



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE
AMOXICILINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A *Pseudomona*
aeruginosa MULTIRRESISTENTE.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA:

IMBAQUINGO PIJAL JESENIA LIZBETH

Riobamba – Ecuador

2023



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE
AMOXICILINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A *Pseudomona*
aeruginosa MULTIRRESISTENTE.**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: IMBAQUINGO PIJAL JESENIA LIZBETH

DIRECTORA: BQF. AÍDA ADRIANA MIRANDA BARROS MSc.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Jesenia Lizbeth Imbaquingo Pijal

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, JESENIA LIZBETH IMBAQUINGO PIJAL, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 19 de mayo de 2023

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Imbaquingo Pijal', is written over a faint, circular stamp or watermark.

Jesenia Lizbeth Imbaquingo Pijal

CI: 1004138929

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **ESTUDIO DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE AMOXICILINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A *Pseudomona aeruginosa* MULTIRRESISTENTE**, realizado por la señorita: **JESENIA LIZBETH IMBAQUINGO PIJAL**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Elizabeth del Rocío Escudero Vilema MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-05-19
BQF. Aida Adriana Miranda Barros MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-19
Dr. Igor Eduardo Astudillo Skliarova MSc. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-05-19

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, por protegerme durante este largo camino y permitirme haber llegado a este momento tan importante de mi formación profesional. A mis padres Fabián y Esperanza, por ser el pilar más importante de mi vida, gracias por brindarme su cariño y apoyo incondicional. Su dedicación y su arduo trabajo se ven reflejado en cada logro de mi vida. A mi hermano y mi familia en general, que siempre han estado junto a mí brindándome su apoyo incondicional impulsándome a ser cada día mejor y no darme por vencida. También a mis amigos, por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado, sus consejos y el inmenso cariño con el que siempre me han ayudado.

Jesenia

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por haberme dado sabiduría, paciencia y fortaleza para superar los retos que he atravesado a lo largo de la culminación de este Trabajo de Integración Curricular. A mis Padres por haber soportado momentos de ausencia durante este tiempo, por el apoyo incondicional que recibí de parte de ellos y sobre todo por siempre confiar en mí. Agradezco a todos los docentes que formaron parte de mi formación académica y personal, en especial a la Bqf. Aida Miranda y al Dr. Igor Astudillo por su paciencia y su acertada dirección en todo el proceso de realización en mi trabajo de titulación. Finalmente, a mi alma máter mi querida ESPOCH, que me permitió conocer a mis mentores de Bioquímica y Farmacia, a mis queridos amigos y colegas con los que hemos formado grandes lazos de amistad, los llevare conmigo siempre en mi corazón.

Jesenia

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	xiv

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	4
1.1 Planteamiento del problema.....	4
1.2 Justificación.....	5
1.3 Objetivos.....	7
1.3.1 Objetivo general.....	7
1.3.2 Objetivos específicos.....	7

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1. Referencias teóricas.....	8
2.1.1. <i>Escuela Superior Politécnica de Chimborazo</i>	8
2.1.2. <i>Efecto sinérgico</i>	8
2.1.2.1. <i>Tipos de mecanismo de sinergismo de antibióticos</i>	8
2.1.3. <i>Combinación de antibióticos</i>	9
2.1.3.1. <i>Ventajas de la combinación de antibióticos</i>	9
2.1.3.2. <i>Desventajas de la combinación de antibióticos</i>	9
2.1.4. <i>Actividad combinada de antibióticos</i>	9
2.1.5. <i>Interacciones entre antibióticos</i>	8
2.1.6. <i>Ensayo tablero de ajedrez</i>	10
2.1.7. <i>Índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF)</i>	10
2.1.8. <i>Concentración mínima inhibitoria (CMI)</i>	9
2.1.9. <i>Métodos para la determinación del CMI</i>	9
2.1.9.1. <i>Microdilución en caldo</i>	10

2.1.10.	<i>Replicas técnicas</i>	11
2.1.11.	<i>Replicas biológicas</i>	11
2.1.12.	<i>Medios de cultivo</i>	11
2.1.13.	<i>Agar TSA</i>	10
2.1.14.	<i>Caldo TSB</i>	12
2.1.15.	<i>Antibióticos</i>	12
2.1.15.1.	<i>Clasificación de antibióticos según su mecanismo de acción</i>	12
2.1.16.	<i>Amoxicilina</i>	11
2.1.17.	<i>Ciprofloxacina</i>	13
2.1.18.	<i>Tetraciclina</i>	13
2.1.19.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	12
2.1.19.1.	<i>Patogenicidad</i>	13
2.1.20.	<i>Factores de patogenicidad</i>	14
2.1.21.	<i>Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana</i>	14
2.1.22.	<i>Factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana</i>	14
2.1.22.1.	<i>Formación de biopelículas</i>	14
2.1.22.2.	<i>Sistemas de secreción de toxinas</i>	14
2.1.22.3.	<i>Pigmentos</i>	15
2.1.22.4.	<i>Quorum sensing</i>	15
2.1.23.	<i>Resistencia a los antibióticos</i>	14
2.1.23.1.	<i>Mecanismos de resistencia</i>	16
2.1.23.2.	<i>Inactivación del antibiótico</i>	16
2.1.23.3.	<i>Inactivación por hidrólisis</i>	16
2.1.23.4.	<i>Inactivación por transferencia de grupo</i>	17
2.1.23.5.	<i>Cambios en el sitio blanco</i>	17
2.1.23.6.	<i>Limitaciones de la entrada del antibiótico</i>	17
2.1.23.7.	<i>Bombas de expulsión</i>	17
2.1.24.	<i>Resistencia de Pseudomona aeruginosa a los antibióticos</i>	18
2.1.25.	<i>Mecanismos de resistencia de Pseudomona aeruginosa a la Amoxicilina</i>	17
2.1.26.	<i>Mecanismos de resistencia de Pseudomona aeruginosa a la Ciprofloxacina</i>	17

CAPITULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	18
3.1.	Descripción de los procesos, materiales, normas y enfoque	18
3.1.1.	Lugar de la investigación	18

3.1.2.	<i>Tipo de investigación</i>	18
3.1.3.	<i>Diseño de la investigación</i>	19
3.1.4.	<i>Alcance de la investigación</i>	19
3.1.5.	<i>Normas y enfoque de la investigación</i>	19
3.1.6.	<i>Métodos</i>	19
3.1.7.	<i>Técnicas e instrumentos de investigación</i>	19
3.1.8.	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	20
3.1.9.	<i>Equipos</i>	21
3.1.10.	<i>Reactivos</i>	22
3.1.11.	<i>Población de estudio</i>	23
3.1.12.	<i>Muestra de análisis</i>	23
3.1.13.	<i>Criterios de inclusión</i>	23
3.1.14.	<i>Criterios de exclusión</i>	23
3.2.	Descripción de los procesos	23
3.2.1	<i>Fases de estudio</i>	23
3.2.1.1	<i>Fase 1:</i>	23
3.2.1.2.	<i>Fase 2:</i>	25
3.2.1.3.	<i>Fase 3: Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana</i>	28
3.2.1.4.	<i>Fase 4: Análisis de los resultados</i>	29

CAPÍTULO IV

4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	32
4.1.	Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana	32
4.1.1.	<i>Análisis macroscópico, microscópico y pruebas bioquímicas</i>	32
4.1.2.	<i>Antibiograma</i>	32
4.2.	Determinación de la CMI individual de amoxicilina y ciprofloxacina	33
4.3.	Sinergismo <i>in vitro</i> de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina	35
4.3.1.	<i>Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF):</i>	36
4.4.	Discusión	37
	CONCLUSIONES	41
	RECOMENDACIONES	42
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3: Materiales utilizados en cada procedimiento.....	21
Tabla 2-3: Equipos utilizados en cada procedimiento.....	22
Tabla 3-3: Reactivos utilizados en cada procedimiento.....	23
Tabla 4-3: Flujograma de métodos y técnicas usados en cada fase de la investigación.....	31
Tabla 1-4: Análisis macro, microscópico y pruebas bioquímicas de <i>P. aeruginosa</i>	32
Tabla 2-4: Medición de halos de inhibición en comparación la CLSI 2020.....	32
Tabla 3-4: Representación de la CMI de Amoxicilina en microplacas de 96 pocillos.....	33
Tabla 4-4: Representación de la CMI de Ciprofloxacina en microplacas de 96 pocillos.....	34
Tabla 5-4: CMI de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina.....	35

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Mapa de la ESPOCH.....	8
Ilustración 2-2:	Mecanismos de resistencia a los antibióticos.....	16
Ilustración 1-3:	Mapa de la Escuela de Medicina de la ESPOCH.....	19
Ilustración 2-3:	Flujograma de la reactivación y confirmación de la identidad de la cepa....	25
Ilustración 3-3:	Flujograma preparación de pruebas bioquímicas.....	26
Ilustración 4-3:	Flujograma preparación del cultivo nocturno.....	28

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PREPARACIÓN CALDO SOJA TRIPTICASEÍNA (TSB)
- ANEXO B:** PREPARACIÓN TRIPTEÍNA SOYA AGAR (TSA)
- ANEXO C:** PREPARACIÓN AGAR MUELLER HINTON
- ANEXO D:** PREPARACIÓN BASE DE AGAR DE SANGRE (INFUSIÓN AGAR)
- ANEXO E:** PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN GRAM
- ANEXO F:** PRUEBA DE LA OXIDASA
- ANEXO G:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO H:** PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES
- ANEXO I:** DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS
- ANEXO J:** DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS PARA LA MICRODILUCIÓN
- ANEXO K:** ANÁLISIS MACROSCÓPICO
- ANEXO L:** TINCIÓN GRAM
- ANEXO M:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO N:** ANTIBIOGRAMA
- ANEXO O:** CMI DE AMOXICILINA
- ANEXO P:** CMI DE CIPROFLOXACINA
- ANEXO Q:** RESULTADOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS ANTIBIOTICOS

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *P. aeruginosa* multirresistente. Se realizó un estudio experimental de tipo *in vitro*, exploratorio, descriptivo y observacional en el que se analizó una cepa de *P. aeruginosa* multirresistente donada por el INSPI. Se trabajaron con 8 diluciones seriadas para cada antibiótico; para amoxicilina (2 µg/mL a 256 µg/mL) y para ciprofloxacina (0.50 µg/mL a 64 µg/mL) mediante el método de microdilución en caldo usando el ensayo tablero de ajedrez. Como resultados se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 64 µg/mL para amoxicilina y para ciprofloxacina la CMI fue de 16 µg/mL, mientras que la CMI de la combinación entre amoxicilina y ciprofloxacina fue de 16/4 µg/mL respectivamente. Además se calculó la concentración inhibitoria fraccionada (CIF) donde se obtuvo un valor de 0.062. Al ser el primer estudio *in vitro* en realizar esta combinación, se demostró que sí existe efecto sinérgico al combinar amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *P. aeruginosa* multirresistente. Se concluyó que, la creciente prevalencia de infecciones producidas por *Pseudomona aeruginosa* es una de las principales causas de la reducción de alternativas terapéuticas antimicrobianas por los múltiples mecanismos de resistencia y la combinación de antibióticos se ha convertido en una alternativa de gran relevancia para su tratamiento. Se recomienda realizar más repeticiones biológicas y técnicas de esta combinación con un número mayor de cepas de *Pseudomona aeruginosa* obtenidas directamente de cultivos de aquellos pacientes que presenten infecciones nosocomiales.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <MULTIRRESISTENTE>, <EFECTO SINÉRGICO>, <AMOXICILINA>, <CIPIROFLOXACINA>, <CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA>, <CONCENTRACIÓN INHIBITORIA FRACCIONADA>, <*Pseudomona aeruginosa*>.

1052-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the synergistic effect of the combination of amoxicillin and ciprofloxacin against a multidrug-resistant *P. aeruginosa* strain. An exploratory, descriptive, and observational *in vitro* experimental study was conducted in which a multidrug-resistant *P. aeruginosa* strain donated by INSPI was analyzed. It was worked with 8 serial dilutions for each antibiotic; for amoxicillin (2ug/mL to 256 ug/mL) and for ciprofloxacin (0.50 ug/mL to 64 ug/mL) by the microdilution in broth method using the chessboard assay. As a result, a minimum inhibitory concentration (MIC) of 65 ug/mL was obtained for amoxicillin, and for ciprofloxacin the MIC was 16 ug/mL, while the MIC of the combination between amoxicillin and ciprofloxacin was 16/4 ug/mL respectively. In addition, the fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated where a value of 0.062 was obtained. Being the first *in vitro* study to perform this combination, it was demonstrated that there is a synergistic effect when combining amoxicillin and ciprofloxacin against a multidrug-resistant *P. aeruginosa* strain. It was concluded that the increasing prevalence of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* is one of the main causes of the reduction of antimicrobial therapeutic alternatives by the multiple mechanisms of resistance and the combination of antibiotics has become an alternative of great relevance for its treatment. It is recommended to perform more biological and technical replications of this combination with a greater number of strains of *Pseudomonas aeruginosa* obtained directly from cultures of those patients who present nosocomial infections.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <MULTIDRUG-RESISTANT>, <SYNERGISTIC EFFECT>, <AMOXICILLIN>, <CIPROFLOXACIN>, <MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION>, <FRACTIONAL INHIBITORY CONCENTRATION>, <*Pseudomonas aeruginosa*>.

1052-DBRA-UPT-2023



Lic. Edison Renato Ruiz López MSc.

CI: 0603957044

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema prioritario de salud a nivel mundial, día a día están apareciendo y propagándose nuevos mecanismos de resistencia ocasionando que cada vez sea más difícil e incluso imposible tratar ciertas infecciones causadas por aquellas bacterias multirresistente, debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos (OMS, 2020 pág. 1). De acuerdo con el Ministerio de Salud Pública del Ecuador, clasifica a *Pseudomona aeruginosa* como un patógeno oportunista de mayor importancia y uno de los principales microorganismos sujetos a vigilancia debido a su alta relación con las infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) (MSP2021, p.3).

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo no fermentador capaz de sobrevivir a una amplia gama de entornos, este patógeno oportunista es causante de infecciones nosocomiales sobre todo en aquellos pacientes inmunodeprimidos lo cual condiciona un alto índice de morbilidad y mortalidad e incluso un incremento en los costos de atención de salud (Ajila 2021, p.9).

La característica principal de esta bacteria es su capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos mediante diversos mecanismos ya sean intrínsecos o adquiridos, por lo cual se convierte en un desafío establecer un esquema terapéutico efectivo (MSP2021, p.1). Para analizar esta problemática es necesario mencionar sus causas, una de ellas es la automedicación y el uso inadecuado de antibióticos.

Se entiende por automedicación a la administración sin prescripción médica por iniciativa y a riesgo de cada persona, de cualquier tipo de medicamento con la finalidad de tratar enfermedades o síntomas auto reconocidos (Oviedo et al. 2021, p.12). El uso inadecuado de antibióticos hace referencia a la administración de forma incorrecta tanto en dosis, pauta y duración del tratamiento con el antimicrobiano.

Por esta razón en esta investigación se pretende encontrar un tratamiento farmacológico alternativo para tratar infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa* multirresistente mediante la combinación de dos antibióticos de amplio espectro como la Amoxicilina y Ciprofloxacina, de esta manera ayudar a combatir las infecciones generadas por este tipo de bacteria. Se han investigado las interacciones sinérgicas entre antibióticos para mejorar los resultados terapéuticos, disminuir la toxicidad potencial de los agentes antimicrobianos y prevenir la aparición de resistencia bacteriana (Gómez et al. 2019, p.11).

La amoxicilina y ciprofloxacina son antibióticos pertenecientes a los betalactámicos y fluoroquinolonas respectivamente, representan a los antibióticos clásicos con mecanismos de acción conocidos, sin embargo, aún no se ha determinado si existe sinergia entre estas dos clases de antibióticos (Obando2020, p.3).

Por otra parte, la combinación de antibióticos ha sido una práctica común en el tratamiento empírico inicial de las infecciones. Estas se basan en tres fundamentos de su utilización; en primer lugar, permite el incremento de la actividad bactericida y de la rapidez de lisis bacteriana; la segunda es la prevención del desarrollo de resistencias bacterianas y el último es el aumento de la actividad antimicrobiana en pacientes inmunodeprimidos (Gómez et al. 2008, p.5).

Profundizar en este tema de investigación fue de interés académico debido a que este tipo de estudios son muy poco realizados en el Ecuador y la problemática de resistencia antimicrobiana va creciendo rápidamente a nivel mundial por lo que es necesario buscar nuevas alternativas que garanticen eficacia y seguridad en el uso de antibióticos.

En el ámbito profesional, como futura Bioquímica Farmacéutica, el interés se enfoca en aportar en la disminución de la resistencia bacteriana que ha desarrollado la *P. aeruginosa* y asimismo reducir la tasa morbilidad y mortalidad que esta bacteria ha generado en las últimas décadas por el uso y abuso de los antibióticos, mediante la combinación de dos antibióticos de amplio espectro.

La metodología empleada en este estudio de tipo experimental con enfoque cuali-cuantitativo, nivel exploratorio, descriptivo y observacional que se basa en la aplicación de la técnica de microdilución en caldo con el ensayo tablero de ajedrez en micro placas de 96 pocillos para determinar *in-vitro* las interacciones entre la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina, se realizaron diluciones a diferentes concentraciones de ambos antibióticos a los cuales se les agregó suspensión bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente para determinar así si existe efecto sinérgico entre esta combinación (Bellio et al. 2020, p.12).

