



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA BIQUÍMICA Y FARMACIA

**ESTUDIO DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE
AMOXICILINA Y CIPROFLOXACINA FRENTE A *Klebsiella
pneumoniae* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTORA: NORMA VALERIA VALLIN GUERRERO

DIRECTORA: BQF. AIDA ADRIANA MIRANDA BARROS MSc.

Riobamba–Ecuador

2023

© 2023, Norma Valeria Vallin Guerrero

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, Norma Valeria Vallin Guerrero, 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, 23 de junio 2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'N. Vallin Guerrero', written over a horizontal line.

Norma Valeria Vallin Guerrero
1850467869

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 *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS BETALACTÁMICOS**, realizado por la señorita: **NORMA VALERIA VALLIN GUERRERO**, 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. Janeth María Gallegos Núñez PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 _____	2023-06-23
BQF. Aida Adriana Miranda Barros MSc. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 _____	2023-06-23
Dr. Igor Eduardo Astudillo Skliarova PhD. ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 _____	2023-06-23

DEDICATORIA

A mi querido Dios por darme la fortaleza, inteligencia y sabiduría de terminar una meta, un sueño anhelado de ser profesional. A mis padres Iván y Miriam por apoyarme con mis estudios, especialmente a mi madre le debo todo por su inmenso amor y no me alcanzara la vida para agradecerle todo el sacrificio que ha hecho por mí, de igual forma agradezco a mis hermanos, sobrino y familia por estar siempre ayudándome cuando más lo necesitaba.

Valeria

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y la Escuela de Bioquímica y Farmacia por abrirme las puertas de estudiar en una institución prestigiosa y sobre todo por brindarme los conocimientos necesarios para defenderme como una profesional de calidad. Mi más sincero agradecimiento a la BQF. Aida Miranda Barros por formar parte de mi trabajo experimental, gracias por el apoyo, paciencia, consejos y dirección en mi proyecto. Y PhD. Igor Astudillo por ayudarme y estar presente durante el proceso de desarrollo de mi investigación y a cada docente que compartió sus conocimientos conmigo a lo largo de toda la carrera.

Valeria

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Justificación.....	4
1.3. Objetivos.....	6
1.3.1. <i>Objetivo general</i>	6
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i>	6

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Referencias teóricas.....	7
2.1.1. <i>Escuela Superior Politécnica de Chimborazo</i>	7
2.1.2. <i>Antibióticos</i>	7
2.1.2.1. <i>Clasificación de antibióticos</i>	8
2.1.2.2. <i>Amoxicilina</i>	8
2.1.2.3. <i>Cirpofloxacina</i>	9
2.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	9
2.1.3.1. <i>Patogenicidad</i>	10
2.1.3.2. <i>Mecanismo de resistencia a antibióticos</i>	11
2.1.3.3. <i>Métodos para tratar K. pneumoniae</i>	13
2.1.4. <i>Concentración mínima inhibitoria</i>	14
2.1.5. <i>Medios de cultivo</i>	14
2.1.5.1. <i>Agar triptona soja</i>	15
2.1.5.2. <i>Caldo TSB</i>	15

2.1.6. <i>Sinergia</i>	15
2.1.6.1. <i>Combinación de antibióticos</i>	15
2.1.6.2. <i>Ventajas de la combinación de antibióticos</i>	15
2.1.6.3. <i>Desventajas de la combinación de antibióticos</i>	16

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO	17
3.1. Lugar de la investigación	17
3.2. Normas de la investigación	17
3.3. Enfoque de la investigación	17
3.4. Alcance de la investigación	17
3.5. Diseño de la investigación	17
3.6. Tipo de la investigación	18
3.7. Métodos, técnicas e instrumentos de la investigación	18
3.7.1. <i>Población de estudio</i>	18
3.7.2. <i>Muestra de análisis</i>	18
3.7.3. <i>Materiales, equipos y reactivos</i>	18
3.7.3.1. <i>Materiales</i>	18
3.7.3.2. <i>Equipos</i>	19
3.7.3.3. <i>Reactivos</i>	20
3.7.4. <i>Descripción de procesos</i>	20
3.7.4.1. <i>Obtención de la cepa de K. pneumoniae</i>	20
3.7.4.2. <i>Obtención de los antibióticos</i>	20
3.7.4.3. <i>Reactivación de la bacteria</i>	20
3.7.5. <i>Comprobación de la resistencia a los betalactámicos</i>	22
3.7.6. <i>Realización de pruebas bioquímicas para identificar K. pneumoniae</i>	23
3.7.6.1. <i>Pruebas microscópicas-tinción gram</i>	24
3.7.7. <i>Obtención de la stock de los antibióticos</i>	24
3.7.8. <i>Preparación del cultivo nocturno a partir de una colonia de K. pneumoniae</i>	25
3.7.9. <i>Medición de la densidad óptica</i>	25
3.7.10. <i>Determinación de la CMI de los diferentes antibióticos de forma individualizada</i>	26
3.7.11. <i>Determinación de la CMI de forma combinada con los antibióticos</i>	27
3.7.12. <i>Análisis de resultados</i>	27
3.7.13. <i>Proceso llevado a cabo en la investigación</i>	28

