positivas que sobre Gram negativas y también sobre algunos hongos y virus, aunque no frente a esporas (20).

Cloruro de Benzalconio

En cuanto a la resistencia frente a Cloruro de Benzalconio, se detectó crecimiento de 29 de las aislados de estudio en la concentración C4 (0.0025%), de las cuales el 46.8% correspondió a *E. coli* y mientras que el 43.7% fue para *K. pneumoniae*, datos importantes ya que, es frecuente su desarrollo por exposición a concentraciones subinhibitorias del compuesto.

Evaluación de la presencia de genes que codifican para las bombas de expulsión de fármacos en aislados bacterias Gram negativas aisladas a partir de infecciones.

Para detectar los genes asociados a la presencia de bombas de expulsión, se utilizó la técnica de PCR convencional en 32 aislados bacterianas Gram negativas, de las cuales 17 corresponden al género de *Escherichia coli* y 16 a *Klebsiella pneumoniae* (13).

Dentro de los genes que fueron utilizados para la identificación de bombas de expulsión en las aislados bacterianas Gram negativas mencionadas anteriormente se encuentran: *MdfA*, *ToIC*, *MexC*, *MexA*, *acrB* y *oqxA*, como controles en el proceso de amplificación en el presente estudio, se utilizó como control positivo la aislado de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y la aislado *Escherichia coli* ATCC 25922, como control negativo; mediante montaje PCR, para amplificación de los genes *mdfA*, *ToIC*, *mexA*, *MexC*, *AcrB* y *oqxA*.

Teniendo en cuenta, los resultados obtenidos en la aislado de *Klebsiella pneumoniae*, se evidencia que los genes que presentaron mayor presencia fueron el *mdfA* y *ToIC* con 16 aislados respectivamente, seguido del gen *MexA* con 14 aislados, 12 aislados en cada uno de los genes de *MexC* y *acrB* y por último el gen que presentó menor presencia en las aislados bajo estudio, fue el gen *oqxA* con 4 aislados. Por otro lado, en las aislados de *Escherichia coli*, se detectó que en el gen *mdfA* 17 aislados que presentaron la presencia del gen, mientras que para los genes *ToIC* y *MexC* 15 aislados los expresaron en cada uno de ellos, seguido del gen *MexA* 13 aislados, para el gen *acrB* 12 aislados y 7 para el gen *oqxA*, como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Genes de bombas de expulsión en aislados de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

Microorganismo	Aislamientos evaluados	Genes de Resistencia a antibióticos			
		<i>AmpC</i>	<i>blaTEM</i>	<i>blaCTXM1</i>	<i>blaSHV</i>
<i>Escherichia coli</i>	17	0	17	11	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	2	15	2	8
Total Aislados	32	2	32	13	10

Fuente: El estudio

Por lo anterior, se evidencia que el gen *oqxA* es el que menor número de aislados lo expresaban tanto en de *Klebsiella pneumoniae* (25%) como en *Escherichia coli* (41.1%), datos que permiten determinar que los mecanismos de resistencia de las aislados de estudio no se encuentran asociados a las bombas de expulsión. Sin embargo, en aquellas aislados en las cuales está presente el gen *oqxA*, se debe tener en cuenta que es responsable de conferir resistencia a antibióticos, como las cefalosporinas y aminoglicosidos, a su vez tener mecanismos que muestran una amplia especificidad de sustrato, siendo capaces de expulsar una variedad de compuestos, estos sistemas de eflujo incluyen una variedad de genes que estimulan la presencia de bombas de eflujo (21,22).

En las aislados de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, se encuentran presentes genes para *acrB*, lo que muestra que éstos dos microorganismos tienen la bomba de expulsión *AcrAB-TolC*, principalmente el TolC que está presente en todas las aislados de *Klebsiella pneumoniae* y la gran mayoría de *Escherichia coli*; lo que facilita ese canal de transporte mediante sistemas de eflujo a través de las membranas de estas bacterias Gram negativas, que permite la expulsión de los antibióticos y agentes químicos. Lo anterior les confiere a estos microorganismos el

poder sobrevivir a la acción de los diferentes agentes químicos y antibióticos, que a su vez puede generar resistencias y tolerancias cruzadas.

Asimismo, la proteína *AcrAB*, va facilitar la interacción con otras proteínas, que han sido implicadas como un mediador en la susceptibilidad reducida a la tigeciclina en varios microorganismos Gram negativos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y los aislados de este estudio; éstos mecanismos hacen que se presenten perfiles de resistencia a antibióticos, mediante el transporte de una gran variedad de compuestos químicos, que hacen que se aumente a través del tiempo la resistencia antimicrobiana (23,24).