El presente estudio busca determinar la concentración mínima inhibitoria de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina frente a una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* resistente, comparar la eficacia de la sinergia de los antibióticos combinados con la concentración de los antibióticos de forma individualizada, y comprobar la efectividad de la combinación entre Amoxicilina y Ciprofloxacina con un antibiótico de amplio espectro como la tetraciclina frente a *P. aeruginosa* multirresistente.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La resistencia a los antibióticos se ha convertido en uno de los más grandes problemas a tratar durante el siglo XXI. Se ha evidenciado un aumento de la resistencia bacteriana específica de diversos microorganismos, entre ellos *Pseudomona aeruginosa*, este crecimiento lleva a considerar a esta bacteria como una emergencia creciente y compleja de salud a nivel mundial (Sánchez 2021, p.12).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), *P. aeruginosa* es uno de los patógenos más importantes debido a la aparición de cepas multirresistente a antibióticos. Además, de ser uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales, también es causante de infecciones en pacientes no hospitalizados, consiguiendo estar implicada en infecciones muy graves (MSP2020, p.3).

P. aeruginosa constituye un riesgo principal para pacientes inmunodeprimidos, en especial en pacientes con fibrosis quística. Así mismo se le atribuye un 35% de mortalidad en bacteriemia y 69% en neumonía asociada a ventilador. Largos períodos de presión selectiva asociados con largos períodos de tratamiento con antibióticos o efectores del sistema inmune, han contribuido al desarrollo de resistencia adaptativa y adquirida propio de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con fibrosis quística (Cantón 2015, p.6).

Este patógeno constituye cerca del 5% de las complicaciones clínicas en pacientes con enfermedad EPOC elevando su índice de mortalidad. En lo relacionado a morbilidad, las patologías hospitalarias más comunes son neumonía asociada a ventilación, bacteriemia asociada a catéter, infección del sitio operatorio, osteomielitis, shock séptico e infecciones de vías urinarias por catéter todos ellos tienen en común la relación en el uso de dispositivos médicos (Ross et al. 2020, p.12).

Para su tratamiento se ha intentado diferentes formas de antibioticoterapia, como monoterapia o la combinación de diferentes antibióticos usados para tratar este tipo de bacteria, sin embargo, se ha evidenciado un riesgo de fallo terapéutico debido a la capacidad que tiene *P. aeruginosa* de desarrollar varios mecanismos de resistencia a antibióticos, representando un desafío terapéutico (Sánchez et al. 2021, p.15).

Este patógeno ha generado resistencia a los antibióticos de amplio espectro como los β -lactámicos, quinolonas y ciertos aminoglucósidos. Adicionalmente el uso excesivo de antibióticos ha conllevado a la aparición de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes a antibióticos como los carbapenémicos. En consecuencia, es indispensable el desarrollo de nuevos fármacos o alternativas para su tratamiento (Pachay et al. 2021, p.7).

Es importante la búsqueda de alternativas para tratar este tipo de bacterias patógenas ya que de acuerdo con los datos establecidos por la (OMS), se proyecta que en el 2050 se evidenciará una mayor resistencia bacteriana a la mayoría de los antibióticos lo que ocasionaría por lo menos la muerte de diez millones de personas al año en el mundo (Medina et al. 2015, p.22).

1.2. Justificación

Si bien el inicio de la era antibiótica supuso una revolución en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, la capacidad que las bacterias están presentando para sobrevivir a su acción, es una amenaza creciente que deteriora la eficacia de estos fármacos, siendo el uso excesivo e irresponsable, lo que ha contribuido al surgimiento de bacterias resistentes, entre ellas *Pseudomona aeruginosa* (Sánchez et al. 2021, p.15).

El tratamiento con antibióticos se vio comprometido en pacientes hospitalizados durante la pandemia por el COVID-19 debido al consumo de antibióticos como tratamiento profiláctico para infecciones bacterianas secundarias, lo que ha conllevado al aumento de resistencia bacteriana a un amplio número de antibióticos de primera línea por parte de cepas multirresistentes (Aguilera 2020, p.9).

P. aeruginosa es un bacilo Gram negativo, considerado un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de enfermedades infecciosas, particularmente en pacientes inmunocomprometidos. Siendo motivo de preocupación al asociarse las infecciones causadas por esta bacteria con altas tasas de mortalidad y morbilidad, estadías prologadas y altos costos en la atención sanitaria (Sánchez et al. 2021, p.8).

En el 2021 la OMS catalogó a la *P. aeruginosa* dentro de la lista “problemas sanitarios urgentes de dimensión mundial” como patógeno de prioridad crítica por representar una amenaza debido a su capacidad de resistir a los tratamientos con antibióticos del grupo de los carbapenémicos. La tasa de mortalidad de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* se encuentra de un 18 al 61%, representando un elevado índice de muertes a nivel mundial (OMS 2021, p.2).

En el Ecuador de acuerdo con el reporte estadístico del Instituto Nacional de Investigación en

Salud Pública en el período 2014-2018, *P. aeruginosa* presentó un porcentaje de resistencia hasta del 30% para antibióticos carbapenémicos como el imipenem y meropenem, antibióticos considerados como última elección en el tratamiento contra *P. aeruginosa*, pero a los cuales se están presentando de forma alarmante niveles de resistencia (OMS 2021, p.2).

Un estudio realizado en el hospital de segundo nivel de Portoviejo, se evidenció una resistencia acumulada a los antibióticos cefepime 46,18%; ceftazidima 52,77%; piperacilina + tazobactam 34,77%; amikacina 28,64%; gentamicina 12,89%; ciprofloxacina 39,55%; imipenem 34,76%; meropenem 35,29%. La resistencia a los carbapenémicos fue de un 35% y las cepas productoras de carbapenemasas correspondieron a un 6,93% (Pachay et al. 2021, p.14).

P. aeruginosa posee varios mecanismos de resistencia, tanto intrínsecos como adquiridos, que actúan independientemente o en conjunto, y resultan en la expresión de resistencia frente a varias familias de antibacterianos como β -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas y carbapenémicos. Es por ello, por lo que es importante utilizar otras alternativas para tratar las infecciones causadas por este patógeno como es la combinación de dos antibióticos con diferentes mecanismos de acción ya comprobados (Bravo 2018, p.12).

Usualmente el tratamiento combinado incluye un β -lactámicos (penicilina, cefalosporina o carbapenémico) asociado a un segundo agente anti-pseudomonas como es un aminoglucósido o fluoroquinolona (preferentemente ciprofloxacina), teniendo como fundamento la terapia combinada, el reducir las posibilidades de selección de mutantes, así como aprovechar la actividad sinérgica entre ambos agentes (Sánchez et al. 2021, p.16).

La combinación de amoxicilina y ciprofloxacina permite actuar contra la bacteria por sus diferentes estructuras. La amoxicilina, es un antibiótico de amplio espectro, el cual actúa inhibiendo la síntesis de pared celular, mientras que la ciprofloxacina es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de ADN bacteriano lo cual en combinación y a diferentes concentraciones podrían llegar a causar la muerte de la bacteria; obteniendo así un tratamiento efectivo y con menos reacciones adversas para el paciente (Bravo 2018, p.12).

El interés por investigar sobre el tema se centra en aportar con un estudio sobre la búsqueda de una alternativa terapéutica para el tratamiento antibiótico frente a *P. aeruginosa* resistente a antibióticos de primera línea usados para tratar este patógeno oportunista, aplicando un método nuevo y simplificado para estudios de combinación de fármacos mediante el ensayo de tablero de ajedrez (Bellio 2021, p.17).

Es viable la realización del presente trabajo de investigación ya que la técnica es relativamente sencilla, además no requiere equipos sofisticados y de alta tecnología, se lo puede realizar en el laboratorio con materiales de fácil adquisición; los resultados se obtienen en un período corto, al igual que al tiempo de generación de *P. aeruginosa* es corta y esta puede crecer en medios de cultivo comunes como Agar Tripton- Soja (TSA) y Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) (Polanco 2008, p.19).

Este trabajo va dirigido a la población con mayor vulnerabilidad como los pacientes inmunodeprimidos los cuales han adquirido infecciones por *P. aeruginosa*, entre este tipo de pacientes se encuentran: adultos mayores, pacientes con VIH-SIDA consumidores de drogas intravenosas, población pediátrica, pacientes hospitalizados y no hospitalizados, entre otros. Con el objetivo de contribuir con una alternativa terapéutica eficiente y con menores reacciones adversas, que ayuden a contrarrestar a este patógeno mejorando la calidad de vida del paciente.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.
- Comparar la eficacia de la sinergia de los antibióticos combinados con la concentración de los antibióticos de forma individualizada.
- Comprobar la efectividad de la combinación entre amoxicilina y ciprofloxacina con un antibiótico de amplio espectro como la tetraciclina frente a *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Referencias teóricas

2.1.1. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*



Ilustración 1-2: Mapa de la ESPOCH

Fuente: Google Maps, 2023.

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) es una institución pública de educación superior, tiene su origen en el Instituto Tecnológico Superior de Chimborazo creada el 18 de abril de 1969, su campus se encuentra en la ciudad de Riobamba provincia de Chimborazo, cuenta con una sede en la ciudad de Macas provincia de Morona Santiago; además cuenta con 4 estaciones experimentales.

2.1.2. *Efecto sinérgico*

Se define como la potenciación del efecto inhibitor o bactericida generada al combinar dos o más antibióticos, haciendo que la actividad conjunta sea mayor que la actividad de forma individual (Jiménez 2018, p.9).

2.1.2.1. *Tipos de mecanismos de sinergismo en antibióticos*

- Bloqueo de una vía metabólica de la bacteria por dos o más antibióticos.
- Aumento de la captación del antibiótico a través de la pared celular.
- Prevención de la inactivación del antibiótico por acción de enzimas propias de la bacteria (Cordiés 2022, p.3).

2.1.3. Combinación de antibióticos

Es el uso de dos o más antibióticos de forma conjunta con la finalidad de obtener un efecto más eficaz y seguro frente a una bacteria que haya presentado resistencia o su sensibilidad se haya visto disminuida por su uso inadecuado (Buldain 2019, p.14).

2.1.3.1. Ventajas de la combinación de antibióticos

- Tratamiento de infecciones graves ocasionadas por múltiples bacterias.
- Mayor cobertura antibiótica en infecciones de origen desconocido.
- Disminuye la toxicidad de uno de los antibióticos de la combinación.
- Aumento de la actividad inhibitoria o bactericida sobre un determinado microorganismo

(Agregado 2020, p.23).

2.1.3.2. Desventajas de la combinación de antibióticos

- Antagonismos entre los antibióticos combinados.
- Aumento de riesgo de reacciones adversas.
- Aumento del costo total del tratamiento (Flores 2016, p.16).

2.1.4. Actividad combinada de antibióticos

La combinación de antibióticos en los últimos años se ha convertido en una alternativa para tratar infecciones graves que pueden llegar a ocasionar septicemia o cuando una bacteria ha desarrollado resistencia pero muestra sensibilidad al combinarla con otro, cabe mencionar que la administración de dos o más antimicrobianos puede ocasionar efectos adversos, por lo que es necesario realizar estudios previos a su uso (Ramírez 2020, p.10).

2.1.5. Interacciones entre antibióticos

La combinación de antibióticos puede ocasionar diferentes efectos: indiferencia, cuando la actividad en combinación no afecta a la actividad de forma individual de cada antibiótico. Adición, si la actividad de la combinación es igual a la actividad generada de cada antibiótico por separado; Sinergismo, cuando la actividad de la combinación es mayor que la actividad de forma individual y el efecto Antagónico, cuando la actividad de la combinación es menor que la suma de las actividades de los antibióticos por separado (Picazo 2010, p.12).

2.1.6. Ensayo tablero de ajedrez

Es una de las pruebas más usadas para determinar la actividad *in vitro* de la combinación de antibióticos usando microplacas de titulación de 96 pocillos que forman un tablero como el ajedrez proporcionando una buena evaluación. Existen múltiples diluciones de antibióticos en concentraciones altas y bajas a la CMI de cada antibiótico que actúa frente una bacteria. En el eje X se encuentra las concentraciones del antibiótico A y en el eje Y las concentraciones del antibiótico B y en la primera fila se encuentra el control (Bellio 2021, p.16).

2.1.7. Índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF)

La asociación de antibióticos permite calcular el CIF usando la siguiente fórmula.

$$\frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b} = CIFa + CIFb = \text{Índice CIF}$$

En donde (A) es la CMI del antibiótico A en combinación con el antibiótico B y (CMI) a, es la CMI individual del antibiótico A. Así mismo con el otro antibiótico, (B) es la CMI en combinación con el antibiótico A y (CMI) b, es la CMI del antibiótico B (Picazo 2010, p.11). La sumatoria de los resultados es el índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada, cuando es menor a 0,5 la combinación tiene efecto sinérgico, igual a uno es aditiva, menor o igual a 4 tiene un efecto indiferente y cuando el índice CIF es mayor a 4 la combinación tiene un efecto antagónico (Canut 2020, p.9).

2.1.8. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la concentración más baja de uno o varios antibióticos capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, esta expresada en µg/mL y ayuda a determinar el o la combinación de antibióticos es más efectivo, lo que ayuda a elegir el mejor tratamiento que aumente las probabilidades de éxito para tratar procesos infecciosos (Bellio 2021, p.18).

2.1.9. Métodos para la determinación del CMI

2.1.9.1. Microdilución en caldo

Existen varios métodos para determinar la CMI, sin embargo la microdilución en caldo es uno de los más usados, se emplea microplacas de titulación de 96 pocillos en las cuales se depositan

volúmenes pequeños de 100 a 200 microlitros de las concentraciones determinadas de los antibióticos, permite experimentar hasta 12 antibióticos en un rango de 8 diluciones duplicadas en una sola microplaca. En cuanto a las ventajas principales de este método es que es económica en tiempo, reactivos y espacio así mismo se puede determinar la CMI de forma visual mediante observación directa del crecimiento microbiano por presencia de turbidez en los pocillos y también se lo puede determinar mediante la lectura de las absorbancias de cada micro pocillo (Ajila 2021, p.17).

2.1.10. Replicas técnicas

Es el número de repeticiones de un experimento específico realizado con las mismas condiciones y en el mismo momento con la finalidad de obtener resultados que permitan identificar el margen de error de la técnica de investigación (López 2021, p.34).

2.1.11. Replicas biológicas

Son las repeticiones de un experimento con la finalidad de comprobar si se obtienen los mismos resultados y cuál es el porcentaje de error de la técnica usada, se la realiza en un tiempo diferente pero con las mismas condiciones del experimento (López 2021, p.36).

2.1.12. Medios de cultivo

Son aquellos que permiten el crecimiento y multiplicación de diversos microorganismos de acuerdo con la necesidad de micronutrientes y factores de crecimiento, existe una diversidad de medios de cultivo creados específicamente a de acuerdo con la necesidad de la bacteria que se desee cultivar, con la finalidad de aislar especies bacterianas, identificarlos y realizar estudios. Se clasifican en medios de cultivo líquidos que son los caldos y medios sólidos como los agares (Soto 2019, p.2).

2.1.13. Agar TSA

El Agar Tripicasa- Soja es un medio de cultivo sólido general usado para el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias. Es empleado para el mantenimiento y conservación de cultivos puros y aislamiento de cepas clínicas. Está compuesto por hidrolizado enzimático de caseína, Peptona de soja, Cloruro de sodio, Agar y presenta un pH de 7.3 +/- 0.2 (Rodríguez et al. 2018, p.68).

2.1.14. Caldo TSB

Caldo Tripicasa-soja, medio líquido de uso general usado para pruebas de esterilidad y cultivo de microorganismos aerobios no exigentes y anaerobios facultativos. Está compuesto por digerido pancreático de caseína, digerido péptico de harina de soja, dextrosa, cloruro de sodio y fosfato dipotásico de hidrogeno, tiene un pH de 7.3 +/- 0.2 (Rodríguez et al. 2018, p.68).

2.1.15. Antibióticos

Son sustancias químicas producidas de forma natural por microorganismos o sintetizados en un laboratorio, poseen efectos bacteriostáticos y bactericidas que ayudan a la prevención, control y eliminación de los agentes patógenos sensibles causantes de infecciones bacterianas, ejerciendo una acción específica sobre alguna función o estructura de un microorganismo (Cushquicullma 2021, p.17).

En la actualidad existe gran diversidad de antibióticos que se diferencian por sus propiedades fisicoquímicas, farmacológicas, mecanismo de acción y espectro bacteriano (Moyón 2020, p.6).

2.1.15.1. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción

- Inhibidores de la formación de la pared bacteriana
- Inhibidores de la síntesis proteica
- Inhibidores de la duplicación del ADN
- Inhibidores de la membrana citoplasmática
- Inhibidores de vías metabólicas

2.1.16. Amoxicilina

Es un antibiótico betalactámico de amplio espectro, con amplia actividad sobre las bacterias Gram positivas y poca actividad sobre las Gram negativas por la producción de enzimas que degradan y dificultan su acción bactericida (Obando et al. 2015, p.12).

Mecanismo de acción: Inhibe la síntesis de la pared bacteriana, interfiriendo en la síntesis del peptidoglicano obstruyendo la última etapa de transpeptidación generando la activación de la enzima auto lisina endógena lo que provoca muerte celular de la bacteria (Obando et al. 2015, p.12).

2.1.17. *Ciprofloxacina*

Es un antibiótico bactericida perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas por poseer un átomo de flúor en su estructura química, posee amplio espectro bacteriano y mayor actividad frente a *Pseudomona aeruginosa* (Barboza 2017, p.43).

Mecanismo de acción: Inhibe selectivamente la ADN-girasa bacteriana, permitiendo que no se de forma adecuada el plegamiento del material genético de la bacteria causando su muerte (Gómez et al. 2015, p.8).