CAPÍTULO IV

4.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	29
4.1.	Reactivación y confirmación de la identidad de la cepa bacteriana.....	29
4.1.1.	<i>Análisis de las pruebas bioquímicas y microscópicas.....</i>	<i>29</i>
4.2.	Antibiograma.....	30
4.3.	Determinación de la CMI individual de amoxicilina y ciprofloxacina.....	33
4.4.	Determinación de la sinergia in vitro de la combinación de antibióticos.....	33
4.4.1.	<i>Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccionaria.....</i>	<i>33</i>
	CONCLUSIONES.....	37
	RECOMENDACIONES.....	38
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3:	Materiales utilizados en los distintos procedimientos	18
Tabla 2-3:	División de los micropocillos para las diluciones del antibiótico	26
Tabla 1-4:	Resultados de pruebas bioquímicas y microscópicas de <i>K. pneumoniae</i>	29
Tabla 2-4:	Resultados del antibiograma de <i>K. pneumoniae</i>	30
Tabla 3-4:	Determinación de la CMI de la Amoxicilina frente a <i>K. pneumoniae</i>	31
Tabla 4-4:	Determinación de la CMI de la ciprofloxacina frente a <i>K. pneumoniae</i>	32
Tabla 5-4:	Determinación de la CMI de la combinación de amixocilina y ciprofloxacina	33
Tabla 6-4:	Resultados del experimento de sinergia por el método de tablero de ajedrez	35

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Mapa de la ESPOCH	7
Ilustración 2-2:	Mecanismo de acción de los antibióticos.....	8
Ilustración 1-3:	Reactivación de la bacteria	21
Ilustración 2-3:	Comprobación de resistencia a betalactámicos	23
Ilustración 3-3:	Flujograma de métodos y técnicas usados en cada fase de la investigación.	28

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

ANEXO B: ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

ANEXO C: ANTIBIOGRAMA

ANEXO D: CMI INDIVIDUAL DE AMOXICILINA

ANEXO E: CMI INDIVIDUAL DE CIPROFLOXACINA

ANEXO F: CMI COMBINADA ENTRE AMOXICILINA Y CIRPOFLOXACINA

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CMI	Concentración mínima inhibitoria
KCP	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
UCI	Unidad de cuidados intensivos

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo estudiar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos betalactámicos. El tipo de investigación fue experimental con enfoque cuali-cuantitativo y se desarrolló en tres etapas: se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos betalactámicos, se comparó la eficacia de la sinergia de los antibióticos combinados con la concentración de los antibióticos de forma individualizada y se comprobó la efectividad de la combinación entre amoxicilina y ciprofloxacina con un antibiótico de última línea de uso como tetraciclina. Como resultados se obtuvo que, al evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos fue de 64 µg/mL en amoxicilina y de 32 µg/mL para la ciprofloxacina y con el objetivo de evaluar la sinergia de la combinación de los antimicrobianos se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional (FIC) que al ser de 0,5, comprobó la sinergia entre los antibióticos. Al comparar la eficacia contra *Klebsiella pneumoniae*, se determinó que, la CMI de la tetraciclina fue de 128µg/mL y la combinación de antibióticos dio como resultado una reducción de la CMI a 16 µg/mL para amoxicilina y 8 µg/mL para ciprofloxacina. Se concluyó que, hubo un efecto sinérgico al combinar amoxicilina y ciprofloxacina, ya que se potenció el efecto contra la bacteria *Klebsiella pneumoniae* resistente a betalactámicos, que es una de las principales bacterias causantes de infecciones en los individuos. Se recomienda evaluar el efecto sinérgico in vitro de más combinaciones de antibióticos como propuesta para el tratamiento de infecciones bacterianas con etiología resistente o multiresistente en ambientes hospitalarios y comunitarios.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <ANTIBIÓTICOS>, <AMOXICILINA>, <CIPROFLOXACINA>, <SINERGISMO>, <*Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE A BETALACTÁMICOS>.

1342-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The objective of this research was to study the synergistic effect of the combination of amoxicillin and ciprofloxacin against *Klebsiella pneumoniae* resistant to beta-lactam antibiotics: the minimum inhibitory concentration (MIC) of the combination of amoxicillin and ciprofloxacin was determined against a strain of *Klebsiella pneumoniae* resistant to beta-lactam antibiotics, the efficacy of the synergy of the combined antibiotics was compared with the concentration of the antibiotics individually, and the effectiveness of the combination of amoxicillin and ciprofloxacin with a last-line antibiotic such as tetracycline was tested. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics was 64 µg/mL for amoxicillin and 32 µg/mL for ciprofloxacin. In order to evaluate the synergy of the combination of the antimicrobials, the fractional inhibitory concentration (FIC) index was calculated, which was 0.5, proving the synergy between the antibiotics. When comparing the efficacy against *Klebsiella pneumoniae*, it was determined that the MIC of tetracycline was 128 µg/mL and the combination of antibiotics resulted in a reduction of the MIC to 16 µg/mL for amoxicillin and ciprofloxacin, since the effect against beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae*, which is one of the main bacteria causing infections in individuals, was potentiated. It is recommended to evaluate the in vitro synergistic effect of more antibiotic combinations as a proposal for the treatment of bacterial infections with resistant or multi-resistant etiology in hospital and community environments.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <ANTIBIOTICS>, <AMOXICILLIN>, <CIPROFLOXACIN>, <SYNERGISM>, <BETA-LACTAM RESISTANT *Klebsiella pneumoniae*>.



Edgar Mesias Jaramillo Moyano
0603497397

INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno natural debido a la evolución constante de las cepas bacterianas, sin embargo, el uso indiscriminado de antibióticos por parte del ser humano ha acelerado este proceso convirtiéndolo en una de las mayores amenazas para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo mundial (OMS, 2020, p.1).