En los aislados de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se encuentra presente el gen *MexA*, con el 76.4% y 87.5% y el gen *MexC* con el 88,2 % y 70.0% respectivamente en estos microorganismos, resultados muy similares a otros estudios en los cuales la presencia de éstos genes codifica bombas de flujo y se les atribuye la responsabilidad de la resistencia a los β -lactámicos. Este tipo de bombas tiene tres componentes: una proteína de fusión de membrana que está asociada con la membrana citoplásmica, una proteína accesoria periplásmica como *MexA*, *MexC*, *MexE* y *MexX*, que son el resultado de la sinergia entre la impermeabilidad de la membrana externa y las bombas de flujo codificadas cromosómicamente (25).

Por consiguiente, el gen *MdfA*, se encuentra presente en el 100% para *Escherichia coli* y 94.1% para *Klebsiella pneumoniae*, tiene alta capacidad de interacción con diferentes compuestos químicos y a su vez, es el determinante importante en la translocación de protones y la actividad de transporte de múltiples fármacos, impulsando la salida de éstos agentes lo cual está relacionado con las posibles resistencias por parte de los antibióticos (26).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran la capacidad que tienen las bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae*, para transportar sustancias químicas mediante bombas de flujo al exterior de las células bacterianas; similar a los hallazgos reportados por Masi et al., en el cual éstas bacterias implementan un sistema tripartito conformado por un transportador de membrana interna, proteínas adaptadoras y canales de membrana interna (27).

Este mismo estudio resalta la función del sistema AcrAB-TolC presente en enterobacterias principalmente *E. coli*; que permite ese transporte de sustancias y tolerar diferentes ambientes, datos similares al presente estudio en las cuales, el TolC está presente en todas las aislados de *Klebsiella pneumoniae* y la gran mayoría de *Escherichia coli* (28).

Algunas investigaciones reportan datos de tolerancia a concentraciones similares a la presente investigación y se plantea la posibilidad de que esta tolerancia sea mediada por los sistemas de bombas de eflujo, éstas presentan un componente iónico, específicamente el ión hidrógeno, desempeñando un papel principal en la resistencia a los antimicrobianos, especialmente en el caso de los biocidas, siendo de un sistema independiente del gen *TolC* de un solo componente y se destacan dentro de los principales microorganismos involucrados en la tolerancia a los biocidas por medio de las bombas de eflujo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (2).

La Clorhexidina y el Cloruro de Hexadecilpiridinio monohidratado, son biocidas empleados ampliamente como antisépticos de amplio espectro y tienen acción frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las concentraciones de biocidas utilizadas en los hospitales son lo suficientemente altas como para prevenir el crecimiento bacteriano. No obstante, la preparación inadecuada de biocidas o la

pérdida de eficacia pueden resultar en la presencia de concentraciones de biocidas residuales o subinhibidores, que podrían favorecer la persistencia y selección de algunos determinantes de la tolerancia frente a estos compuestos (29).

Por otro lado, diversos estudios confirman la eficacia de Cetrimide, en la destrucción de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* al interactuar con la matriz extracelular, así como la destrucción de cultivos formadores de éstas si se encuentra en combinación con EDTA, ácido cítrico o clorhexidina, además de favorecer el efecto antibacteriano de algunos antibióticos (30).

Dicha adaptación parece transmitirse a las sucesivas generaciones e implica una serie de cambios, en la composición de ácidos grasos, presencia de genes de resistencia como son el gen *acrB* del sistema de exporte AcrAB/TolC o el gen *sugE* y genes relacionados con el estrés osmótico y oxidativo como *hdeA*, *ompF* o *ompW* ó cambios morfológicos como modificaciones en la fluidez de la membrana, en la longitud de las células o cambios en los filamentos celulares (31).

E. coli y *K. pneumoniae* presentaron tolerancia a la mayoría de los biocidas, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por López y colaboradores en 2010, en el cuál, presentaron inhibición a las mismas concentraciones del presente estudio, sugiriendo que el uso de este agente puede variar dependiendo de la aislado y su origen (2,18). Estudios en bacterias aisladas de productos marinos mostraron una baja incidencia de tolerancia a los biocidas (32).

Asimismo, las aislados patógenas generadas en ambientes hospitalarios pueden ser eliminadas por el sistema cloacal, las cuales pueden ser resistentes a desinfectantes y antisépticos, y de esta manera producir una alteración en el balance biológico del ecosistema aumentando la proporción de bacterias resistentes en aguas tratadas (33). Por lo que es recomendable que su uso a nivel

intrahospitalario e industrial, solo sean empleados cuando sea necesario y bajo un riguroso proceso de control y vigilancia (6).