2.1.18. *Tetraciclina*

Es un antibiótico bacteriostático de amplio espectro perteneciente al grupo de las tetraciclinas. El uso habitual tanto en personas como animales ha favorecido a la aparición de resistencias. La aparición de antibióticos con menor riesgo de efectos secundarios hizo que se deje de usar este grupo de antimicrobianos (Pérez 2010, p.3).

Mecanismo de acción: Inhiben la síntesis de proteínas de las bacterias susceptibles uniéndose a la subunidad 30 S del ribosoma ocasionando que no se dé la interacción con el ARNt lo que impide la replicación celular (Mendoza 2016, p.1).

2.1.19. *Pseudomona aeruginosa*

Es una bacteria oportunista gramnegativa, aerobia facultativa capaz de sobrevivir con los requerimientos mínimos nutricionales posee un flagelo que le confiere motilidad, tiene forma bacilar y mide aproximadamente 1,5 a 5 micras de largo y 0,5 a 1 micra de diámetro. Se caracteriza por la producción de pigmentos como pioverdina y plocianina (Calderon et al. 2019, p.15).

2.1.19.1. *Patogenicidad*

En el caso de *P. aeruginosa*, su versatilidad metabólica, resistencia a antibióticos intrínsecos y adquiridos, formación de biofilm y producción de factores de virulencia múltiple, hacen que sea un patógeno causante de infecciones graves sobre todo en pacientes inmunodeprimidos. Esta bacteria presenta un gran grupo determinado de cepas unas más virulentas que otras y otras más resistentes y oportunistas que otras. Siendo la cepa PAO1 la más virulenta al asociarse a pacientes con fibrosis quística (Soberón 2015, p.12).

2.1.20. Factores de patogenicidad

P. aeruginosa tiene capacidad de causar un amplio número de infecciones debido a sus factores de Patogenicidad que pueden estar asociados a la célula bacteriana o pueden ser secretados por la bacteria (Paz 2019, p.6).

2.1.21. Factores de patogenicidad asociados a la célula bacteriana

Se encuentra principalmente el flagelo polar que le da movilidad, esta contiene una proteína FliD que le permite adherirse a las membranas de las vías respiratorias, además posee un pili tipo IV que contiene proteínas PilA, PilB, PilT y PilU las dos primeras le ayudan a obtener energía y otras dos le permiten adherirse, ocasionar daño celular y diseminarse dentro del huésped (Bravo 2018, p.11).

2.1.22. Factores de patogenicidad secretados por la célula bacteriana

2.1.22.1. Formación de biopelículas

P. aeruginosa es capaz de formar dos tipos generales de biopelícula que puede ser plana estructurada. Esta bacteria es capaz de producir una cápsula extracelular de alginato que forma parte de la biopelícula como un mecanismo de evasión frente a los anticuerpos impidiendo la fagocitosis por parte de las células inmunológicas (Ochoa 2013, p.3).

Una característica importante de las biopelículas es que su matriz está compuesta por los polisacáridos Pel, Psl y alginato; así como ADN extracelular (eADN), diversas proteínas como las fimbrias y proteínas de membrana LecA y LecB. La formación de biopelículas da lugar a infecciones graves con mayor resistencia debido a la selección y competición generada entre las bacterias resistentes de microambiente específico (Paz 2019, p.6).

2.1.22.2. Sistemas de secreción de toxinas

P. aeruginosa posee cinco sistemas de secreción de toxinas, el tipo III (SST3) es el principal mecanismo de patogenicidad ya que por medio de esta secreta toxinas importantes como Exo A, Exo T, Exo S, Exo U y Exo Y que son las responsables de inducir a la apoptosis (Pachay, y otros, 2021 pág. 2). El sistema de secreción tipo II (SST2) está compuesto de secreciones de las elastasas, estas facilitan la diseminación de las infecciones mediante la destrucción de barreras físicas e inhibiendo la quimiotaxis de los monocitos, impidiendo la eliminación del

microorganismo por fagocitosis y presentación de antígeno (Gómez et al. 2016, p.16).

El sistema de secreción tipo V (SST5) presenta un sin número de factores que producen lisis de las células del huésped, además tienen un papel importante en la formación de biopelículas y adherencia celular (Paz 2019, p.6).

2.1.22.3. Pigmentos

Algunas especies del género *Pseudomonas* se caracterizan por su capacidad de producir pigmentos, sobre todo *P. aeruginosa* (Bravo 2018, p.8). Los pigmentos más característicos que pueden sintetizar esta bacteria son los siguientes:

Piocianina: pigmento de coloración azul que causa disfunción ciliar en el tracto respiratorio, provocando efectos pro-inflamatorios y oxidativos que daña a las células del hospedero (Ferrer 2020, p.10).

Pioverdina: Es un pigmento de color verde esencial por tener un componente patogénico que le ayuda a la bacteria a aprovechar nutrientes del huésped para su crecimiento (Valderrama 2016, p.14).

Piorrubina: Este pigmento proporciona a la bacteria una tonalidad entre rojo y marrón. Tiene un papel importante en la protección de *Pseudomonas* al estrés oxidativo (Sánchez 2021, p.7).

2.1.22.4. Quorum sensing

Es otro de los factores de virulencia por parte de esta bacteria, se define como un mecanismo que se basa en la comunicación interna de la célula bacteriana permitiendo la adaptación de una población de bacterias a los cambios micro ambientales. Esta red regulatoria puede llegar a controlar de forma directa o indirecta la expresión de diversos genes. La adaptación esta mediada por pequeñas moléculas llamadas autoinductores o acilhomoserina lactones (AHL) que difunden a través de las membranas de la bacteria (Ochoa et al. 2013, p.1).

2.1.23. Resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial; esto es debido a que genera un aumento de la morbi-mortalidad por enfermedades infecciosas no controladas, es originada por la pérdida de la eficacia terapéutica de los antibióticos aumentando los costos en la atención de salud.

Que un microorganismo desarrolle resistencia es inevitable, es un proceso natural y parte de su evolución. Sin embargo, el uso inadecuado, la automedicación y uso excesivo de antibióticos han contribuido al incremento de la resistencia bacteriana (OMS 2020, p.1).

2.1.23.1. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos puede estar mediada por diferentes mecanismos, los cuales una sola cepa bacteriana puede presentar varios de ellos, resultando en la generación de bacterias multirresistentes (Cantón et al. 2015, p.17).

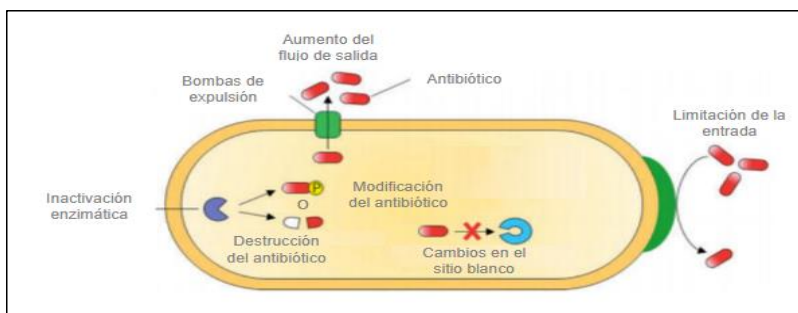


Ilustración 2-2: Mecanismos de resistencia a los antibióticos

Fuente: (Alav, y otros, 2018).

2.1.23.2. Inactivación del antibiótico

Involucra la producción de enzimas que son capaces de destruir al antibiótico mediante hidrólisis o modificación de su estructura química a través de la transferencia de grupos, impidiendo que el antibiótico cumpla su efecto farmacológico esta inactivación se puede dar por dos mecanismos (Gómez et al. 2015, p.6):

2.1.23.3. Inactivación por hidrólisis

Este grupo está representado por las enzimas β -lactamasas por su capacidad hidrolítica, que dan resistencia a antibióticos de la familia de β -lactámicos como las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, mediante la hidrólisis del enlace amida del anillo β -lactámico (Bravo 2018, p.13).

2.1.23.4. Inactivación por transferencia de grupo

Se da por las enzimas modificadoras de aminoglucósido, las cuales tienen la capacidad para acetilar de forma específica grupos amino o hidroxilo ubicados alrededor del antibiótico lo que ocasiona la disminución de afinidad hacia su objetivo y con ello la pérdida de su potencial antibacteriano (Sánchez et al. 2021, p.20).

2.1.23.5. Cambios en el sitio blanco

Las bacterias al estar expuestas a los antibióticos han desarrollado diferentes estrategias para generar resistencia, entre ellas tenemos:

Protección del sitio blanco: Implica la unión de una proteína de resistencia o proteína de protección con el blanco del antibiótico, evitando que se cumpla la acción farmacológica (Calderón. 2019, p.7).

Modificación del sitio blanco: Entre estas se encuentran las mutaciones puntuales en los genes que codifican para el sitio objetivo del antibiótico, impidiendo el funcionamiento del antimicrobiano (Sánchez et al. 2021, p.20).

2.1.23.6. Limitación de la entrada del antibiótico

Es ocasionada por los cambios en la permeabilidad debido a las alteraciones en las proteínas porinas de la membrana externa de la bacteria, puede ocurrir por la disminución en el número de porinas o por alteraciones que ocasiona pérdida o cambios en su función, como consecuencia se desarrolla una resistencia a antibióticos (Munita 2016, p.5).

2.1.23.7. Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión son proteínas que poseen algunas bacterias las cuales cumplen la función expulsar el antibiótico del interior de la célula bacteriana de una forma rápida, haciendo que la concentración en el interior de la bacteria no sea suficiente para cumplir con el efecto antibacteriano (Tarco 2016, p.12).

Existen cinco importantes familias de bombas de expulsión que de acuerdo con su especificidad y mecanismo, son capaces de expulsar uno o varios antibióticos que no estén relacionados estructuralmente, lo que contribuye en la multiresistencia a los antibióticos (Alav et al. 2018, p.10).

2.1.24. Resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a los antibióticos

P. aeruginosa presenta un alto nivel de resistencia intrínseca a muchos antibióticos, principalmente se debe a las bombas de expulsión y a las enzimas que inactivan la actividad del antibiótico. También presenta resistencia extrínseca debido a su capacidad de desarrollar nuevos mecanismos para inactivar antibióticos, lo que dificulta el tratamiento de infecciones ocasionadas por esta bacteria (Gómez et al. 2015, p.7).

2.1.25. Mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a la amoxicilina

Esta bacteria puede generar resistencia a la Amoxicilina, las cuales pueden ser intrínsecos o pueden ser adquiridos por mutaciones o por tener genes de resistencia. Existen tres mecanismos, la principal es por ser productoras de enzimas β -lactamasas que inactivan a los antibióticos β -lactámicos, también es resistente por la disminución de la permeabilidad de la membrana de la bacteria impidiendo que esta cumpla su efecto y el último mecanismo se da por las bombas de expulsión que actúan disminuyendo la concentración del antibiótico al expulsar al antibiótico desde el centro al exterior de la célula bacteriana (Sánchez et al. 2021, p.27).

2.1.26. Mecanismos de resistencia de *Pseudomona aeruginosa* a la ciprofloxacina

La ciprofloxacina es una quinolona que actúa inhibiendo la síntesis de ADN, por ello *P. aeruginosa* tiene como su principal mecanismo de resistencia adquirida a las mutaciones del sitio blanco que disminuyen la afinidad de la enzima por el antibiótico, otro mecanismo son las bombas de expulsión, estas son MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN y MexXY-OprM, encargadas de expulsar los antibióticos al exterior de la célula bacteriana impidiendo su efecto farmacológico. Otro mecanismo involucrado en la resistencia a la ciprofloxacina son las enzimas modificadoras de aminoglucósidos ya que se ha evidenciado que también está involucrado en el desarrollo de resistencia para las quinolonas y como último mecanismo se encuentra la protección del sitio blanco (Ajila et al. 2021, p.24).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Descripción de los procesos, materiales, normas y enfoque, alcance, diseño

3.1.1. Lugar de la investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de análisis bioquímico y bacteriológico de la Facultad de Ciencias y el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Escuela de Medicina de la Escuela Superior politécnica de Chimborazo.



Ilustración 1-3: Mapa de la Escuela de Medicina de la ESPOCH

Fuente: Google Maps, 2023.

3.1.2. Tipo de investigación

Es un estudio experimental, exploratorio, descriptivo y observacional. Experimental ya que se trató de una investigación *in vitro* del efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *Pseudomona aeruginosa* multiresistente, es exploratoria porque este tipo de investigación es poco estudiada y esta combinación no se ha hecho antes. Así mismo es descriptiva y observacional porque se describe los resultados de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a las diferentes concentraciones mediante observación directa de las microplacas.

3.1.3. Diseño de la investigación

Es un estudio Cualitativo-Cuantitativo ya que el análisis de resultados se realizó mediante el análisis

de datos y la observación directa del crecimiento o no de la bacteria en cada pocillo a diferentes concentraciones de los antibióticos de forma individualizada y en combinación que permitieron definir la concentración mínima inhibitoria (CMI).

3.1.4. Alcance de la investigación

Es de tipo exploratorio, descriptivo y correlacional; ya que este tipo de estudios son poco comunes. Se describió y correlacionó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos de estudio de forma individualizada y en combinación. Asimismo, se comprobó la efectividad de la combinación amoxicilina/ciprofloxacina con un antibiótico de amplio espectro (tetraciclina) que fue usada como control a altas dosis.

3.1.5. Normas y enfoque de la investigación

El método usado en la investigación sigue las indicaciones de la Norma Española UNEN-EN ISO 20776-1, que explica el método de microdilución en caldo para ensayar la actividad *in vitro* de agentes antimicrobianos frente a bacterias de crecimiento rápido implicadas en enfermedades infecciosas (UNE 2021, p.23).

El enfoque es mixto ya que los resultados de la investigación se recopilaron, analizaron e integraron tanto de forma cualitativa como cuantitativa.

3.1.6. Métodos

Se realizó mediante el método de sinergia de microdilución en caldo con el ensayo de tablero de ajedrez en microplacas de 96 pocillos que permite cuantificar las interacciones sinérgicas relativas entre la amoxicilina y ciprofloxacina.

3.1.7. Técnicas e instrumentos de investigación

Se aplicó la técnica basada en la cuantificación *in vitro* del crecimiento bacteriano expuesto a diferentes concentraciones de las diluciones de antibióticos que permiten determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

El instrumento usado fue microdilución en caldo según la guía M07-ED 11 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2029, p.3).

3.1.8. Materiales, equipos y reactivos

3.1.8.1. Materiales

Tabla 1-3: Materiales utilizados en cada procedimiento

PROCEDIMIENTO	MATERIAL	CANTIDAD
Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana	Papel aluminio	1
	Gasa	1
	Hisopos estériles	10
	Reverbero	1
	Algodón	1
	Erlenmeyer 125 mL	2
	Tubos de ensayo	2
	Gradilla	1
	Mecheros	2
	Cajas Petri	2
	Probeta 50mL	1
	Espátula	1
	Asa bacteriológica	1
	Pinza metálica	1
Cinta adhesiva	1	
Porta y cubre objetos	2	
Preparación de la solución madre de antibióticos y dilución a diferentes concentraciones	Tubos falcon 15 mL	50
	Balón de aforo 10 mL y 50mL	10
	Erlenmeyer 250 mL	3
	Probeta 1000 mL	1
	Papel aluminio	1
	Embudo de vidrio	3
	Puntas de micropipetas de 1000 µL	200
Puntas de micropipetas de 10 µL	200	
Preparación del cultivo nocturno y medición de la densidad óptica	Tubos de ensayo 15 mL	2
	Gradilla	1
	Algodón	1
	Papel aluminio	1
	Gasa	1
	Probeta de 100mL	1

	Erlenmeyer 125 mL	1
	Tubos falcon 15 mL	2
	Espátula	1
	Asa bacteriológica	1
	Cubetas para espectrofotómetro	4
Determinación de la CMI de las diluciones de antibióticos individual y combinada	Microplacas de 96 pocillos	30
	Puntas de micropipetas 100 µL	1000
	Cajas Petri	30
	Mechero	1
	Hielo	1
	Toallas de papel	1
	Fósforos	1

Fuente: CLSI, 2020

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

3.1.9. Equipos

Tabla 2-3: Equipos utilizados en cada procedimiento

PROCEDIMIENTO	EQUIPO	FUNCIÓN
Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana	Balanza	Medir la masa del caldo TSB y Agar Müller Hinton.
	Cámara de flujo laminar	Mantener el ambiente de trabajo libre de contaminación por partículas.
	Autoclave	Esterilización con vapor de agua.
	Incubadora	Mantener una humedad y temperatura adecuadas para el cultivo microbiológico.
Preparación de la solución madre de antibióticos y dilución a diferentes concentraciones	Autoclave	Esterilización con vapor de agua.
	Refrigeradora	Conservar las muestras a temperatura de 2- 6 °C.
Preparación del cultivo nocturno y medición de la densidad óptica	Balanza	Medir la masa del caldo TSB.
	Incubadora	Mantener una humedad y temperatura adecuadas para el cultivo de la bacteria.
	Autoclave	Esterilización con vapor de agua.
	Espectrofotómetro	Medir la densidad óptica del cultivo bacteriano.
Determinación de la CMI de las diluciones de	Micropipeta automática multicanal 5-50 µL	Absorber y transferir pequeños volúmenes.

antibióticos individual y combinada	Incubadora	Mantener una humedad y temperatura adecuadas para el cultivo de la bacteria.
--	------------	--

Fuente: Ramírez et al. 2020.