La Organización Mundial de la Salud advierte que las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos pueden provocar enfermedades graves, aumento de la mortalidad y un mayor riesgo de complicaciones predominantemente en entornos hospitalarios. Los microorganismos más frecuentemente aislados de pacientes con infecciones intrahospitalarias son principalmente bacterias Gram negativas, cuyo arsenal de mecanismos de resistencia puede llevar a falla terapéutica (Tamma et al., 2012, pp. 450-455).

Tamma y colaboradores describen que la aparición y proliferación de estos organismos gram-negativos altamente resistentes son particularmente preocupantes dada la cantidad limitada de agentes antimicrobianos que están actualmente disponibles o en las líneas de desarrollo de fármacos de la industria farmacéutica para combatir estos organismos (2012, pp. 450-455).

En particular, se ha observado en la práctica clínica, resistencia y susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae*, un patógeno gram-negativo al que se le atribuyen la mayoría de las infecciones nosocomiales pulmonares, del tracto urinario, de tejidos blandos y sepsis, y cuya resistencia esta mediada por la pérdida o modificación de porinas, lo cual lleva a la disminución de la permeabilidad de la membrana externa bacteriana y por la producción de las enzimas: β -lactamasas de espectro extendido y carbapenemasas cuyo mecanismo consiste en hidrolizar a un grupo específico de antibióticos: los betalactámicos, un grupo antibiótico reconocido como potentes bactericidas, además de ser los más prescritos en todo el mundo (Wei et al., 2018, pp. 1 – 8).

Una de las estrategias para el tratamiento contra *Klebsiella pneumoniae* es el uso de quinolonas como el ciprofloxacino, una fluoroquinolona de segunda generación cuyo amplio espectro ha sido aprovechado contra infecciones causadas por gérmenes gramnegativos, sin embargo, en los último 10 años, los casos de bacteriemia por *K. pneumoniae* resistente a ciprofloxacino han aumentado (Alduenda, 2018, pp. 89-105).

Así mismo, para el tratamiento de infecciones del tracto urinario causadas por *Klebsiella pneumoniae*, uno de los antibióticos de elección es la amoxicilina, una penicilina perteneciente

al grupo de los betalactámicos y cuya resistencia es bien conocida (Echevarría et al., 2006, pp. 26 – 27).

Está claro que los antibióticos utilizados como monoterapia ya no son efectivos, y la evidencia actual sugiere que la terapia combinada puede ser posible, ya que estamos presenciando un aumento en las infecciones causadas por organismos Gram-negativos resistentes a múltiples fármacos (Tamma et al., 2012, pp. 450-455).

Un beneficio potencial de agregar un segundo agente antimicrobiano es el efecto sinérgico de la combinación. Esta sinergia entre dos agentes antimicrobianos potencia la actividad bactericida *in vitro* en comparación con la actividad bactericida de cada agente por sí solo (Tamma et al., 2012, pp. 450-455).

Para la evaluación de esta sinergia, se han desarrollado ciertos métodos, una de ellas es el ensayo de placa de microtitulación de tablero de ajedrez, utilizado para probar las actividades (*in vitro*) de las mezclas binarias de antimicrobianos mediante la determinación de los índice de concentración inhibitoria fraccional de todas las combinaciones probadas (Orhan, 2005, pp. 140-143).

Los estudios que evalúan el efecto sinérgico de los antibióticos son poco comunes en Ecuador, y con el creciente problema de la resistencia bacteriana, existe la necesidad de estudiar la efectividad de las combinaciones de antibióticos como alternativa a la terapia actual, por tal motivo es de interés académico realizar este tipo de investigaciones.

Como miembros de la academia y futuros profesionales bioquímicos farmacéuticos inmiscuidos en el campo científico de la salud, nuestro compromiso es aportar con soluciones al evidente problema de la resistencia bacteriana causada por patógenos farmacorresistentes como *Klebsiella pneumoniae*, por lo que se considera la evaluación de la sinergia de antibióticos como estrategia.

En ese contexto, el objetivo del presenta trabajo investigativo es evaluar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *Klebsiella pneumoniae*, para lo que se determinará las concentraciones inhibitorias mínimas de ambos agentes antimicrobianos en combinación y cada uno individualmente utilizando el método tablero de ajedrez. Además, se pretende comprobar la efectividad de la combinación entre amoxicilina y ciprofloxacina con un antibiótico de última línea de uso como tetraciclina.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La resistencia bacteriana ha aumentado progresivamente en los últimos años, día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las infecciosas bacterianas, y como consecuencia los antibióticos van perdiendo su eficacia, convirtiéndose en un problema de salud a nivel mundial (Guevara y Páez 2021, p.12).

Las infecciones más graves que amenazan la vida del ser humano son causadas por un grupo de bacterias patógenas, en donde destaca el grupo ESKAPE denominadas así por su capacidad de escapar a la actividad antimicrobiana de los antibióticos; este grupo está conformado por: *E.faecium*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, y *Enterobacter spp.* (MSP, 2019)

La Organización Mundial de la salud (OMS) publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a múltiples antibióticos, en el que cataloga a la *Klebsiella pneumoniae* como patógeno de prioridad crítica debido a su posibilidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos y su capacidad de desarrollar infecciones nosocomiales graves ocasionando un problema de salud en todo el mundo. (OMS, 2017).

Según la (OMS) *K. pneumoniae* es una de las bacterias multirresistentes a antibióticos de primera línea. Además, representa cerca de un tercio de todas las infecciones causadas por bacterias Gram negativas. *K. pneumoniae* es causante de infecciones del tracto urinario, cistitis, infecciones de tejido blando, neumonía, infecciones de heridas quirúrgicas y septicemia, entre otros (Flores, 2021).