Finalmente, se debe reconocer y tener en cuenta que las bombas de expulsión/eflujo, exportan un amplio rango de compuestos como biocidas, colorantes o antibióticos mediante gradientes de iones transmembrana (protones o sodio) o por la hidrólisis del ATP, lo que le confiere un perfil de resistencia y tolerancia en las Instituciones de Salud.

Limitaciones

Dentro de la presente investigación se presentaron limitaciones respecto al procedimiento principalmente desde el procesamiento manual para la detección de tolerancia a los biocidas, ya que, a pesar de tener controles positivos, negativos y verificación del proceso, se va a tener un margen de error, por lo cual, se sugiere una qPCR dónde se puede evaluar la presencia y tolerancia en cada una de los microorganismos identificados y utilizados en las investigaciones.

CONCLUSIONES

En las 17 aislados de *Escherichia coli* y 16 a *Klebsiella pneumoniae*, se detectó la presencia de los genes *mdfA*, *TolC*, *MexC*, *MexA*, *acrB* y *oqxA*, los cuales codifican para presencia de bombas de expulsión, mediante las que se realizan procesos de eliminación de varios tipos o familias de antibióticos y compuestos químicos como los biocidas.

Éstos sistemas de eflujo le confieren una resistencia a las bacterias de interés clínico, lo que representa un aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias a los diferentes antibióticos utilizados para combatir las infecciones a nivel hospitalario, por lo cual se hace necesario contar con evidencia que correlacione los

diferentes sistemas de eflujo con las tolerancias a biocidas y resistencias a antibióticos utilizados nivel clínico.

En el presente estudio se detectaron aislados tolerantes a la concentración más alta C1 (10%) de los biocidas analizados distribuidas en 15 aislados para Triclosan y 2 para Clorexidina, siendo estos compuestos empleados en productos de cuidado personal, como los jabones de mano y los cosméticos, y a los materiales que van desde la ropa deportiva hasta los envases de alimentos por ende expresa gran preocupación la tolerancia demostrada en las aislados analizadas

Declaración de conflicto de intereses: Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses

REFERENCIAS

1. Ministerio de Salud y Protección Social. Detectar, prevenir y reducir infecciones asociadas con la atención en salud [Internet]. Bogotá; 2014 [cited 2019 Feb 14]. p. 108.
2. Almeida González LB, Fernández Márquez ML, López Aguayo MC, Lucas López R, Marín Garrido A, Gálvez del Postigo Ruiz A, et al. Resistencia a biocidas en aislados de Salmonella sp. aisladas de huevo - Dialnet. An la Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient. ISSN: 1130-2534, vol 25, 2012, pág 159-172
3. Lavilla-Lerma M-L. Estudio de los determinantes genéticos de resistencias a biocidas y su papel en la resistencia cruzada con antibióticos en bacterias de origen alimentario. 2014 Nov 7

4. Ma Carmen López Aguayo, María José Grande Burgos, Rosario Lucas López AG. Resistencia a biocidas de diferentes aislados de escherichia coli. An la Real Acad Ciencias Vet Andalucía Orient ISSN 1130-2534, Vol 23, 2010, págs 121-136
5. Puerta-García EA, Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias. Medicine (Baltimore). 2010;10(51):3426-31. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70056-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70056-1)
6. Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia médica, 38(2), 149-158. <https://doi.org/10.25100/cm.v38i2.499>
7. Soto Acosta FM. Participación de bombas de expulsión, biofilm, alginato y presencia de la proteína OprD en la resistencia a antibióticos en Pseudomonas aeruginosa [Internet]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2019.
8. Tauch A, Schlüter A, Bischoff N, Goesmann A, Meyer F, Pühler A. The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1beta backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the oxacillinase gene bla(NPS-1), and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. Mol Genet Genomics [Internet]. 2003 Feb [cited 2018 Sep 26];268(5):570-84. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0785-z>
9. Wales A, Davies R, Wales AD, Davies RH. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. Antibiotics [Internet]. 2015 Nov 13 [cited 2019 Feb 14];4(4):567-604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>
10. Deus D, Krischek C, Pfeifer Y, Sharifi AR, Fiegen U, Reich F, et al. Comparative analysis of the susceptibility to biocides and heavy metals of extended-spectrum β -

lactamase-producing *Escherichia coli* isolates of human and avian origin, Germany. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017 May 1;88(1):88-92. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.023>

11. Alonso-Hernando A, Alonso-Calleja C, Capita R. Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 2010 Feb 28 [cited 2019 Feb 14];137(2-3):130-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.022>

12. Moen B, Rudi K, Bore E, Langsrud S, Moen B, Rudi K, et al. Subminimal Inhibitory Concentrations of the Disinfectant Benzalkonium Chloride Select for a Tolerant Subpopulation of *Escherichia coli* with Inheritable Characteristics. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Mar 28. <https://doi.org/10.3390/ijms13044101>

13. Gldas He, Kececi Ad, Cetin Es, Ozturk T, Kaya B. Evaluation of antimicrobial efficacy of cetrimide and *Glycyrrhiza glabra* L. extract against *Enterococcus faecalis* biofilm grown on dentin discs in comparison with NaOCl. *Dent Mater J*

14. Patio Bello, Diana Paola, et al. "Uso de biocidas y mecanismos de respuesta bacteriana." *Revista Cubana de Investigaciones Biomdicas* 37.3 (2018): 1-17.