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

3.1.10. Reactivos

Tabla 3-3: Reactivos utilizados en cada procedimiento

PROCEDIMIENTO	REACTIVOS	DESCRIPCIÓN
Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana	Agua destilada	Solvente para medios de cultivo.
	Agar Mueller Hinton	Medio de cultivo sólido para antibiogramas.
	Blood Agar Base	Medio de cultivo sólido altamente nutritivo.
	Agar Simmons Citrato	Medio utilizado para diferenciar enterobacterias.
	Discos de antibióticos	Permite identificar si la bacteria es resistente o sensible mediante la medición de halos de inhibición.
Preparación de la solución madre de antibióticos y diluciones a diferentes concentraciones	Agua destilada	Solvente para los antibióticos.
	Caldo Soja Trypticaseína (TSB)	Medio de cultivo líquido nutritivo para uso general.
	Ácido clorhídrico 0,01 N	Solvente inorgánico de principios activos.
Preparación del cultivo nocturno y medición de la densidad óptica	Agar Tripton- Soja (TSA)	Medio de cultivo nutritivo sólido para uso general.
	Caldo Soja Trypticaseína (TSB)	Medio de cultivo líquido nutritivo para uso general.
Determinación de la CMI de las diluciones de antibióticos individual y combinada	Disolución de amoxicilina	Antibiótico betalactámico de amplio espectro con efecto bactericida.
	Disolución de ciprofloxacina	Antibiótico bactericida perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas.
	Disolución de tetraciclina	Antibiótico bacteriostático usado a altas concentraciones.

Fuente: Rodríguez et al. 2018.

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

3.1.11. Población de estudio

Son las diluciones a diferentes concentraciones de Amoxicilina y Ciprofloxacina que fueron usadas de forma individual y combinada.

3.1.12. Muestra de análisis

El muestreo de tipo no probabilístico por conveniencia se basó en la selección directa de la Cepa de *P. aeruginosa* con multirresistencia comprobada.

3.1.13. Criterios de inclusión

Cepa de *P. aeruginosa* resistente a varios antibióticos incluido amoxicilina y ciprofloxacina.

3.1.14. Criterios de exclusión

Cepa de *P. aeruginosa* que no presente resistencia a varios antibióticos incluidos amoxicilina y ciprofloxacina.

3.2. Descripción de los procesos

3.2.1. Fases de estudio

La investigación se realizó en cuatro fases, las mismas que se detallan a continuación:

3.2.1.1. Fase 1

- *Obtención de la cepa bacteriana*

La cepa de estudio fue adquirida mediante donación por parte del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSP).

- *Obtención de los principios activos de amoxicilina, ciprofloxacina y tetraciclina*

Los principios activos de los antibióticos que formaron parte de este estudio fueron adquiridos del Laboratorio Farmacéutico Labovida S.A de la ciudad de Guayaquil.

- *Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana*

La cepa de *P. aeruginosa* seleccionada fue reactivada en caldo TSB y sembrada en Agar TSA tomando en cuenta las condiciones de crecimiento a 37 °C por 24 horas en aerobiosis.

Posteriormente se realizó pruebas de identificación: macroscópicas microscópicas (tinción Gram), pruebas bioquímicas y pruebas de susceptibilidad (antibiograma).

- Para la reactivación de la bacteria se preparó caldo TSB y se inoculó en el mismo de acuerdo con el (Anexo A).
- Para la confirmación de la identidad se preparó Agar TSA de acuerdo con las especificaciones de cada fabricante (Anexo B).
- Se preparó Agar Mueller Hinton para la realización de antibiograma de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Anexo C).
- Para observar las colonias características de la cepa de estudio se preparó Agar Sangre y para evidenciar el cambio de coloración del medio debido a la utilización de citrato se preparó Agar Simmons Citrato (Anexo D).
- Para observar la morfología de forma microscópica se realizó tinción Gram de acuerdo con el (Anexo E).

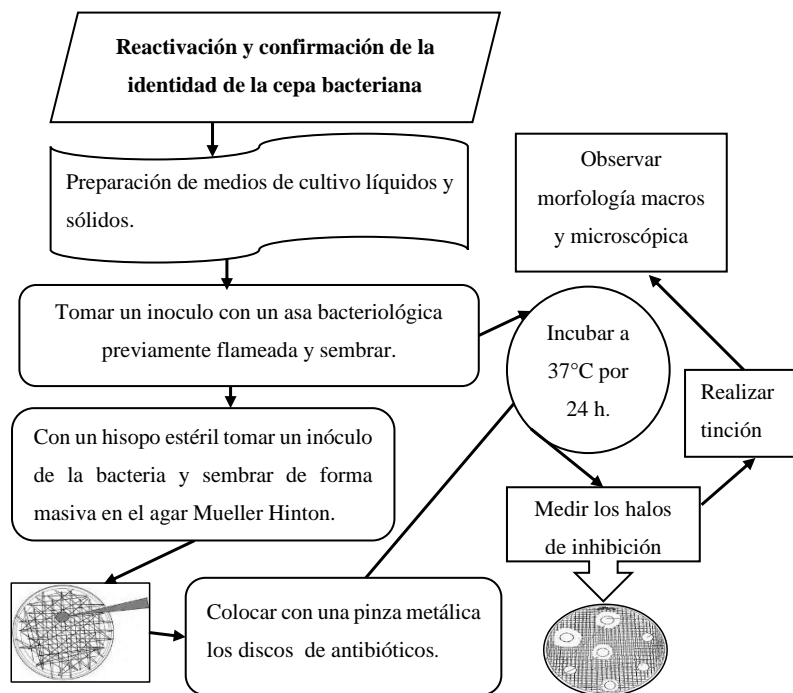


Ilustración 2-3: Flujograma de la reactivación y confirmación de la identidad de la cepa

Fuente: (Picazo, 2010).

- *Realización de pruebas bioquímicas para la identificación de Pseudomona aeruginosa*
- De una caja Petri cultivada con la bacteria de interés, se toma una colonia con un asa bacteriológica previamente flameada y se realizó la prueba de la oxidasa de acuerdo con el (Anexo F).
- Para evaluar la actividad ureásica se preparó el medio sólido urea, el medio SIM para evaluar indol, SH₂ y movilidad. Para evaluar si se trata de una bacteria fermentadora se preparó medio sólido KLIGER de acuerdo con las especificaciones del (Anexo G).

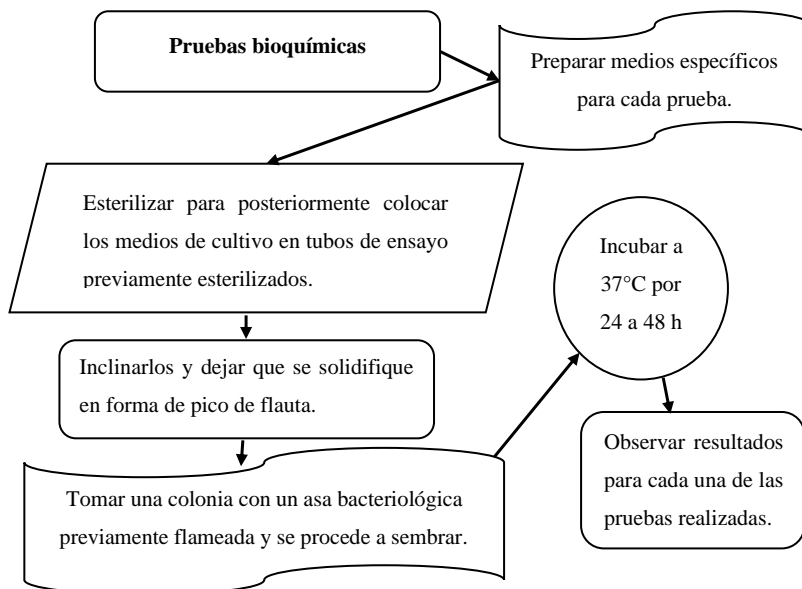


Ilustración 3-3: Flujograma preparación de pruebas bioquímicas

Fuente: (Fernández, y otros, 2010)

3.2.1.2. Fase 2

- *Preparación de la solución Stock o solución madre*

La Amoxicilina se disolvió en agua destilada estéril tibio, Ciprofloxacina se disolvió en ácido sulfúrico 0,01 N al igual que la Tetraciclina. Los cálculos fueron realizados de acuerdo con el (Anexo H).

- *Preparación de diluciones*

Una vez disuelto el principio activo de Amoxicilina, se realizaron las diluciones apropiadas para conseguir las concentraciones deseadas, se prepararon 8 concentraciones que fueron desde 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL y 256 µg/mL.

- Para Ciprofloxacina se prepararon 8 concentraciones que van de 0,50 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL y 64 µg/mL.
- Para Tetraciclina solo se preparó una concentración alta de 128 µg/mL ya que se utilizó solo de control, las diluciones se realizaron en caldo TSB con todas las medidas asepticas y usando la cámara de flujo laminar.

- *Preparación del cultivo nocturno de una colonia de P. aeruginosa*

Para la preparación del cultivo se siguió el proceso mencionado a continuación:

- El agar TSA se preparó de acuerdo con las especificaciones del fabricante con agua destilada, luego se autoclavó por 30 minutos a una temperatura de 121°C y a 15 psi.
- Luego del tiempo de esterilización se llevó a la cámara de flujo laminar y se dejó enfriar hasta una temperatura soportable por la palma de la mano.
- Se colocó el medio en cajas Petri estériles y secas hasta las tres cuartas partes dando un volumen cercano 20 mL. Se dejaron reposar por aproximadamente 15 minutos hasta su solidificación.
- Se tomó un inóculo del Stock bacteriano de *Pseudomona aeruginosa* y se siembra suavemente en el agar. Se incuba de 18 a 24 horas a 37 °C.
- Se preparó caldo TSB de acuerdo con las especificaciones del fabricante con agua destilada, luego se autoclavó por 30 minutos a 121°C y 15 psi.
- Se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar y se colocó en un tubo falcon de 15 mL y de la caja Petri antes sembrada se toma una colonia aislada con un asa bacteriológica previamente flameada.
- Se introdujo suavemente y de forma circular en el tubo falcon con caldo TSB, se incuba de 18 a 24 horas a 37°C.

- *Medición de la densidad óptica (OD) del cultivo bacteriano*

Para la medición de la densidad óptica del cultivo se siguió el proceso mencionado a continuación:

- De la suspensión del cultivo antes preparado se realizó una dilución 1/10.
- Se tomó una cantidad de la dilución y se lo llevó al espectrofotómetro a 600 nm, se diluyó

la solución hasta obtener una OD_{600nm} de 0.05.

- Esta suspensión bacteria se debe colocar en una caja Petri con hielos alrededor para que no varíe mucho la OD mientras se siembra en las microplacas.

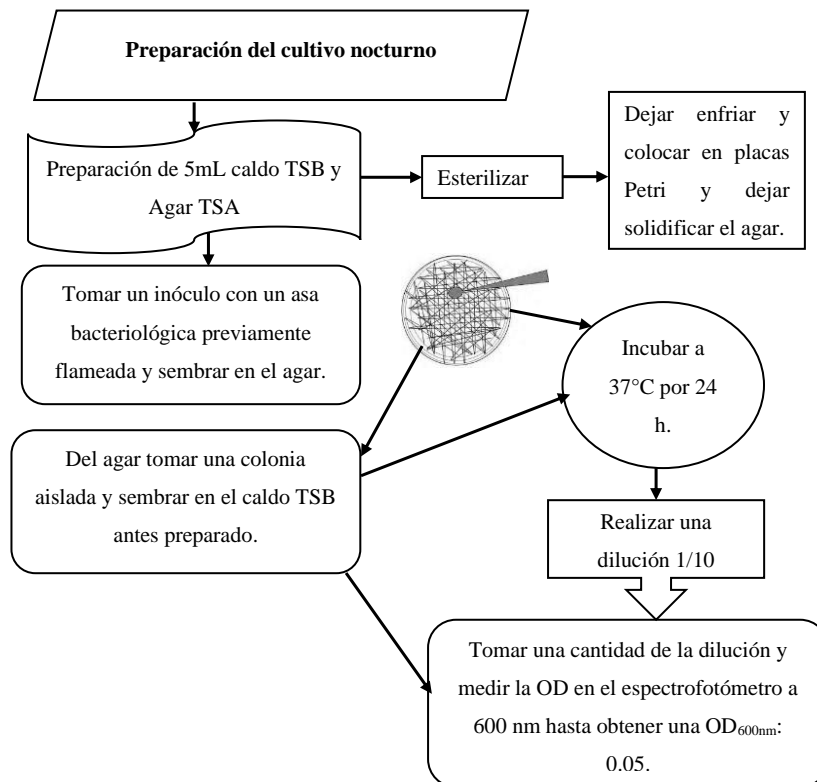


Ilustración 4-3: Flujograma preparación del cultivo nocturno

Fuente: (Fernández, y otros, 2010).

3.2.1.3. Fase 3: Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

- *Determinación de la CMI de los antibióticos de forma individualizada*

Para establecer la CMI de la Amoxicilina y Ciprofloxacina en la cepa de *P. aeruginosa*, se utilizó un método de sinergia de microdilución en caldo con el ensayo tablero de ajedrez basándose en la Guía MO7-11^{ED} del CLSI 2012 “Métodos para la dilución Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para bacterias que crecen aeróbicamente” (CLSI, 2012).

- En una microplaca estéril y seca de 96 pocillos (12mm x 8mm) se colocó con una micropipeta

multicanal automática en cada pocillo 5 μ L de la suspensión bacteriana con una OD_{600nm} 0,05 y 200 μ L de las diluciones de los antibióticos desde la concentración más baja hasta la más alta de acuerdo con el (Anexo I).

- Se procede a realizar el mismo proceso tanto para la amoxicilina como para la ciprofloxacina, en la última fila de la microplaca se coloca el antibiótico de control de crecimiento.
- Se incuban de 12 a 18 horas a 37 °C, posterior a ese tiempo se observó si existe o no la presencia de turbidez en los pocillos.
- Cada uno de los ensayos se los realizó por duplicado para obtener resultados más acercados a la realidad.

- *Determinación de la CMI de la combinación de antibióticos*

Para determinar la CMI se siguió el presente proceso:

- En una microplaca estéril y seca de 96 pocillos se colocó con una micropipeta automática multicanal 5 μ L de la suspensión bacteriana con una OD de 0,05.
- En el eje X se colocaron en cada pocillo 100 μ L las diluciones de Amoxicilina a diferentes concentraciones comenzando desde la más baja.
- En el eje Y se colocó 100 μ L de la dilución Ciprofloxacina igualmente de la concentración más baja, y así sucesivamente con las 7 diluciones de diferentes concentraciones de los antibióticos (Anexo J).
- Se observó los resultados de forma cualitativa mediante lectura directa de la existencia o no de turbidez en los pocillos a las 12 a 18 horas de incubación a una temperatura de 37 °C.
- Cada uno de los ensayos se los realizó por duplicado para obtener resultados más verdaderos.

- *Comprobación de la efectividad de la combinación con un antibiótico de control en dosis altas*

Para determinar la efectividad de la combinación con un medicamento de control se realizó lo siguiente:

- En la última fila de la microplaca se colocó la misma cantidad de suspensión bacteriana más 200 μ L de la dilución de tetraciclina con una concentración de 128 μ g/mL.
- Cada uno de los ensayos se los realizó por duplicado para obtener resultados más verdaderos.
- Se comprobó si existe o no la presencia de turbidez en la fila donde se agregó el control con la fila en la que se determinó cual fue la CMI de la combinación (Anexo Q).

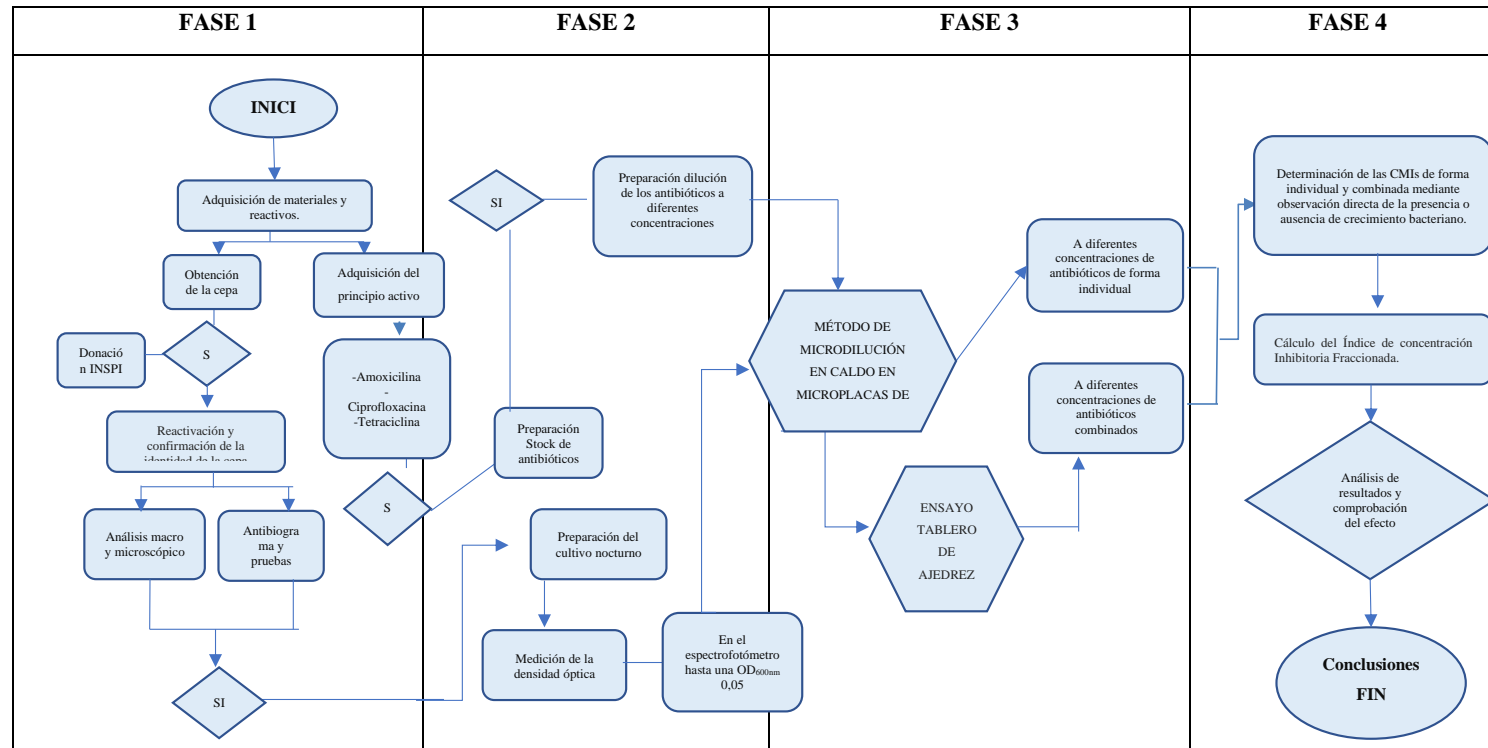
3.2.1.4. Fase 4: Análisis de los resultados

En cuanto a los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva para un análisis del perfil de susceptibilidad y la determinación de la concentración mínima inhibitoria de forma individual y combinada de las diluciones de amoxicilina y ciprofloxacina mediante una observación directa de la presencia o ausencia de turbidez en cada uno de los pocillos de las microplacas. La concentración inhibitoria fraccionada (CIF) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(A)}{(CMI)_a} + \frac{(B)}{(CMI)_b} = CIF_a + CIF_b = \text{Índice CIF}$$

Mediante el cálculo del índice inhibitorio fraccionario se determinó si hay o no sinergismo al combinar amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *P. aeruginosa* multirresistente.