Se ha identificado que *K. pneumoniae* genera resistencia principalmente a los antibióticos betalactámicos, debido a la producción de betalactamasa. Lo que, aumentado la incidencia de cepas multirresistentes y extremadamente resistentes a antibióticos, ocasionando un fuerte impacto económico y elevando la tasa de morbi-mortalidad; lo que podría conllevar a extender el período de hospitalización incluso la muerte (Matsuoka 2020, p.1).

Con relación a mortalidad, en Ecuador un estudio titulado “Factores de riesgo predictores enterobacterias productoras de mortalidad por infección carbapenemasas marca una tasa de

mortalidad del 46%. En Estados Unidos se evidencia un mayor riesgo en las personas alcohólicas ya que constituyen el 66% de la población afectada por la enfermedad y en personas que presentan bacteriemia tienen una tasa de afectación hasta del 5% (Alvarado, 2020).

En los últimos años, se evidencia el incremento de reportes de *K. pneumoniae* con sensibilidad 20% disminuida a la colistina, debido a las modificaciones en la membrana celular que afecta a nivel del lipopolisacárido o por alteración iónica, por las mutaciones en los genes cromosomales y en los genes de resistencia móviles transmisibles a través de plásmido (*mcr*), ocasiona mayor resistencia a este antibiótico (Matsuoka 2020, p.1).

Se estiman que dentro de 20 años las bacterias que generen resistencia a antibióticos serán causantes aproximadamente 10 millones de muertes por año en el mundo. Por ello se necesita de manera urgente la búsqueda de nuevas alternativas más eficaces, menos costosas, que no demanden mucho tiempo de desarrollo y que generen menos efectos adversos, ayudando a mejorar la calidad de vida de los pacientes (Kon, 2021).

1.2. Justificación

K. pneumoniae es un patógeno que puede provocar infecciones potencialmente mortales, tanto en el sector hospitalario como en la comunidad, causando sobre todo infecciones del tracto respiratorio y del tracto urinario. Normalmente se encuentra de forma ubicua en el medio ambiente, como el suelo, agua y mucosas del ser humano, incluso llega a colonizar en los dispositivos médicos, debido a que crece a temperaturas óptimas de 30 a 37 °C (Guevara y Maldonado 2020, p.1).

La OMS designa a la *K. pneumoniae* como un patógeno de relevancia clínica de investigación por presentar alta resistencia a muchos antibióticos, principalmente a los betalactámicos. Un reporte del European Surveillance of Antimicrobial Consumption Network del 2014 reveló un incremento de resistencia a las cefalosporinas, entre el 2010 y 2013 se evidenció co-resistencia a fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Guevara y Páez, 2021, p.10).

En Ecuador de acuerdo con los datos estadístico del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública, se evidencian porcentajes similares de resistencia a cefotaxima y ceftriaxona de 60%-80%, tanto para pacientes internados como personas de UCI. Los aislados de cepas *K.pneumoniae* del 2014 hasta 2017 presentan ya porcentajes de resistencia para carbapenémicos como imipenem del 20-35% y meropenem del 40-55% (MSP, 2019).

Un estudio realizado en el Hospital segundo nivel Hesburgh en Santo Domingo de los Colorados, se evidencio que *K. pneumoniae* presenta altos niveles de resistencia a tetraciclina (60.0%) y trimetoprim-sulfametoxazol (55.6%), gentamicina (47.6%), ácido nalidíxico (22.2%), y ciprofloxacina (22.7%), Meropenem (10 %) (Ross 2020, p.1).

Así mismo otros estudios realizados que fueron conducidos en Japón y Malasia tienen una incidencia del 15% al 40% que afecta adultos mayores, además este organismo es un agente importante que causa infecciones nosocomiales en adultos y adultos mayores, constituye aproximadamente el 8 % de infecciones adquiridas en hospitales. En Estados Unidos es uno de los ocho patógenos más importantes en los hospitales (Alvarado, 2020).

K. pneumoniae causa procesos necrotizantes que afectan principalmente a personas inmunodeprimidas, en ciertos casos la tasa de mortalidad puede llegar al 50 %, incluso recibiendo un tratamiento con antibióticos. Afecta principalmente a personas que padecen de alcoholismo a la población adulta inmunodeprimidos (González M. , 2016).

Sin embargo, se ha visto aislamientos de cepas multirresistentes a antibióticos incluyendo la colistina de última línea de tratamiento, ya que en la actualidad existen escasos antibióticos en desarrollo por parte de la industria farmacéutica, por ello se ha considerado diferentes estrategias terapéuticas innovativas tales como: fago terapia y la combinación de antibióticos con la esperanza de lograr efectos sinérgicos (Nakonieczna et al. 2019, p.10).

Es viable la realización del presente trabajo ya que la técnica es relativamente sencilla, se desarrolla con conocimientos básicos de microbiología, además esto no requiere de equipos sofisticados y de alta tecnología, se lo puede realizar en el laboratorio de la institución ESPOCH con materiales de fácil acceso y adquisición; se obtienen resultados a corto plazo, el tiempo de generación de *K. pneumoniae* es corto y puede crecer en medios de cultivo rutinarios como Agar tríptico de soja (TSA) (Alvarado, 2020)

Este trabajo va dirigido a toda la población que puede contraer ciertos tipos de infecciones causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes a antibióticos usados como tratamientos de primera línea. Generalmente aquellos pacientes inmunodeprimidos entre los cuales se encuentran: adultos mayores, pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, consumidores de alcohol, neonatos, pacientes que padecen neumonía, sepsis y la población que sufre de infecciones del tracto urinario, entre otros, los cuales hacen que este tipo de infecciones se conviertan en un problema de salud a gran escala debido a la ineficacia de la mayoría de antibióticos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos betalactámicos.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a antibióticos betalactámicos.
- 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 última línea de uso como tetraciclina.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Referencias teóricas

2.1.1. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*

La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH) es una institución ecuatoriana pública de educación superior, tiene su origen en el Instituto tecnológico Superior de Chimborazo, se fundó el 18 de Abril en el año 1969, se encuentra ubicada en la provincia de Chimborazo cantón Riobamba en la Panamericana Sur Km 1 1/2, cuenta con 7 facultades y 29 carreras aprobadas, además hay otra extensión en la sede de la provincia de Morona Santiago en la ciudad de Macas.