15. Kundu, Ramit, et al. "Burden of biocide resistance among multidrug-resistant bacteria isolated from various clinical specimens in a tertiary care hospital." *Indian Journal of Medical Microbiology* 46 (2023): 100478. <https://doi.org/10.1016/j.ijmmb.2023.100478>

16. Zheng L, Cai G, Wang S, Liao M, Li Y, Lin J. A microfluidic colorimetric biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 using gold nanoparticle aggregation and smart phone imaging. *Biosens Bioelectron.* 2019 Jan 15;124-125:143-9. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.006>

17. Fang K, Jin X, Hong SH. Probiotic *Escherichia coli* inhibits biofilm formation of pathogenic *E. coli* via extracellular activity of DegP. *Sci Reports* 2018 81 [Internet]. 2018 Mar 21. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23180-1>
18. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020 Jun 1;18(6):344-59. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
19. Gual-de-Torrella, Ana, et al. "In vitro activity of six biocides against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and presence of genes encoding efflux pumps." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 40.7 (2022): 371-376. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2021.05.016>
20. Diomedi Pacheco A, Chacón E, Delpiano L, Hervé B, Jemenao MI, Medel M, et al. Antiseptics and disinfectants: Aiming at rational use. recommendations of the advisory committee on healthcare associated infections. Sociedad Chilena de infectología. *Rev Chil Infectol* [Internet]. 2017 [cited 2021 May 17];34(2):156-74. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182017000200010>
21. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, et al. Prevalence of qnr, aac(6)-Ib-cr, qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* Isolates from Humans, Animals, and the Environment. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Jun [cited 2022 Mar 4];56(6):3423-7. <https://doi.org/10.1128/AAC.06191-11>
22. Perez F, Rudin SD, Marshall SH, Coakley P, Chen L, Kreiswirth BN, et al. OqxAB, a Quinolone and Olaquinox Efflux Pump, Is Widely Distributed among Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Human Origin. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Sep. <https://doi.org/10.1128/AAC.00725-13>

23. Bratu S, Landman D, George A, Salvani J, Quale J. Correlation of the expression of *acrB* and the regulatory genes *marA*, *soxS* and *ramA* with antimicrobial resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* endemic to New York City. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2009 Aug 1. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp186>
24. Baranova N, Nikaido H. The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the *yegMNOB* (*mdtABCD*) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate. *J Bacteriol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Mar 4];184(15):4168-76. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4168-4176.2002>
25. Curiao TIG. Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los elementos genéticos asociados a resistencia a antibióticos y biocidas en enterobacterias. [Madrid]: Universidad Complutense de Madrid; 2014.
26. Yardeni EH, Zomot E, Bibi E. The fascinating but mysterious mechanistic aspects of multidrug transport by MdfA from *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. 2018 Sep 1;169(7-8):455-60. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.09.004>
27. Muriel Masi, Matthieu Réfregiers, Klaas M. Pos, Jean-Marie Pagès. Mechanisms of envelope permeability and antibiotic influx and efflux in Gram-negative bacteria. *Nat Microbiol* [Internet]. 2017 [cited 2023 Jan 18];2(3):1-7. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.1>
28. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2006 Apr [cited 2023 Jan 18];19(2):382-402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382-402.2006>
29. Gual-de-Torrella A, Delgado-Valverde M, Pérez-Palacios P, Oteo-Iglesias J, Pascual Á, Fernández-Cuenca F. In vitro activity of six biocides against

carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and presence of genes encoding efflux pumps. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.05.004>

30. Gadea R, Fernández Fuentes MÁ, Pérez Pulido R, Gálvez A, Ortega E. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Res Int.* 85: 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.033>

31. Blair JM, Piddock LJ. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. Vol. 12, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Current Trends; 2009. p. 512-9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.07.003>

32. Romero García JL. Resistencias a diferentes antimicrobianos en aislados bacterianas procedentes de pescado. [Internet]. [Jaen]: Universidad de Jaen; 2018 [cited 2021 May 17]. Available from: <http://150.214.170.229/handle/10953/922>

33. Nuñez L, Moretton J. Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. *Hig y Sanid Ambient.* 2006;201(6):197-201.



Esta obra está bajo una licencia internacional
[Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)