Tabla 3-3: Métodos y técnicas usados en cada fase de la investigación



Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

CAPÍTULO IV

4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1. Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana

4.1.1. Análisis macroscópico, microscópico y pruebas bioquímicas

Tabla 1-4: Análisis macro-microscópico y pruebas bioquímicas de la cepa de *P. aeruginosa*

Tipo de análisis		Resultados					
Macroscópico		Colonias grandes, lisas, mucoides y gelatinoides con producción de halos de color verdoso					
Microscópico		Forma de bacilos alargados Gram negativos					
Pruebas Bioquímicas							
Bacteria	OXIDASA	CITRATO	UREA	SIM		KLIGER	
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+	-	Indol	-	Fermentación	
				SH ₂	-	Glucosa	-
				Motilidad	+	Gas glucosa	-
						Lactosa	-
						SH ₂	-

Fuente: CLSI, 2020

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

La cepa de *Pseudomona aeruginosa* donada por el INSPI tiene las siguientes características macroscópicas, sus colonias en agar sangre son grandes, lisas, mucoides y gelatinoides con producción de halos de color verdoso, con tinción Gram se observó en el microscopio bacilos alargados Gram negativos. En las pruebas bioquímicas se obtuvo que no son fermentadoras de glucosa, lactosa y sacarosa; tienen movilidad, oxidasa e indol positivo y SH₂ negativa.

4.1.2. Antibiograma

Tabla 2-4: Medición de halos de inhibición en comparación con los puntos de corte de la CLSI

Antibiótico	Contenido del disco	Puntos de corte (mm) CLSI			Medición de halos	
		S	I	R	mm	S / I / R
CRO	30 µg	≥ 21	14-20	≤ 13	17	R
CXM	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14	12	R
AMC	25 µg	≥ 29	21-28	≤ 20	11	R
CIP	5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15	10	R
AZM	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13	4	R

AM	10 µg	≥14	12-13	≤11	8	R
AX	25 µg	≥25	21-24	≤20	19	R
TE	30 µg	≥19	15-18	≤14	2	R
P	10 µg	≥14	12-13	≤11	14	R
CL	30 µg	≥18	15-17	≤14	15	I

Fuente: CLSI, 2020

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

Nota: **S:** sensible; **I:** Susceptibilidad intermedia; **R:** Resistente. Ceftriaxona (CRO), Cefuroxima (CXM), Amoxicilina + ácido clavulánico (AMX), Ciprofloxacina (CIP), Azitromicina (AZM), Ampicilina (AM), Amoxicilina (AX), Tetraciclina (TE), Penicilina (P), Cefalexina (CL); Puntos de corte correspondientes a *P. aeruginosa* tomados de CSLI.

En cuanto al antibiograma la cepa de estudio muestra resistencia a Ceftriaxona, Cefuroxima, Amoxicilina + ácido clavulánico, Ciprofloxacina, Azitromicina, Ampicilina, Amoxicilina, Tetraciclina, Penicilina y sensibilidad intermedia a la Cefalexina.

4.2. CMI individual de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *P. aeruginosa* multirresistente

Tabla 3-4: Representación de la CMI de amoxicilina en microplacas de 96 pocillos

		Columnas															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
Filas	Concentración de diluciones (µg/mL)	A:2															CONTROL DE NO CRECIMIENTO
	B:4																
	C:8																
	D:16																
	E:32																
	F:64						CMI										
	G:128																
	H:256																

Fuente: CLSI, 2020

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

NOTA: Coloración Azul: Turbidez y crecimiento bacteriano; **Blanco:** Ausencia de turbidez y crecimiento bacteriano.

Como se observa en la Tabla 4-4, la columna 1 es Control de crecimiento bacteriano y la columna 12 se encuentra altas concentraciones de tetraciclina capaz de inhibir el crecimiento y se representa de color blanco.

A partir de la columna 3 hasta 10 se determina que las concentraciones de 2 µg/mL hasta 32 µg/mL no son suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano por lo que se representan de color azul de acuerdo con la turbidez, como se puede observar en la Tabla.

La CMI se encuentra en la concentración de 64 µg/mL del antibiótico que está representada en el recuadro de color blanco indicando que no se observa crecimiento bacteriano en los micropocillos, sobresaliendo la sensibilidad a Amoxicilina por parte de la bacteria.

Tabla 4-4: CMI de ciprofloxacina en microplacas de 96 pocillos

		Columnas												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Filas	Concentración Diluciones (µg/mL)	A: 0.50												CONTROL DE NO CRECIMIENTO
		B:1												
		C:2												
		D:4												
		E:8												
		F:16						CMI						
		G:32												
		H:64												

Fuente: CLSI, 2020

Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

NOTA: Coloración Azul: Turbidez y crecimiento bacteriano; **Blanco:** Ausencia de turbidez y crecimiento bacteriano.

En la Tabla 5-4 se observa la sensibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* frente a Ciprofloxacina, en la columna 1 se observa el Control de crecimiento bacteriano, es representado de color azul por la turbidez que presenta.

En la columna 12 se evidencia inhibición del crecimiento bacteriana debido a altas concentraciones de Tetraciclina. A partir de la columna 3 hasta 10 se determina que las concentraciones de 0.50 µg/mL hasta 8 µg/mL no son suficientes para inhibir el crecimiento bacteriano. La CMI se encuentra en la concentración de 16 µg/mL del antibiótico representado en el recuadro de color blanco, sobresaliendo la sensibilidad a Ciprofloxacina por parte de la bacteria.

4.3. Evaluación del sinergismo *in vitro* de la combinación amoxicilina y ciprofloxacina frente a *P. aeruginosa* multirresistente

Tabla 5-4: CMI de la combinación amoxicilina y ciprofloxacina con la técnica tablero de ajedrez en microplacas de 96 pocillos

		Filas (Eje X)												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Columnas (Eje Y)	Concentración Ciprofloxacina (µg/mL)	32												CONTROL DE NO CRECIMIENTO
	16													
	8													
	4							CMI						
	2													
	1													
	0.50													
	0													
		0	2	4	8	16	32	64	128					
		Concentración Amoxicilina (µg/mL)												

Fuente: CLSI, 2020.
Realizado por: Imbaquingo, Jesenia, 2023.

NOTA: Coloración Azul: Turbidez y crecimiento bacteriano; **Blanco:** Ausencia de turbidez y crecimiento bacteriano.

4.3.1. Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionada (CIF)

Antibiótico A: Amoxicilina

- CMI individual (CMI)_a: 64 µg/mL
- CMI del antibiótico A en presencia del antibiótico B: 2 µg/MI

$$\begin{aligned}\text{Índice CIFa} &= \frac{(A)}{(CMI)_a} \\ \text{Índice CIFa} &= \frac{(2 \mu\text{g/mL})}{(64 \mu\text{g/mL})_a} \\ \text{Índice CIFa} &= 0.03125\end{aligned}$$

Antibiótico B: Ciprofloxacina

- CMI individual (CMI)_b: 16 µg/mL
- CMI del antibiótico B en presencia del antibiótico A: 0.50 µg/mL

$$\begin{aligned}\text{Índice CIFb} &= \frac{(B)}{(CMI)_b} \\ \text{Índice CIFb} &= \frac{(0,50 \mu\text{g/mL})}{(16 \mu\text{g/mL})_b} \\ \text{Índice CIFb} &= 0.03125\end{aligned}$$

Cálculo del índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada total:

$$\text{Índice CIF} = \text{Índice CIFa} + \text{Índice CIFb}$$

$$\text{Índice CIF} = 0.3125 + 0.03125$$

$$\text{Índice CIF} = 0.0625$$

Como se puede observar en la Tabla 6-4 la cepa de estudio presenta sensibilidad antimicrobiana frente a la combinación de Amoxicilina (antibiótico A) y Ciprofloxacina (antibiótico B) mediante el método de microdilución en caldo usando microplacas de titulación con el ensayo tablero de ajedrez, la distribución de las concentraciones de los antibióticos se encuentran de la siguiente manera, en la columna 1 se observa el control de crecimiento bacteriano el cual presenta turbidez y se representa de color azul.

En la columna 12 no se evidencia crecimiento debido a las altas concentraciones de Tetraciclina, antibiótico usado como control y se representa de color blanco.

A partir de la columna 3 hasta 10 se encuentran las concentraciones de cada uno de los antibióticos, en el eje X se encuentra el antibiótico A con concentraciones que van de 0 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL y 128 µg/mL.

En el eje Y se encuentran las concentraciones que van desde 0 µg/mL, 0.50 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL y 32 µg/mL del antibiótico B. La CMI de la combinación del antibiótico A es de 16 µg/mL y el B es de 4 µg/mL como se puede evidenciar en la tabla.

El índice de crecimiento inhibitorio fraccionario para el antibiótico A es 0.031. Y para el antibiótico B es 0.031, sumando los dos valores obtenemos el CIF total de 0.062 cuyo valor indica sinergismo entre ambos antibióticos.

4.4. Discusión

La resistencia antimicrobiana es la capacidad que tienen las bacterias para evadir la acción de uno o varios antibióticos haciendo que se dificulte y aumente el costo del tratamiento terapéutico de un paciente que presente algún tipo de infección, incrementando el riesgo de propagación de enfermedades que inclusive puede llegar a ocasionar la muerte (Bravo 2018, p.4).

En los últimos años se ha convertido en un problema de gran relevancia a nivel mundial amenazando los sistemas de salud de países avanzados y en vías de desarrollo, esto se debe principalmente debido al uso inadecuado de este tipo de fármacos que se ha visto aumentado durante la pandemia ocasionada por el COVID-19 (Aguilera 2020, p.11).

Una de las bacterias que ha generado multirresistencia a antibióticos de amplio espectro es *Pseudomona aeruginosa* debido a sus mecanismos intrínsecos y extrínsecos, este patógeno oportunista es capaz de generar infecciones nosocomiales graves e inclusive la muerte de aquellos pacientes inmunodeprimidos (Cantón 2015, p.3).

Una de las alternativas para enfrentar esta problemática es la combinación de antibióticos, siguiendo esta estrategia se identificó la actividad antimicrobiana y el efecto sinérgico de la combinación Amoxicilina y Ciprofloxacina frente una cepa de *P. aeruginosa* de multirresistencia comprobada.

Se confirmó la identidad de la cepa bacteriana donada por el INSPI (**Tabla 1-4**), mediante el análisis macroscópico en agar sangre se observó colonias grandes, lisas, mucoides y gelatinoides, con producción de halos de color verdoso característico de *P. aeruginosa* (**Anexo K**). Esto se debe a la hemolisina, una enzima que degrada de forma parcial la hemoglobina presente en el agar sangre, razón por la cual se la conoce como una bacteria β - hemolítica (Callico et al. 2014, p.21).

Se realizó tinción Gram observando en el microscopio bacilos alargados Gram negativos propios de la especie (**Anexo L**). Las pruebas bioquímicas fueron Simmons Citrato con un resultado positivo por el cambio de coloración del medio de verde a azul por la capacidad de la bacteria de usar el citrato como fuente de carbono y energía. El resultado de la actividad ureásica fue negativo ya que este tipo de bacteria no hidroliza la urea (Fernández 2010, p.12).

En el medio semisólido SIM se valoró los siguientes parámetros: Indol fue negativo ya que *P. aeruginosa* no tiene la capacidad de producir indol a partir del triptófano y tampoco produce gas de sulfuro de hidrogeno, su motilidad es positiva ya que se observó una zona de crecimiento difuso alrededor del sitio de inoculación lo que demuestra la presencia del flagelo (Ramírez et al. 2020, p.7).

En KLIGER se identificó que es una bacteria no fermentadora azúcares ya que no presentó cambio de coloración del medio (**Anexo M**). Por lo cual se puede asegurar que se trata de *Pseudomonas aeruginosa* ya que cumple con las características establecidas en Manual de microbiología Médica (Ramírez et al. 2020, p.7).

Se realizó un antibiograma para determinar la actividad antimicrobiana de la cepa de *P. aeruginosa* usando 10 antibióticos de distintos grupos (**Tabla 2-4**). Los resultados se analizaron mediante la medición de los halos y se determinó si es sensible, intermedio o resistente de acuerdo con los puntos de corte del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI 2020, p.15). Se comprobó la resistencia de la cepa a los antibióticos usados, cumpliendo así con los criterios de inclusión del presente trabajo de investigación (**Anexo N**).

Se determinó de forma visual la CMI que corresponde a ser la menor concentración del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, la Amoxicilina presentó un resultado de 64 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabla 3-4**) (**Anexo O**). De acuerdo con (Picazo, 2010 pág. 9) la CMI para la Amoxicilina es $>512 \mu\text{g/mL}$, las concentraciones son muy altas ya que *P. aeruginosa* es productora de la enzima AmpC que inactiva la acción de las amino penicilinas, el resultado obtenido de 64 $\mu\text{g/mL}$ puede deberse a que en los últimos años ya no se ha usado para tratar este patógeno, por lo que no se han generado aun resistencia (IDEXX 2022, p.2).

En cuanto a la CMI de Ciprofloxacina es 8 µg/mL valores que difieren con la CMI obtenida que es de 16 µg/mL (**Tabla 4-4**) (**Anexo P**), esto puede deberse a las distintas condiciones de humedad, temperatura, así como también al uso inadecuado de los últimos años. También es muy importante el origen de la cepa bacteriana ya que presenta mayor resistencia una cepa de origen hospitalario que una cepa de origen comunitario (Ferrer et al. 2020, p.16).

Para identificar una nueva terapia mediante la combinación de antibióticos contra *P. aeruginosa* se eligió antibióticos aprobados por la FDA cuyos mecanismos de acción se centre en diferentes dianas, tengan muy pocos efectos adversos y que tengan la capacidad de potenciar la actividad antimicrobiana (CSLI 2020, p.5).

Los antibióticos elegidos fueron Amoxicilina, un antibiótico con actividad bactericida cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana (Ureña, y otros, 2018) y Ciprofloxacina, un antibiótico con actividad bactericida que actúa al nivel del material genético, inhibiendo la enzima DNA girasa, la cual es esencial para la duplicación, transcripción y reparación del ADN bacteriano (Suárez et al. 2011, p.11).

El método usado para valorar el efecto de la combinación fue microdilución en caldo usando microplacas mediante el ensayo tablero de ajedrez que mostró tener efecto sinérgico (**Tabla 5-4**) (**Anexo Q**), esto se concluye después del cálculo del índice Concentración Inhibitoria Fraccionada (CIF) es 0,062, según los valores de CIF obtenidos se considera que valores menores a 0,5 la combinación presenta sinergismo, valores iguales a 1 hay adición y valores de CIF entre 2 o 4 presenta antagonismo (Picazo 2010, p.11).

La demostración de sinergismo entre dos antibióticos requiere que el efecto de la combinación sea significativamente mayor que el resultado de cada uno, lo cual equivale a que la CMI de ambos antibióticos disminuya por lo menos 2 diluciones en la combinación (Hernández 2019, p.29).

Lo cual se pudo corroborar ya que la CMI para Amoxicilina es 64 µg/mL mientras que en la combinación se redujo a 16 µg/mL de igual forma para ciprofloxacina la CMI individual es 16 µg/mL y en la combinada se redujo a 4 µg/mL (**Tabla 5-4**).

Se plantea que el efecto sinérgico de Amoxicilina y Ciprofloxacina se debe a la actividad del primer antibiótico al debilitar la pared de celular de la bacteria facilitando aún más el paso y la captación de Ciprofloxacina (Mohammed 2019, p.132).

A pesar de que no existan estudios de esta combinación, estos resultados determinan una buena actividad *in vitro*, por lo que lo convierte en una información valiosa que puede contribuir a la orientación de estudios *in vivo* a futuro, que permitan establecer mejores pautas en el tratamiento de infecciones causadas por *Pseudomona aeruginosa* multirresistente.