Ilustración 1-2: Mapa de la ESPOCH

Fuente: Google Maps, 2023

2.1.2. *Antibióticos*

Son sustancias químicas utilizadas para prevenir y tratar las enfermedades infecciosas bacterianas. Su descubrimiento simboliza uno de los mayores avances para la humanidad a principios del siglo XX. Los mismos, son compuestos químicos producidos por un ser vivo o sintético que se utiliza para prevenir el desarrollo de diferentes tipos de microorganismos patógenos (Alvarado, 2020).

2.1.2.1. Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos se clasifican por clases, según sus propiedades, estructura y espectro de acción, así como el tipo de bacterias sobre las que actúan. Una de las clasificaciones más comunes es la que se realiza en función del espectro:

- Amplio espectro: antibióticos que pueden combatir bacterias diferentes.
- Espectro reducido: antibióticos que resultan eficaces contra determinadas bacterias.

Una de las clasificaciones de los antibióticos es por su mecanismo de acción, a continuación se detalla (Lopardo, 2019):

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

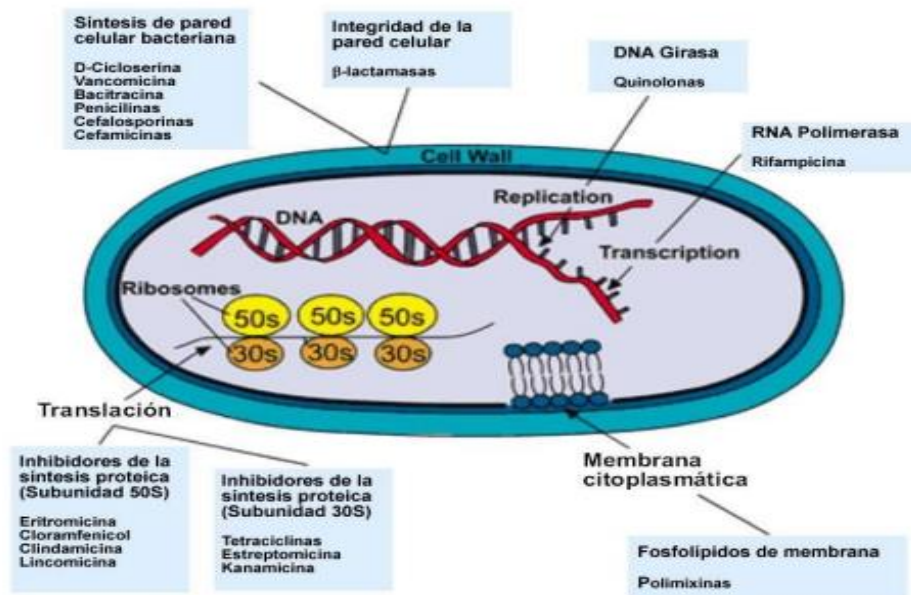


Ilustración 2-2: Mecanismo de acción de los antibióticos

Fuente: (Virga, 2017).

2.1.2.2. Amoxicilina

Es un antibiótico semisintético derivado de la penicilina, se encuentra dentro del grupo de los betalactámicos. Actúa contra un amplio espectro de bacterias, tanto Gram positivos como Gram-negativos (Romero, 2020).

- *Mecanismo de acción*

Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular en especial su espectro de acción se da en la última etapa de la síntesis del peptidoglicano, en efecto inhibe la transpeptidación ocasionando así un debilitamiento progresivo de la pared celular hasta llegar al punto donde la pared celular se rompe como consecuencia de la presión osmótica intracelular por la fragilidad que presenta la pared celular bacteriana y así provocando su destrucción.

La actividad de los antibióticos se ve favorecida en el proceso de multiplicación celular o fase de multiplicación bacteriana ya que en ese instante se lleva a cabo la síntesis de la pared celular, otra de las acciones que produce la amoxicilina es de activar la autolisina bacteriana que impulsa la destrucción del peptidoglicano, en aquellas bacterias que carecen de la autolisina la acción de destrucción se ve interrumpida sin embargo el proceso de inhibición si se desarrolla con normalidad (Suárez, 2017).

2.1.2.3. *Ciprofloxacina*

Es un antibiótico que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, es eficaz frente a muchas bacterias e incluso es efectivo frente a microorganismos que tienden a desarrollar resistencias frente a otros antibióticos. Presenta una mayor efectividad frente a *Klebsiella pneumoniae*.

- *Mecanismo de acción*

Actúan Inhibiendo la replicación bacteriana al interactuar con ADN girasa, las cuales son necesarias para realizar el súper enrollamiento del ADN bacteriano lo que ocasiona lisis celular (Seija, 2019).

2.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

El género *K. pneumoniae* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, se define como una bacteria en forma de un bacilo, su tinción microscópica es Gram negativo color rosado, una de las características principales es que posee una cápsula de polisacárido, mide entre 0,5um y de largo 1-3um, no móvil, no esporulantes, anaerobio facultativo, son catalasa positiva y son fermentadoras de lactosa, este microorganismo tiene un medio selectivo específico como es el Agar Mac Conkey en donde se observan colonias de color rosado, mucoides y grandes (González M. , 2021).

Este microorganismo es saprófito propia de la flora normal del ser humano, se encuentra en la boca, piel y los intestinos, sus principales reservorios son el tubo digestivo, agua, el suelo, los alimentos, las soluciones y dispositivos médicos u otros pacientes infectados que producen infecciones comunitarias y nosocomiales, ya sea por transmisión cruzada y mediante el contacto de las manos (Guevara T. , 2015).

2.1.3.1. Patogenicidad

- *Infección de K. pneumoniae*

K.pneumoniae es considerado como un patógeno virulento especialmente cuando llega a penetrar en los tejidos normalmente estériles o cuando afecta principalmente a los pacientes inmunosuprimidos, por esa razón se le considera como un microorganismo oportunista causante de enfermedades infecciosas especialmente a nivel hospitalario. Esta bacteria es una de las más comunes en provoca infecciones del tracto urinario, también es causante de neumonía, generalmente la mayor parte de las infecciones son adquiridas en centros hospitalarios o pacientes que estén con su sistema inmune demasiado bajo (Guevara y Maldonado, 2021).

Causan las siguientes enfermedades en personas inmunocomprometidas:

- Bacteriemia
- Infecciones del sitio quirúrgico
- Infecciones del tracto biliar
- Septicemia
- Meningitis
- Abscesos hepáticos

- *Factores de virulencia*

La enterobacteria *K. pneumoniae* es intrínsecamente virulenta que puede llegar a producir infecciones muy graves incluso la muerte del ser humano, esto se da debido a que posee una capsula gruesa de peptidoglicano y adhesinas de la fimbria. Además, existen varias cepas capaces de producir biofilms que son mucho más difíciles de detener el crecimiento bacteriano y tratar con fármacos (Pérez M. , 2020).

Los principales factores implicados en la virulencia de *K. pneumoniae* son 5 y todos ellos le permiten a este microorganismo penetrar y multiplicarse en el hospedador (Cruz y Ares 2020):

- Lipopolisacárido (LPS): Presenta la acción de endotoxina, el LPS le contorna por la membrana externa que está conformada mayoritariamente por proteínas, por ende, facilita el paso de muchas sustancias incluidos los antibióticos.
- Sideróforos: Son sustancias que le permite captar hierro bajo condiciones limitantes de dicho metal en el hospedero, ya que el hierro es un factor principal para el crecimiento y desarrollo del microorganismo.
- Proteínas de membrana externa: Aquí poseen 3 membranas externas: la una proteína OmpA apoya la resistencia contra los péptidos catiónicos antimicrobianos y más a la evasión de la fagocitosis a través de macrófagos alveolares, de igual forma hay otras proteínas OmpK35 y OmpK36 que presentan porinas, mediante ellas difunden moléculas hidrofílicas.
- Adhesinas y fimbrias no flagelares: Por lo general se encuentran en la superficie y están formadas por subunidades de proteínas poliméricas, el cual esto ayuda adherirse a las capas y a su vez a mantener el contacto con la célula del huésped.
- Cápsula: Se define como un polisacárido conformado por glucosa, fructosa, galactosa, manosa y ácidos urónicos. La cápsula de esta bacteria le permite evadir al sistema inmunológico impidiendo la fagocitosis, entonces le ayuda una alta resistencia a la desecación.

2.1.3.2. Mecanismo de resistencia a los antibióticos

Muchas enterobacterias tienen varias estrategias para producir resistencia a los antibióticos y se basan en uno o varios mecanismos que llegan a coexistir en el mismo microorganismo entre ellas tenemos: inactivación enzimática se da por la productividad de enzimas codificadoras por genes cromosómicos que modifican la estructura química del fármaco, alteración de las moléculas diana es otro mecanismo de resistencia, por lo general aquí presenta mutaciones que van a destruir el sitio de unión y la disminución de la permeabilidad celular (Pérez M. , 2021).

- *Evolución de los mecanismos de resistencia*

Desde el año 1990 surgieron las primeras resistencias a los carbapenémicos, primero surge en el país de Asia, después ya se expandió en otros países como; Colombia, Brasil, Argentina, Ecuador. En los últimos años se ha encontrado más bacterias productoras de BLEE que se considera bacteria multirresistente denominada *K. pneumoniae* carbapenemasa KPC productora de enzima carbapenemasa (Alvarado, 2020).

- *Resistencia a antibióticos β -lactámicos*

Generalmente los betalactámicos son antibiótico bactericidas, en su estructura presenta un anillo

betalactámico y su función es inhibir la síntesis de la barrera de peptidoglucano de la pared celular pero aquí surgen muchas estrategias que se presenta a continuación:

Alteración en las proteínas fijadoras de penicilina (PBP): La PBP son enzimas que van ayudar a catalizar en la síntesis del peptidoglucano y a su vez actúan de diana específica de los antimicrobianos de la familia β -lactámicos. Con una alteración en su estructura van a impedir su interacción normal con el antibiótico produciendo la pérdida de afinidad de las PBPs y así las bacterias van reproduciendo mayor resistencia (González M. , 2016).

Modificación de la permeabilidad de la membrana externa: La membrana externa de la bacteria Gram negativa, al ser hidrófila los antibióticos β -lactámicos, no pueden difundir bien a través de la membrana externa para unirse con las lactámicos, no pueden difundir bien a través de la membrana externa para unirse con las PBPs, y para poder pasar deben utilizar canales proteicos inespecíficos como las porinas.