En un estudio se demostró la eficacia de las combinaciones entre Ceftazidime, Aztreonam, Meropenem, Amikacina, Ciprofloxacina, Polimixina B y Vancomicina, demostrando ser eficaces en el tratamiento de infecciones por *P. aeruginosa* a pesar de que algunos de estos antibióticos tienen susceptibilidad disminuida o son completamente resistentes ya que en combinación alcanzan un efecto bactericida (Agregado et al. 2019, p.14).

Como es en el caso de este estudio ya que la bacteria es completamente resistente a la Amoxicilina y la susceptibilidad a la Ciprofloxacina se ha visto disminuida por el uso inadecuado y la automedicación. Sin embargo en combinación sí presentó tener un efecto sinérgico y una CMI capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

En otro estudio se menciona el efecto sinérgico que tiene un antibiótico betalactámico y un aminoglucósido recalando que el sinergismo se obtiene también en virtud de que ambos antibióticos son bactericidas al igual que los dos antibióticos del presente estudio (Flores et al. 2016, p.11).

La tetraciclina es un antibiótico que ha perdido eficacia frente a *P.aeruginosa*, por esa razón en este estudio se usó una elevada concentración ya fue usado como control, debido a que llegan a inhibir su crecimiento y puede generar efectos adversos mayores en comparación a los ocasionados en la combinación, por lo que se requiere más estudios a futuro (Alav et al. 2018, p.13).

CONCLUSIONES

- Se evaluó el efecto sinérgico de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina frente a una cepa de *Pseudomona aeruginosa* multirresistente mediante la técnica de microdilución en caldo usando el ensayo tablero de ajedrez y el cálculo del índice de concentración fraccionada siendo el CIF= 0,062 un valor que indica sinergismo entre esos dos antibióticos bactericidas siendo un dato similar en comparación con la combinación de un betalactámico y un aminoglucósido los cuales presentan el mismo efecto bactericida.
- Se comparó la eficacia de la sinergia entre los antibióticos combinados con la concentración de los antibióticos de forma individualizada mediante el análisis de las CMI, ya que de forma individual estas concentraciones son altas y en futuro pueden llegar a ocasionar mayor resistencia de la que ya presentan. Mientras que la CMI de la combinación se reduce 2 diluciones lo cual favorece a la disminución de efectos adversos y reduce la probabilidad de desarrollar resistencia por parte de la bacteria de estudio.
- Se determinó la concentración mínima inhibitoria de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina obteniendo como resultado 16/4 µg/mL respectivamente frente a una cepa de *Pseudomona aeruginosa* multirresistente, siendo una alternativa para futuras investigaciones en el tratamiento de infecciones ocasionadas por este patógeno oportunista.
- Se comprobó la efectividad de la combinación entre Amoxicilina y Ciprofloxacina con un antibiótico de amplio espectro como la Tetraciclina frente a *Pseudomona aeruginosa* multirresistente mediante el análisis comparativo entre la CMI combinada con la concentración de 128 µg/mL de Tetraciclina que fue usado como control ya que a esas concentraciones no se evidenció crecimiento bacteriano al igual que el pocillo de la CMI de 16/4 µg/mL de la combinación de los dos antibióticos.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más replicaciones biológicas y técnicas de esta combinación con un número mayor de cepas de *Pseudomona aeruginosa* obtenidas directamente de cultivos de aquellos pacientes que presenten infecciones nosocomiales ya que ellos presentan mayor resistencia bacteriana.
- Se sugiere realizar más combinaciones con diferentes antibióticos que puedan llegar a potenciar su acción y tener efecto sinérgico que ayude al tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias multirresistentes.
- Para una mejor interpretación de resultados se recomienda usar un lector de microplacas que permita de forma más precisa la cuantificación del crecimiento bacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

AGREGADO, D et al. *Terapia combinada contra Pseudomonas aeruginosa extensamente resistente en el modelo de muslo de ratón neutropénico. Repositorio Institucional Universidad de Antioquia.* [en línea] 07 de 2020. Disponible en: <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/handle/10495/17534>.

AGUILERA, Y et al. *Infecciones bacterianas asociadas a la COVID-19 en pacientes de una unidad de cuidados intensivos.* [en línea] 2020. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572020000300003&script=sci_arttext&tlng=pt.

AJILA, A y OÑA, D. *Determinación de la actividad de ceftolozane/tazobactam mediante el método de microdilución en caldo en cepas de pseudomonas aeruginosa provenientes del INSP, año 2019. Repositorio de Tesis de Grado y Posgrado de la PUCE.* [en línea] 2021. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/18866>.

ALAV, I et al. *Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation.* 2018.

BELLIO, P et al. *Método nuevo y simplificado para estudios de combinación de fármacos mediante ensayo de tablero de ajedrez.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8563647/>.

BRAVO, L. *Resistencia antibiótica en pseudomonas aeruginosa: situación epidemiológica en españa y alternativas de tratamiento. Review.* [en línea] 2018. Disponible en: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/LAURABRAVOBURGUILLOS%20ROS.pdf>.

BRITANIA. *Mueller hinton agar.* [en línea] 2021. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6151d680d83d2.pdf.

BRITANIALAB. *Christensen Medio (Urea Agar Base).* [en línea] 2021. Disponible en: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e95043249.pdf.

BULDAIN, D. *Estudio de la eficacia in vitro de combinaciones de antimicrobianos con aceite esencial de Melaleuca armillaris frente a Staphylococcus aureus* [en línea] 2019. Disponible en: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/82453/Documento_completo.pdf?sequence=&isAllowed=y.

CALDERÓN, L. *Perfil de susceptibilidad in vitro de Pseudomonas aeruginosa frente a Cefotazane/Tazobactam.* Pontificia universidad javeriana. [En línea] 2019. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/211118697.pdf>.

CALLICÓ, A et al. *Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa.* Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. [en línea] 2014. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/vac/v13n3/vac01304.pdf>.

CANTÓN R et al. *Consenso español para la prevención y el tratamiento de la infección bronquial por Pseudomonas aeruginosa en el paciente con fibrosis quística.* [en línea] 2015. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0300289614004876>.

CANUT A et al. *Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos.* Procedimientos en Microbiología Clínica . [en línea] 2020. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/microbiologia/seimc-procedimiento70.pdf>.

CHUNG, J et al. *Pseudomonas aeruginosa Eliminates Natural Killer Cells via Phagocytosis-Induced Apoptosis.* [en línea] 2009. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1000561>.

CLSI. *Clinical Laboratory Standards Institute. M100.* [en línea] 2020. Disponible en: <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>.

CLSI. *Metodo de determinacion de sensibilidad antimicrobiana por dilucion.* [en línea] 2012. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>.

CONDALAB. *Agar Soja y Trypticaseína (TSA).* [en línea] 2021. Disponible en: https://mdmcientifica.com/wp-content/uploads/2021/09/1068_es_2.pdf.

CORDIÉS, L et al. *Combinaciones de antimicrobianos.* [en línea] 2022. Disponible en: <http://bvsalud.org/biblioref/2022/06/20300/combinaciones-de-antimicrobianos.pdf>.

CUSHQUICULLMA, M. *Análisis del uso racional de antibióticos betaláctamicos en pacientes del área de pediatría del " hospital general docente de Riobamba".* [en línea] 2021. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14770/1/56T01001.pdf>.

DÍAZ, V et al. *Cambios estructurales y genes expresados diferencialmente en Pseudomonas aeruginosa expuesta a la combinación meropenem-ciprofloxacina.* *ASM Journals.* [en línea] 2014. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02584-13>.

DRISCOLL, J et al. *Epidemiología, patogenia y tratamiento de las infecciones por Pseudomonas aeruginosa.* [en línea] 2012. Disponible en: ink.springer.com/article/10.2165/00003495-200767030-00003.

ESTEVA, J. *Sinergismo.* *Offarma.* [en línea] 2001. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13013464>.

FERNÁNDEZ, A et al. *Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología.* [en línea] 2010. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf>.

FERRER, R et al. *Los potenciadores de la permeabilidad sensibilizan a las Enterobacteriaceae y Pseudomonas aeruginosa que expresan β -lactamasa a los inhibidores de β -lactamasa, restaurando así su susceptibilidad a los β -lactámicos.* *Revista internacional de agentes antimicrobianos.* [en línea] 2020. Disponible en: <http://sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924857920301436>.

FLORES, J et al. *Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos.* *REVISTA ADM.* [en línea] 2016. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2016/od165c.pdf>.

GARCÍA, E. *Medios de Cultivo.* *Seminarios de Microbiología.* [en línea] 2003. Disponible en: <https://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>.

GÓMEZ, C et al. *Mecanismos de resistencia en pseudomonas aeruginosa:entendiendo a un peligroso enemigo.* [en línea] 2015. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rfmun/v53n1/v53n1a04.pdf>.

GÓMEZ, J. *Combinaciones de antibióticos: Nuevas perspectivas y futuro.* [en línea] 2008. Disponible en: https://seq.es/seq/html/revista_seq/0396/edit1.html. 3.

GÓMEZ J et al. *Los betalactámicos en la práctica clínica.* [en línea] 2015. Disponible en: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_1_gomez.pdf.

GÓMEZ, J. *Actividad in-vitro de fosfomicina, sola o en combinación, frente a aislamientos clínicos de Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos* *Actividad in vitro de fosfomicina, sola o en combinación, frente a aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa . Microbiología Clínica.* [en línea] 2016. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0213005X15002748?via%3Dihub>.

GONZÁLEZ, R et al. *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología.* [en línea] 2020. Disponible en: <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>.

HERNÁNDEZ, M et al. *Evaluación de la eficacia in vitro e in vivo del tratamiento antimicrobiano combinado por el tablero de damas.* [en línea] 2019. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000200006.

HOIBY, N et al. *Diagnóstico de infecciones por biofilm en pacientes con fibrosis quística.* [en línea] 2017. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/apm.12689>.

IDEXX. *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI).* [en línea] 2022. Disponible en: https://www.idexx.com/media/filer_public/9a/96/9a96e4f7-8127-4306-981a-c60920f092f6/mic-guia-microbiologica-es.pdf.

JIMÉNEZ, D. *Determinación de sinergias antibióticas en patógenos de interés sanitario.* Universidad Zaragoza. [en línea] 2018. Disponible en: https://araid.es/sites/default/files/tesis/memoria_tfg_daniel_jimenez_navarro.pdf.

LÓPOEZ, L. *Guía Práctica para el análisis de datos biológicos.* 2021.

MCDLAB. *Agar Hierro de Kligler.* 2014.

MEDINA, D et al. *Resistencia a antibióticos, una crisis global. Grupo de Investigación en Farmacoepidemiología y Farmacovigilancia.* [en línea] 2015. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmri/v21n1/v21n1a13.pdf>.

MENDOZA, N. *Tetraciclinas. Actualidades Farmacológicas.* [en línea] 2016. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no51-1/RFM051000106.pdf>.

MOHANNED, A. *Tackling β -lactam Resistance in MRSA: Novel Drug Target and Novel Therapy.* 2019, p. 62.

MOYÓN, L. *Evaluación de la actividad antibacteriana y hemoaglutinante de extractos obtenidos a partir de Juglans neotropica diels.* [en línea] 2020. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17588/1/56T01039.pdf>.

MSP. *Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018. Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública.* [en línea] 2020. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf.

MUNTA, J. *Mecanismos de resistencia a los antibióticos.* [en línea] 2016. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

OBANDO, P et al. *Descripción general de los principales grupos de fármacos antimicrobianos. Antibióticos. (v.3/2020). Guía_ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico.* [en línea] 2020. Disponible en: <https://www.guia-abe.es/generalidades-descripcion-general-de-los-principales-grupos-de-farmacos-antimicrobianos-antibioticos->.

OCHOA, A et al. *Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas.* [en línea] 2013. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/bmhim/hi-2013/hi132j.pdf>.

OMS. *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-icobacter%20pylori%2C%20Staphylococcus%20aureus%2C%20Streptococcus,riesgo%20la%20salud%20de%20la>.

OVIEDO H et al. *Realidades de la práctica de la automedicación en estudiantes de la Realidades de la práctica de la automedicación en estudiantes.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://scielo.isciii.es/pdf/eg/v20n62/1695-6141-eg-20-62-531.pdf>.

PACHAY, J. *Pseudomonas aeruginosa y su evolución de resistencia a los antibióticos en un hospital de segundo nivel en Portoviejo, Ecuador.* [en línea] 2021. Disponible en: <http://revistas.utm.edu.ec/index.php/QhaliKay/article/view/3002/3351>.

PALLERONI, J. *The Pseudomonas story Environ. Microbiology.* [en línea] 2010. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2009.02041.x>.

PAZ, V et al. *Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-gramnegativas/infecciones-por-pseudomonas>.

PEÑA, C et al. *Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections.* 2015, pp. 539–548, 2015.

PÉREZ, E. *Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica.* [en línea] 2010. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-tetraciclinas-sulfamidas-metronidazol-S0213005X09005187>.

PICAZO, J. *Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* [en línea] 2010. Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosEspeciales_Sensibilidad.pdf.

POLANCO, N. *Reconocimiento de la variabilidad de los exoproductos de Pseudomonas aeruginosa en medios de cultivo y en infecciones clínicas.* [en línea] 2008. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/JoseOdaly/publication/43563674_Recognition_Of_The_Variability_Of_Pseudomonas_Aeruginosa_Culture_Medium_Exoproducts_With_Proteins_Secreted_To_Tissue_In_Human_Infection/links/0a85e52f14615290b7000000/Recognition-Of-The-

RADA, B. *Liberación de trampa extracelular de neutrófilos impulsada por la motilidad bacteriana: relevancia para la enfermedad pulmonar de fibrosis quística.* [en línea] 2017. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19420889.2017.1296610>.

RAMÍREZ, J. *Manual de laboratorio de microbiología médica . Universidad veracruzana.* [en línea] 2020. Disponible en: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Microbiologia-Medica-Laboratorio.pdf>.

RODRÍGUEZ, C. *Manual biocen de medios de cultivo.* [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.pdf>.

ROSANOVA, M et al. *Eficacia y seguridad del tratamiento empírico con piperacilina/tazobactan como monoterapia en episodios de neutropenia y fiebre en niños con cáncer: revisión sistemática y meta-análisis.* [en línea] 2021. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182021000400488>. ISSN 0716-1018.

ROSS, J et al. *Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador.* [en línea] 2020. Disponible en: <https://doi.org/10.23936/pfr.v5i1.144>.

RUIZ, L. *Resistencia a antimicrobianos y virulencia en cepas no -clínicas de Pseudomonas aeruginosa.* [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.revinf.cl/index.php/revinf/article/view/420/171>.

SALGADO, P et al. *Tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas. Bacteriología.* [en línea] 2015. Disponible en: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_sup1_salgado.pdf.

SÁNCHEZ, M. *Determinación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas y bombas de expulsión en Pseudomonas aeruginosa.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/13524>.

SCOFFIELD, J et al. *Un estreptococo comensal secuestra un exopolisacárido de Pseudomonas aeruginosa para promover la formación de biopelículas.* [en línea] 2017. Disponible en: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=11371/journal.ppat.1006300>.

SOBERÓN G. *Pseudomonas aeruginosa*. Universidad Nacional Autónoma de México. [en línea] 2015. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3/>.

SOTO, A. *Medios de Cultivo de Microorganismos*. edulabc. [en línea] 2019. Disponible en: <https://edulabc.com.mx/medios-de-cultivo/>.

SUÁREZ, A. *Ciprofloxacín use and overuse*. MEDISAN. [en línea] 2011. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v15n3/san18311.pdf>.

SYSTEMS, DIAGNOSTIC. *BD Tryptic Soy Broth (TSB)*. [en línea] 2008. Disponible en: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/BA/ES-BA-257107.pdf>.

TARCO, N. *Resistencia antimicrobiana de pseudomonas aeruginosa aislada en pacientes de la Clínica D.A.M.E. en el periodo agosto 2013-agosto 2014*. [en línea] 2016. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/11553>.

UNE. *Norma Española UNE-EN ISO 20776*. 2021.

UREÑA, L et al. *Protocolo de uso de antibioterapia en pacientes con alergia a penicilina (amoxicilina)*. [en línea] 2018. Disponible en: <https://serviciopediatria.com/wp-content/uploads/2020/02/Protocolo-ALERGIA-A-PENICILINA.-SP-HGUA-2018.pdf>.

VALDERRAMA, S et al. *Factores de riesgo para bacteriemia por Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenémicos adquirida en un hospital colombiano*. [en línea] 2016. Disponible en: http://scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572016000500010.

VELÁSQUEZ, J et al. *Combinación de antibióticos en pediatría*. [en línea] 2008. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0004-06492008000300007&script=sci_arttext.

ANEXOS

ANEXO A: PREPARACIÓN DE CALDO SOJA TRIPTICASEÍNA (TSB)

Es un medio rico en nutrientes que permite el aislamiento y cultivo de microorganismos patógenos.

Preparación:

- Suspender 30 gramos en 1000 mL de agua destilada según la técnica.
- Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente y esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos y dejar enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 45 a 50 °C.
- Verter en tubos de ensayo estériles colocar tapones y almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril etiquetado con la fecha de elaboración.
- Se realizó la siembra con un inóculo de un cultivo con un asa bacteriológica previamente flameada teniendo como resultados crecimiento de colonias (Condalab, 2020 pág. 2).

ANEXO B: PREPARACIÓN DE TRIPTEÍNA SOYA AGAR (TSA)

Medio de cultivo general que favorece al desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos y estrictos.