Bombas de expulsión activa: El sistema de expulsión está constituido principalmente por proteínas de membrana especializada que captan y expulsan los antibióticos desde el citoplasma hacia la membrana como bomba de expulsión activa en *K. pneumoniae* a AcrAB y OqxAB.

Producción de β -lactamasas: Las β -lactamasas son hidrolasas van a romper el enlace amida del anillo β -lactámico inactivando el antibiótico de forma irreversible, además constituye el mecanismo principal de resistencia a los antibióticos β -lactámicos y su adaptación bacteriana frente a nuevos antibióticos (Bahamonde, 2017).

- Resistencia a antibióticos no β -lactámicos

Quinolonas: Las quinolonas tienen como acción bloquear las topoisomerasas II (ADN-girasa) en general actúan en cuatro fases: como primera fase estas pasan a través de las porinas de la pared bacteriana, como segunda fase logran ingresar a la membrana citoplasmática y después se dirigen nuevamente al citoplasma, tercero inhiben de la ADN-girasa y/o topoisomerasa IV, y por último se da la inducción de la respuesta SOS (Valdiviezo, 2017).

La resistencia a quinolonas aparece por muchas mutaciones cromosómicas de los genes que codifican la girasa de ADN (*gyrA* y *gyrB*) y la topoisomerasa de tipo IV están las *parC* con *parE*. También en los últimos años se evidencia otros mecanismos, se basan principalmente en la disminución de la captación del fármaco debido a las mutaciones en los genes reguladores de la permeabilidad de membrana, y la sobre carga de bombas de expulsión que llevan a cabo una

eliminación del medicamento (Valdiviezo, 2017).

- *Tipos de productora de carbapenemasas (KPC)*

El microorganismo *K.pneumoniae* constituye el patógeno más importante de productora de carbapenemasas tipo KPC. En los últimos años se han hallado 24 alelos del gen blaKPC, los que difieren entre sí por uno a tres aminoácidos. Estas variantes de KPC han sido divididas en número secuencial desde blaKPC-1 a blaKPC-24. La variante de KPC-1, KPC-2 y KPC-3 presentan el 100% más identificada por los laboratorios, por ellos son las más comunes entre los aislados clínicos y responsables de los brotes epidémicos en todo el mundo (Vera et al. 2017).

- *Genes móviles de carbapenemasas en K. pneumoniae*

Las diferentes clases de genes de carbapenemasas que circulan dentro del microorganismo *K. pneumoniae* son transportados por estructuras móviles, plásmidos y transposones.

Plásmidos: Son estructuras génicas extracromosomales que tienen como función codificar funciones no esenciales para la actividad fisiológica normal de las bacterias, además son hábiles en portar genes con una amplia variedad de funciones como la resistencia a antibióticos. La existencia de muchos plásmidos dentro de una bacteria patógena, genera la suma de múltiples genes al organismo de la persona (Valdiviezo, 2017).

Integrones: También se le llama o se le conoce elemento de integración propuesto por el científico Stokes y Hall en el año 1989, son genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar en regiones de otro ADN multiplicando nuevos genes, especialmente para iniciar la resistencia a los antimicrobianos.

Transposones: Son elementos genéticos móviles que se encuentran en plásmidos o pueden integrarse en otros transposones o el cromosoma del hospedero. El transposón Tn4401 es la principal estructura genética que aporta en la propagación de genes de tipo bla KPC en distintos plásmidos, pero su transposición no es muy eficiente (Soria, 2021).

2.1.3.3. *Métodos para tratar K. pneumoniae*

La resistencia bacteria se ha convertido en un tema de impacto social y es uno de los problemas que se ha convertido a nivel mundial, ya que la terapia de antibióticos individuales están causando mucha resistencia debido al mal uso de antibióticos. Sin embargo, en los últimos años

el número total de antibióticos son cada vez más ineficaces contra *K. pneumoniae* por esa razón se necesita de urgencia la búsqueda de formas alternativas para tratar estas infecciones patógenas (Pérez M. , 2020).

- *Terapia fágica*

Se utilizó por primera vez como una preparación oral para tratar la disentería en el año 1917, después se dejó de utilizar debido al descubrimiento y triunfo de la farmacoterapia con los antibióticos. Entonces hoy en día, debido incremento de resistencia antimicrobiana, se vuelve a utilizar para el control de las bacterias multirresistentes; por eso, en los últimos cinco años, numerosas preparaciones de fagos han sido sometidos a ensayos clínicos (Pérez M. , 2020).

- *Péptidos antimicrobianos*

Son aquellos pequeños oligopéptidos de defensa del huésped contra las bacterias, debido a que presentan un amplio espectro de actividad que tienen contra un extenso rango de patógenos y a su alta capacidad para interactuar con la membrana celular de la bacteria y como consecuencia, va a causar la lisis celular o muerte, por ellos se considera una alternativa potente para competir contra los patógenos resistentes a múltiples antibióticos.

Una de las ventajas más importantes frente a los antibióticos convencionales es su forma de dañar la célula bacteriana mediante interacciones electrostáticas y por ende será difícil para el microorganismo desarrollar resistencia contra estos péptidos (Nakonieczna et al. 2019).

2.1.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la concentración más baja (en µg/ml) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de una determinada cepa bacteriana. En IDEXX se utiliza un sistema comercial automatizado para determinar las CMI. Un método cuantitativo de prueba de sensibilidad, que ofrezca una CMI, ayuda a determinar qué clase de antibiótico es más eficaz

2.1.5. Medios de cultivos

Un medio de cultivo se define como un conjunto de nutrientes que, en determinadas concentraciones permite que los microorganismos, en este caso las bacterias crezcan y se multipliquen.