Preparación:

- Suspender 40 gramos en 1000 mL de agua destilada, mezclar bien y disolver con calor.
- Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente y esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos y dejar enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 45 a 50 °C.
- Verter en las placas Petri estériles y dejar que se solidifiquen.
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril etiquetado con la fecha de elaboración.
- Se realizó la siembra en estría sobre la superficie con un asa bacteriológica previamente flameada teniendo como resultados crecimiento de colonias (Condalab, 2021 pág. 3)

ANEXO C: PREPARACIÓN DE AGAR MUELLER HINTON

Base de Agar de Sangre se recomienda como una base a la que se puede añadir sangre para uso en el aislamiento y cultivo de microorganismos patógenos.

Preparación:

- Suspender 40 gramos en 1000 mL de agua destilada según la técnica.
- Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente y esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos y dejar enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 45 a 50 °C.
- Añadir de 5 a 10 % de sangre al medio esterilizado y mezclar bien.
- Verter en las placas Petri estériles y dejar que se solidifiquen
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril etiquetado con la fecha de elaboración.
- Se realizó la siembra en estría sobre la superficie con un asa bacteriológica previamente flameada teniendo como resultados crecimiento de colonias (Britania, 2021 pág. 1).

ANEXO D: PREPARACIÓN DE BASE DE AGAR DE SANGRE (INFUSIÓN AGAR)

Base de Agar de Sangre se recomienda como una base a la que se puede añadir sangre para uso en el aislamiento y cultivo de microorganismos patógenos.

Preparación:

- Suspender 40 gramos en 1000 mL de agua destilada según la técnica.
- Calentar hasta ebullición para disolver el medio completamente y esterilizar en la autoclave a 121 °C durante 20 minutos y dejar enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 45 a 50 °C.
- Añadir de 5 a 10 % de sangre al medio esterilizado y mezclar bien.
- Verter en las placas Petri estériles y dejar que se solidifiquen
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril etiquetado con la fecha de elaboración.
- Se realizó la siembra en estría sobre la superficie con un asa bacteriológica previamente flameada teniendo como resultados crecimiento de colonias (Condalab, 2020 pág. 2).

ANEXO D: PREPARACIÓN DE SIMMONS CITRATO AGAR

Agar de Citrato Simmons se recomienda para la diferenciación de los miembros de enterobacterias sobre la base de citrato utilización.

Preparación:

- Suspender 24,28 gramos en 1000 ml de agua destilada, según lo descrito en la técnica. En este caso se preparó 7.28 gramos en 300 ml de agua destilada.
- Llevar al calor, a ebullición, para disolver el medio completamente.
- Mezclar bien y distribuir en tubos o frascos aproximadamente 4ml por cada tubo. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos.
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril. Etiquetar poniendo fecha de elaboración.

Resultados:

POSITIVA: cuando existe crecimiento y/o viraje del color en el medio.

NEGATIVA: cuando no se observa cambio de color en el medio y cuando no hay crecimiento (Britanialab, 2021).

ANEXO E: PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN GRAM

Preparación del frotis:

- Se tomará una colonia de un cultivo de 24 horas y se la extenderá en un portaobjetos.
- Se fija la muestra pasándola tres o cuatros veces a través de la llama de un mechero Bunsen de manera que el material no se lave durante la tinción y se tiñe.

Tinción

- Colocar el frotis en un soporte para tinción y recubra la superficie con solución de cristal violeta.
- Luego de un minuto lave con agua destilada.
- Cubra el frotis con lugol durante un minuto y nuevamente lave con agua destilada.
- Colocar alcohol cetona por 10 segundos o hasta que la decoloración sea evidente y enjuagar suavemente con agua destilada.
- Cubrir el frotis con safranina diluida 1:10 por 30 segundos y enjuagar suavemente con agua destilada.
- Colocar el frotis en posición vertical, para permitir que el exceso de agua drene y el frotis se seque. Posteriormente se observará al microscopio con el objetivo de 100x (de inmersión), utilizando aceite de inmersión. Las bacterias gramnegativas se tiñen de rosáceo (Gonzales, y otros, 2020 pág. 42).

ANEXO F: PRUEBA DE LA OXIDASA

Es utilizada para determinar si un microorganismo produce la enzima citocromo oxidasa. La prueba se usa en la caracterización inicial de bacterias gramnegativa.

Procedimiento:

- Poner un trozo de papel filtro sobre la tapa de una caja Petri.
 - Añadir una gota del reactivo de oxidasa.
 - Depositar sobre el reactivo con un asa bacteriológica una colonia bacteriana y frotar.
- Esperar de 10 a 30 segundos la reacción.

Resultado:

Positivo: se colorea de azul a violeta azulado, no se debe leer después de los 60 segundos.

Negativo: color rosado o sin cambio de color (Fernández et al. 2010, p.32)

ANEXO G: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

UREA

Base de Agar de Urea se recomienda diferenciar microorganismos en base a la actividad ureásica.

Preparación:

- Suspender 24 gramos en 950 ml de agua destilada y dejar reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para su dilución total.
- Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Enfriar a 50 ° C.
- Añadir aseptícamente 50 mL de una solución de urea al 40% previamente esterilizada y mezclar bien. Distribuir en tubos estériles y permitir fijar en la posición inclinada.
- No sobrecalentar o recalentar el medio como la urea ya que se descompone con mucha facilidad.
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril. Etiquetar poniendo fecha de elaboración
- Para la siembra se utilizó una colonia de un cultivo puro del microorganismo y se lo estrió en la superficie del medio en pico de flauta.
- Se incubó a 37°C durante 18 a 24 horas y se observa los resultados.

Resultados:

El indicador de pH es rojo de fenol, el cual en alcalinidad vira a un color violeta indicando una prueba positiva. Si el color es amarillo indica una prueba negativa (Britanialab, 2021 pág. 2).

SIM

Medio SIM, se recomienda para la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno, formación de Indol y motilidad de los bacilos entéricos.

Preparación:

- Suspender 30 gramos en 1000 mL de agua destilada según la técnica del medio.
- Calentar hasta hervir para disolver el medio completamente.
- Dispensar en tubos. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Permita que los tubos se enfríen en posición vertical formando un pico de flauta.
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril. Etiquetar poniendo fecha de elaboración.
- Para la siembra tomar una colonia de un cultivo de 24 horas e insertar en el medio, incubar

por 12 a 24 horas a 37 °C para observar los resultados.

Resultados:

- El indol se puede detectar en un medio observando el desarrollo de un color rojo después de agregar el reactivo de Erlich o de Kovac's indicando una prueba Positiva. Si el color es amarillo indica una prueba Negativa.
- El SIM es un medio semisólido sin hidratos de carbono que inhiban la producción de H₂S y tiene tiosulfato de sodio fuente de azufre y hierro peptonado como indicador de H₂S, lo que lo hace más sensible en la detección de H₂S por producción de un precipitado negro de sulfuro ferroso.
- La movilidad bacteriana se interpreta realizando un cuidadoso examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación (Britanialab, 2021 pág. 2).

KLIGER

Es un medio para las pruebas bioquímicas de Enterobacterias y caracterizar su fermentación de la glucosa y la lactosa o la producción de ácido sulfhídrico.

Preparación:

- Suspender 52 gramos en 1000 mL de agua destilada.
- Calentar con agitación suave y hervir por un minuto para que se disuelva el medio completamente.
- Dispensar en tubos. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Permita que los tubos se enfríen en posición vertical formando un pico de flauta.
- Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y sobre funda estéril. Etiquetar poniendo fecha de elaboración.
- Para la siembra tomar una colonia de un cultivo puro de 24 horas e inocular el medio de cultivo, picando el fondo y extendiendo sobre la superficie del mismo, incubar por 18 a 48 horas a 37 °C para observar los resultados.
- Leer los tubos para la producción de ácido en el fondo y la superficie, así como la producción de gas y sulfuro de hidrógeno (MCDLAB, 2014 pág. 2).

ANEXO H: PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN MADRE

Solución Madre de amoxicilina

DATOS DEL ANTIBIÓTICO

Potencia: 99.50%	Almacenamiento: < 25°C
Solvente: H ₂ O	N° de análisis: CMP26232
código: A4	

Exactamente 28.7 mg de amoxicilina trihidratado estándar (equivalente a 25mg de Amoxicilina Base), para llegar a una concentración de 4mg/mL pesar exactamente 0.4592 g y lleve a un matraz volumétrico de 100mL, usar aproximadamente 10mL de solvente (agua), agite y caliente a baja temperatura si es necesario enfríe y lleve a volumen con el solvente, almacenar a -80 °C.

$$\begin{aligned} 28.7 \text{ mg} &= \frac{25 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.25 \text{ mg}}{\text{mL}} \\ 28.7 \text{ mg} &\longrightarrow 0.25 \text{ mg/mL} \\ X &\longrightarrow 4 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{28.7 \text{ mg} \times \frac{4 \text{ mg}}{\text{mL}}}{\frac{0.25 \text{ mg}}{\text{mL}}} = 459.2 \text{ mg} = \mathbf{0.4592 \text{ g}} \end{aligned}$$

Para la preparación de las diluciones, se elaboró una solución de trabajo con una concentración de 1mg/mL. para ello se tomó 2.50 mL de la solución madre y luego se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL llevar a volumen con el solvente, almacenar a -20 °C.

$$\begin{aligned} 4 \text{ mg} &\longrightarrow 1 \text{ mL} \\ 1 \text{ mg} &\longrightarrow X \\ &= \frac{1 \text{ mg} \times 1 \text{ mL}}{4 \text{ mg}} \times 10 \text{ mL} = \mathbf{2.50 \text{ mL}} \end{aligned}$$

A partir de la solución de trabajo se tomó alícuotas para preparar las diluciones a diferentes concentraciones, usando la siguiente manera:

Cf: 2 µg/mL

Vf: 10 mL

C1xV1= C2 xV2

$$V1 = \frac{C2 \times V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{2\mu\text{g/mL} \times 10\text{mL}}{1000 \mu\text{g/mL}}$$

$$V1 = 0.02\text{mL} \times 1000\mu\text{L} = 20\mu\text{L}$$

AMOXICILINA	
Alicuotas tomadas para ser aforadas en 10 mL en caldo TSB	Concentración final
20 μ L	2
40 μ L	4
80 μ L	8
160 μ L	16
320 μ L	32
640 μ L	64
1280 μ L	128
2560 μ L	256

Estos volúmenes fueron aforados en un matraz volumétrico de 10 mL con caldo TSB.

Solución madre de ciprofloxacina

DATOS DEL ANTIBIÓTICO

Potencia: 99.26%	Almacenamiento: < 25°C
Solvente: HCl	N° de análisis: CMP26232
código: C4	

Exactamente 46.6 mg de Ciprofloxacina clorhidrato estándar (equivalente a 40 mg de Ciprofloxacina Base), para llegar a una concentración de 4mg/mL pesar exactamente 0.466 g transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y agite, disuelva con 100 mL de ácido clorhídrico 0,01N y lleve a volumen con el mismo solvente, almacenar a -80 °C.

$$46.6 \text{ mg} = \frac{40 \text{ mg}}{100\text{mL}} = \frac{0.40 \text{ mg}}{\text{mL}}$$

$$46.6\text{mg} \longrightarrow 0.40\text{mg/mL}$$

$$X \longrightarrow 4 \text{ mg/mL}$$

$$= \frac{46.6\text{mg} \times \frac{4\text{mg}}{\text{mL}}}{\frac{0.40\text{mg}}{\text{mL}}} = 466 \text{ mg} = \mathbf{0.466g}$$

Para la preparación de las diluciones, se elaboró una solución de trabajo con una concentración de 1mg/mL. para ello se tomó 2.50 mL de la solución madre y luego se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL llevar a volumen con el solvente, almacenar a -20 °C.

$$\begin{array}{l}
 4\text{mg} \longrightarrow 1\text{mL} \\
 1\text{mg} \longrightarrow X \\
 = \frac{1\text{mg} \times 1\text{mL}}{4\text{mg}} \times 10 \text{ mL} = \mathbf{2.50 \text{ mL}}
 \end{array}$$

A partir de la solución de trabajo se tomó alícuotas para preparar las diluciones a diferentes concentraciones, usando la siguiente manera:

Cf: 0.50µg/mL

Vf:10 mL

$C1 \times V1 = C2 \times V2$

$$\begin{aligned}
 V1 &= \frac{C2 \times V2}{C1} \\
 V1 &= \frac{0.50\mu\text{g/mL} \times 10\text{mL}}{1000 \mu\text{g/mL}} \\
 V1 &= 0.005 \text{ mL} \times 1000\mu\text{L} = 20\mu\text{L}
 \end{aligned}$$

CIPROFLOXACINA	
Alícuotas tomadas para ser aforadas en 10 mL en caldo TSB	Concentración final
5µL	0.50
10µL	1
20µL	2
40µL	4
80µL	8
160µL	16
320µL	32
640µL	64

Estos volúmenes fueron aforados en un matraz volumétrico de 10 mL con caldo TSB.

Solución de madre de la tetraciclina

DATOS DEL ANTIBIÓTICO

Potencia: 99.50%	Almacenamiento: < 25°C
Solvente: H ₂ O	N° de análisis: CMP26232
código: T4	

Exactamente 43.6 mg de tetraciclina clorhidrato estándar (equivalente a 40mg de tetraciclina Base), para llegar a una concentración de 4mg/mL pesar exactamente 0.466 g transferir a un matraz volumétrico de 100 mL y agite, disuelva con 100 mL de ácido clorhídrico 0,01N y lleve a volumen con el mismo solvente, almacenar a -80 °C.

$$\begin{aligned} 43.6 \text{ mg} &= \frac{40 \text{ mg}}{100 \text{ mL}} = \frac{0.40 \text{ mg}}{\text{mL}} \\ 43.6 \text{ mg} &\longrightarrow 0.40 \text{ mg/mL} \\ X &\longrightarrow 4 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{43.6 \text{ mg} \times \frac{4 \text{ mg}}{\text{mL}}}{\frac{0.40 \text{ mg}}{\text{mL}}} = 436 \text{ mg} = \mathbf{0.436 \text{ g}} \end{aligned}$$

Para la preparación de las diluciones, se elaboró una solución de trabajo con una concentración de 1mg/mL. para ello se tomó 2.50 mL de la solución madre y luego se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL llevar a volumen con el solvente, almacenar a -20 °C.

$$\begin{aligned} 4 \text{ mg} &\longrightarrow 1 \text{ mL} \\ 1 \text{ mg} &\longrightarrow X \\ &= \frac{1 \text{ mg} \times 1 \text{ mL}}{4 \text{ mg}} \times 10 \text{ mL} = \mathbf{2.50 \text{ mL}} \end{aligned}$$

Se la solución de trabajo se tomó una alícuota para preparar la dilución a concentración alta:

Cf: 128 µg/mL

Vf: 10 mL

C1xV1= C2 xV2

$$\begin{aligned} V1 &= \frac{C2 \times V2}{C1} \\ V1 &= \frac{128 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL}}{1000 \mu\text{g/mL}} \\ V1 &= 1.28 \text{ mL} \times 1000 \mu\text{L} = \mathbf{1280 \mu\text{L}} \end{aligned}$$

Este volumen fue aforado en un matraz volumétrico de 10 mL con caldo TSB.

ANEXO I: DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS

Microdilución en caldo de amoxicilina (antibiótico A) de forma individualizada

N°	1		2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Columnas microplacas															
Muestras	Blanco			1		2	3	4	5	6	7	8		Control	
Concentración Diluciones (µg/mL)	A:256	5µL suspensión bacteriana	200 µL caldo TSB	5µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de antibiótico A									5µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de tetraciclina (128 µg/mL)
	B:128														
	C:64														
	D:32														
	E:16														
	F:8														
	G:4														
	H:2														

Observaciones:

- Se utilizaron 8 diluciones del antibiótico, desde la concentración de pocillo 2 µg/mL hasta 256 µg/mL.
- En la columna 1 se encuentra el blanco utilizado como control del medio (TSB).
- La columna 12 fue utilizada como control del medio donde se encuentra tetraciclina a altas concentraciones más suspensión bacteriana.

Microdilución en caldo de ciprofloxacina (antibiótico B) de forma individualizada

N°	1		2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Columnas microplacas																	
Muestras	Blanco			1		2	3	4	5	6	7	8		Control			
Concentración Diluciones (μg/mL)	A:64	5μL suspensión bacteriana	200 μL caldo TSB		5μL suspensión bacteriana	200 μL dilución de antibiótico B										5μL suspensión bacteriana	200 μL dilución de tetraciclina (128 μg/mL)
	B:32																
	C:16																
	D:8																
	E:4																
	F:2																
	G:1																
	H:0.50																

Observaciones:

- Se utilizaron 8 diluciones del antibiótico, desde la concentración de pocillo 0.50 μg/mL hasta 64 μg/mL.
- En la columna 1 se encuentra el blanco utilizado como control del medio (TSB).
- La columna 12 fue utilizada como control del medio donde se encuentra tetraciclina a altas concentraciones más suspensión bacteriana.

ANEXO J: DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS DE LA COMBINACIÓN DE AMOXICILINA Y CIPROFLOXACINA

N° Columnas microplacas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12		
B [] CIPROFLOXACINA (µg/mL)	A:32	BLANCO	5µL suspensión bacteriana y 200 µL de caldo TSB									5µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de tetraciclina (128µg/mL)	
	B:16													
	C:8													
	D:4													
	E:2													
	F:1													
	G:0,50													
	H: 0													
	X				0	2	4	8	16	32	64	128		
		A [] AMOXICILINA (µg/mL)												

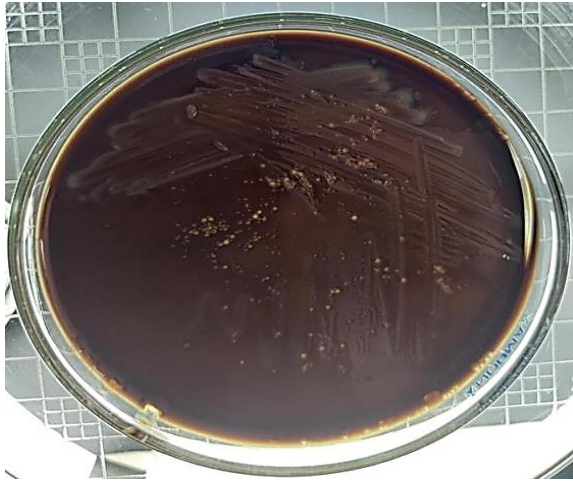
En cada pocillo agregar 5µL de la suspensión bacteriana con OD_{600nm}: 0.05 y 100 µL dilución amoxicilina más 100 µL de la dilución de ciprofloxacina de acuerdo con las concentraciones establecidas en la tabla.

Observaciones:

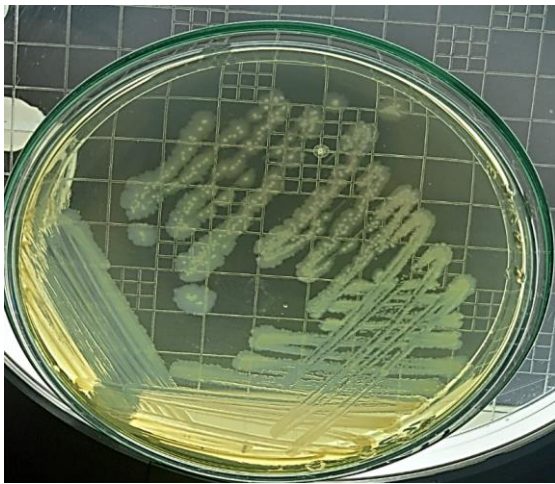
- Se utilizaron 7 diluciones para cada antibiótico, amoxicilina desde la concentración del pocillo 2 µg/mL hasta 128 µg/mL.
- Para ciprofloxacina las concentraciones fueron desde 0.50 µg/mL hasta 32 µg/mL.
- En la columna 1 se encuentra el blanco utilizado como control del medio (TSB).
- La columna 12 fue utilizada como control del medio donde se encuentra tetraciclina a altas concentraciones más suspensión bacteriana.

ANEXO K: ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Fotografía de las colonias de *P. aeruginosa* en Agar sangre

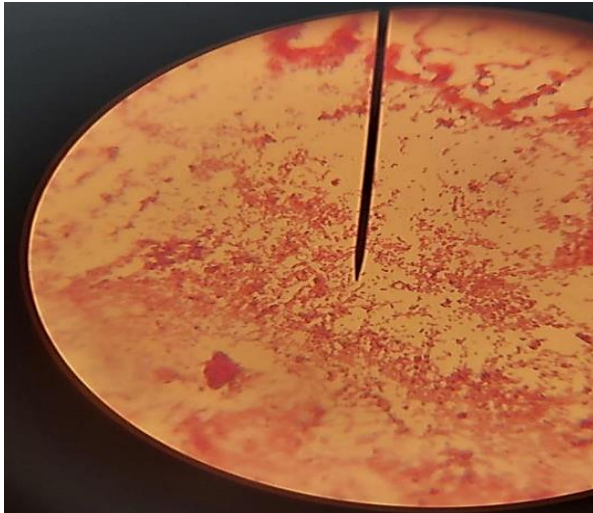


Fotografía de las colonias de *P. aeruginosa* en Agar TSA



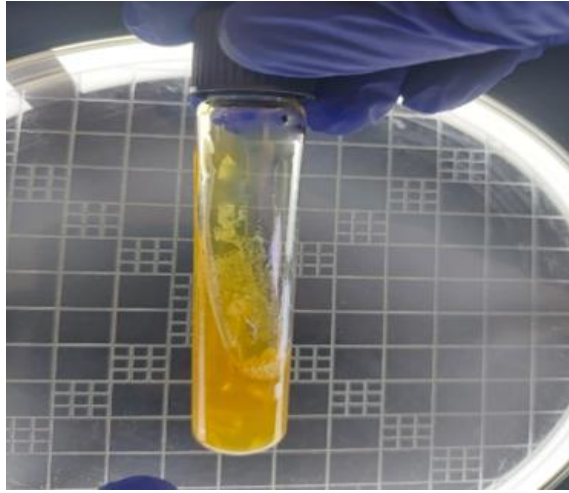
ANEXO L: TINCIÓN GRAM

Fotografía de *P. aeruginosa* con tinción Gram en el microscopio, se observa con forma de bacilo y tiene una coloración rosácea.

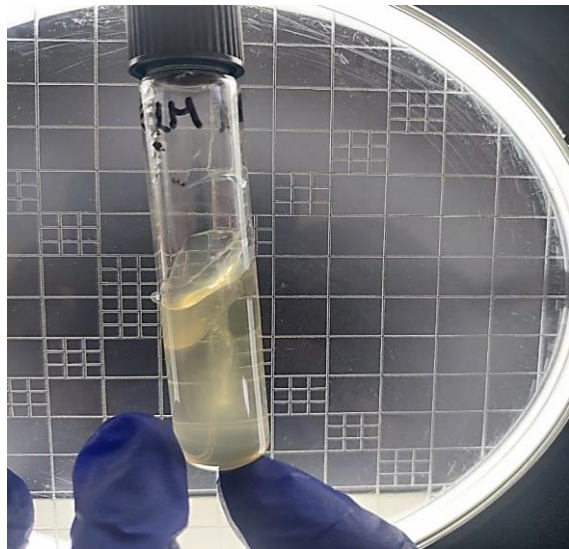


ANEXO M: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

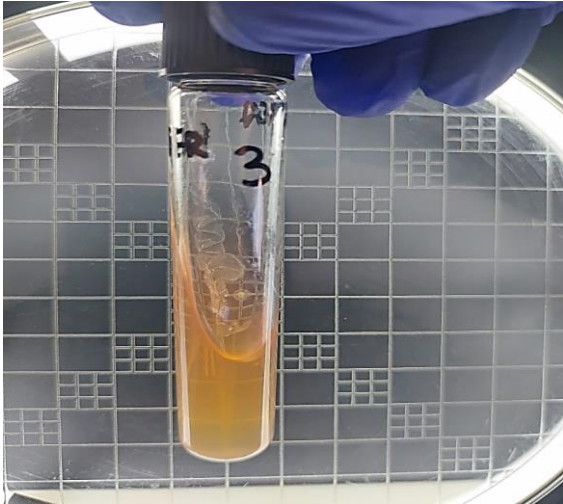
UREA: negativo no tuvo ninguna reacción ni cambio de coloración del medio.



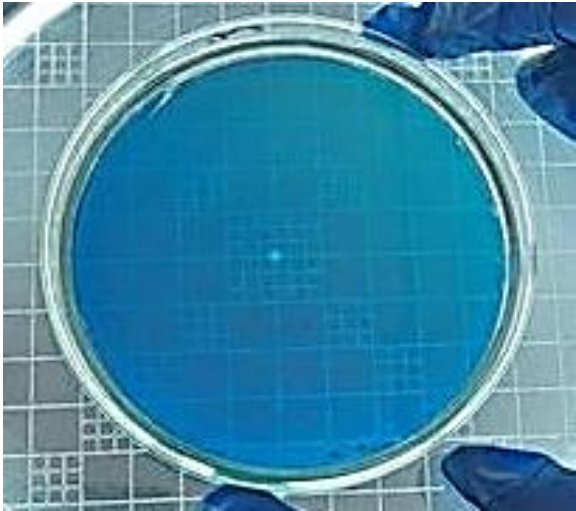
SIM:



KLIGER:

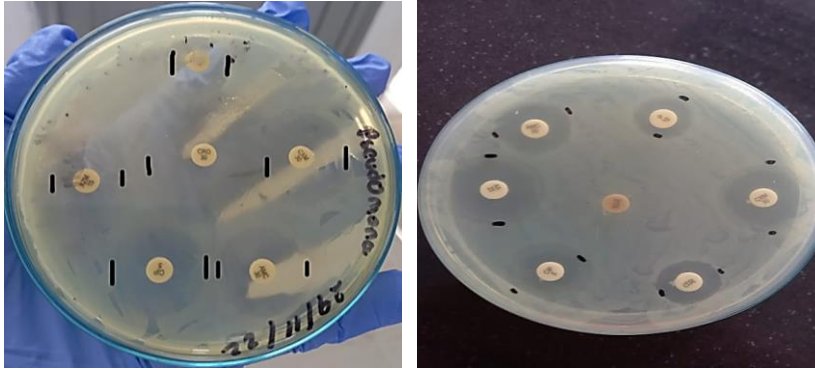


SIMMONS CITRATO:



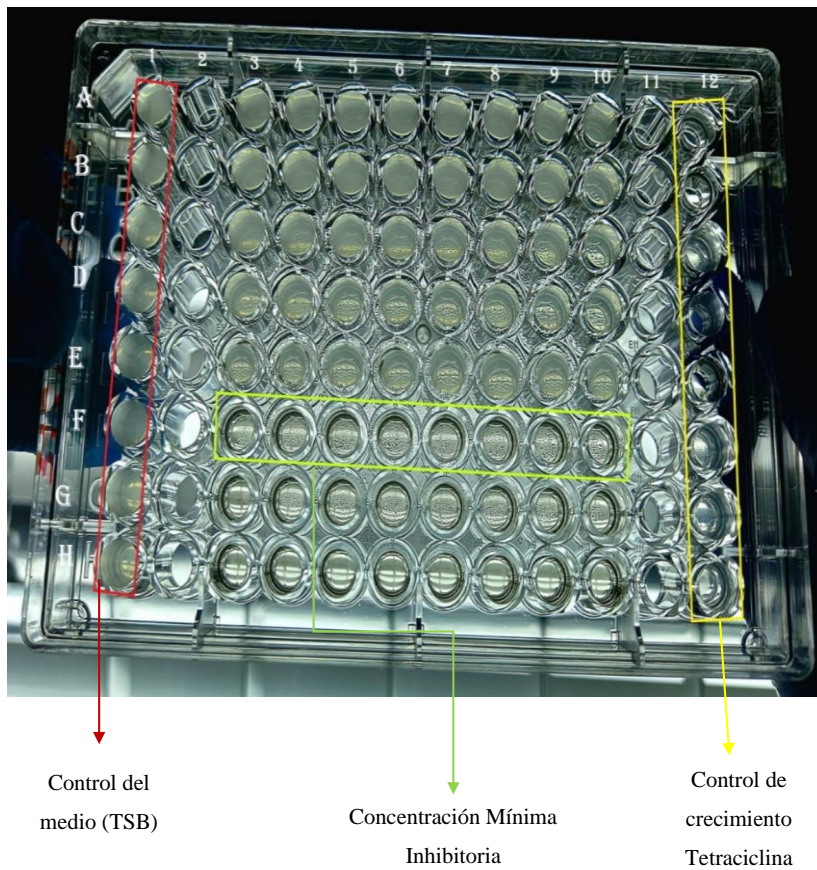
ANEXO N: ANTIBIOGRAMA

En la siguiente fotografía se evidencia los halos de inhibición de la bacteria frente a discos de antibióticos.



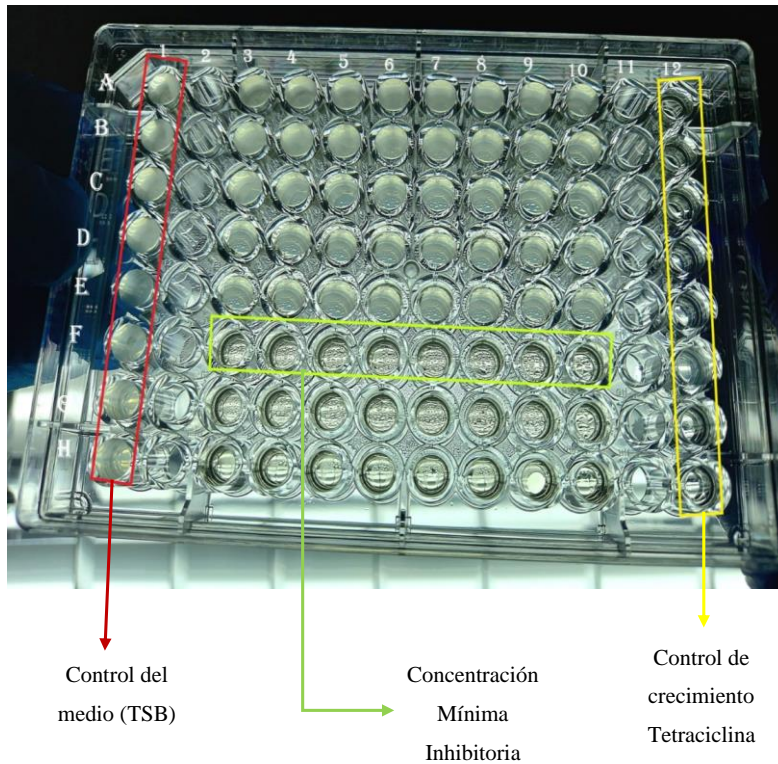
ANEXO O: CMI DE AMOXICILINA

Fotografía de los micropocillos del método de microdilución en caldo con Amoxicilina. En la siguiente fotografía, se observa una microplaca del método de dilución en caldo de amoxicilina. Cada microplaca se distribuyó de la siguiente manera: las filas de la A a la H corresponden a las diluciones realizadas en forma descendente $2\mu\text{g/mL}$ a $256\mu\text{g/mL}$, la columna uno se encuentra el control del medio y la columna 12 se encuentra en control con tetraciclina, de la columna 3 a la 10 se encuentra las columnas con antibiótico y suspensión bacteriana teniendo como resultado mediante observación directa del crecimiento bacteriano, la CMI fue de $64\mu\text{g/mL}$.



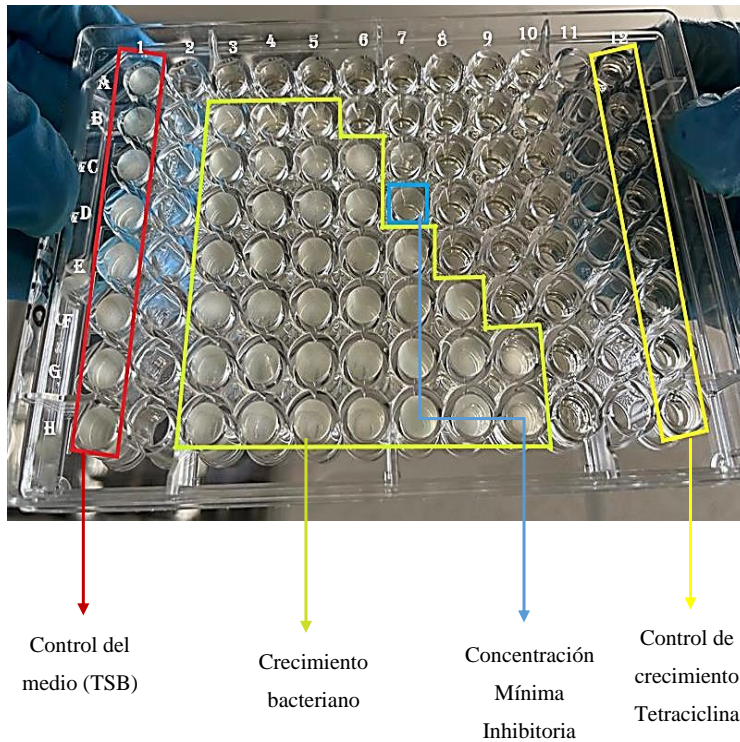
ANEXO P: CMI DE CIPROFLOXACINA

Fotografía de los micropocillos del método de microdilución en caldo con Ciprofloxacina. En la siguiente fotografía, se observa una microplaca del método de dilución en caldo de ciprofloxacina. Cada microplaca se distribuyó de la siguiente manera: las filas de la A a la H corresponden a las diluciones realizadas en forma descendente 0.50 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$, la columna uno se encuentra el control del medio y la columna 12 se encuentra en control con tetraciclina, de la columna 3 a la 10 se encuentra las columnas con antibiótico y suspensión bacteriana teniendo como resultado mediante observación directa del crecimiento bacteriano, la CMI fue de 16 $\mu\text{g/mL}$.



ANEXO Q: RESULTADOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS (A/B)

Fotografía de la observación del efecto sinérgico de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina por el método de microdilución en caldo mediante el ensayo tablero de ajedrez. Cada microplaca se distribuyó de la siguiente manera: las filas de la H a la A corresponden a las diluciones de amoxicilina realizadas en forma ascendente $0\mu\text{g/mL}$ a $128\mu\text{g/mL}$, la columna uno se encuentra el control del medio y la columna 12 se encuentra en control con tetraciclina, de la columna 3 a la 10 se encuentra las columnas con las diluciones de ciprofloxacina que van de $0\mu\text{g/mL}$ a $32\mu\text{g/mL}$, a cada micropocillos de estas columnas de les añadió antibiótico A y B de acuerdo a las concentraciones más suspensión teniendo como resultado y suspensión bacteriana mediante observación directa del crecimiento bacteriano solo en algunos micropocillos.





esPOCH

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 18 / 07 / 2023

Comentado [RISH1]: Esta es una fecha aproximada de cuando se va entregar el documento impreso, puede ser antes o después.

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Jesenia Lizbeth Imbaquingo Pijal
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

1052-DBRA-UPT-2023