2.1.5.1. Agar triptona-soja (TSA)

Es un medio de cultivo nutritivo para una amplia gama de usos, al tener su característica nutritiva se utiliza principalmente para el crecimiento y aislamiento de bacterias tanto aerobias y anaerobias con el fin de fortalecer el aumento de la mayoría de los microorganismos exigentes, este medio permite identificar las reacciones hemolíticas y recuento de una amplia variedad de microorganismos. Sus componentes principales son una base proteica, cloruro sódico, una mínima cantidad de hidratos de carbono naturales y 5 % de sangre (Wiese, 2021).

2.1.5.2. Caldo TSB

Es un medio nutritivo líquido para enriquecimiento y crecimiento de una amplia gama de microorganismos por lo general más se utiliza en aerobios, se enfoca especialmente para procedimientos cualitativos para pruebas de esterilidad.

2.1.6. Definición de sinergia

La palabra sinergia viene de latín synergos, que significa "trabajar en conjunto". Entonces se puede definir como la acción entre dos o más sustancias que actúen en conjunto, con el propósito de obtener una respuesta mayor a la suma de efectos que produciría uno solo. Esta palabra es de gran importancia clínica y terapéutica, ya que con menos concentraciones de dicho fármaco se logra producir mayores efectos y se tendría muchos beneficios al realizar combinaciones de medicamentos como: menos efectos adversos, menor toxicidad, dosis baja, etc., (Villaverde, 2019).

2.1.6.1. Combinación de antibióticos

La resistencia antimicrobiana representa un grave problema de salud y a nivel mundial, lo cual surge la necesidad de buscar nuevas estrategias como las combinaciones de los antibióticos. Se fundamenta principalmente en que la posibilidad del patógeno de desarrollar resistencia a una combinación de dos fármacos que es mucho menor que a una sola. Por otro lado, la combinación de fármacos presenta varios beneficios, entre ellos (Matzuoka y Vargas, 2020).

2.1.6.2. Ventajas de la combinación de antibióticos

La gran mayoría de las infecciones causadas por bacterias nocivas pueden ser tratadas con un solo antibiótico, por ejemplo el caso de infecciones susceptibles de tratamiento ambulatorio. Sin

embargo, en pacientes que se encuentran hospitalizados con infecciones potencialmente severas, entonces ahí es necesario combinar antibióticos, ya que con ello se obtienen ventajas destacadas:

- Disminuye la toxicidad de uno de los antimicrobianos de la combinación
- Obtención de sinergismo
- Menor tiempo durante el tratamiento
- Evita la aparición de microorganismos resistentes

2.1.6.3. Desventajas de la combinación de antibióticos

- Antagonismo entre la combinación de antibióticos
- Incremento de reacciones adversas al combinar dos medicamentos (Vásquez 2008).

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de investigación

La investigación fue realizada en los siguientes laboratorios; laboratorio de investigación, laboratorio de Biología Molecular, laboratorio de análisis bioquímico y laboratorio de microbiología de la Escuela de Bioquímica y Farmacia perteneciente a la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

3.2. Norma de la investigación

La presente investigación se basa en la norma INEN 1529-2, NTE INEN 1529-8, que explica la metodología de los procedimientos microbiológicos, de igual forma se guio en la Norma Española UNEN-en ISO 20776-1, donde explica la técnica de microdilución en caldo para ensayos sobre la actividad *in vitro* de antibióticos frente a bacterias infecciosas. (UNE, 2021)

3.3. Enfoque

Es una investigación cuali-cuantitativa porque se observó turbidez en los pocillos de 96 a diferentes concentraciones y se utilizó cálculos para las diferentes soluciones.

3.4. Alcance

Exploratorio: Ya que este tema es de impacto social y son muy pocos los estudios que han realizado en combinación entre dos antibióticos frente a bacterias multirresistentes a fármacos.

Descriptivo y Correlacional: debido a que se correlacionó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de forma individual y combinada los antibióticos, de igual forma se comprobó la efectividad de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *K. pneumoniae* con un antibiótico de amplio espectro como tetraciclina a dosis alta.

3.5. Diseño de la investigación

La investigación es experimental, debido a que es un estudio in-vitro sobre el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *K. pneumoniae* resistente a los

betalactámicos utilizando una técnica sencilla como es tablero de ajedrez en placas de 96 pocillos.

3.6. Tipo de investigación

Es de tipo transversal porque el estudio se ejecutó dentro de un tiempo establecido de septiembre 2022 hasta febrero 2023.

3.7. Método

Se utilizó el método tablero de ajedrez en microplaca de 96 pocillos microdilución en caldo, este ensayo permite determinar las interacciones sinérgicas entre amoxicilina y ciprofloxacina frente a bacterias resistentes a antibióticos.

3.7.1. Población de la muestra de estudio

La población del presente estudio son 8 diluciones a diferentes concentraciones de los antibióticos (amoxicilina, ciprofloxacina y tetraciclina) de forma individual y combinada.

3.7.2. Muestra

Cepa de *K. pneumoniae* resistente a los betalactámicos y las diluciones de los antibióticos como: amoxicilina, ciprofloxacina y tetraciclina.

3.7.3. Materiales, equipos y reactivos

3.7.3.1. Materiales

Tabla 1-3: Materiales utilizados en los distintos procedimientos

MATERIALES	PROCEDIMIENTO
<ul style="list-style-type: none">• TUBOS DE ENSAYO DE 5ML• GUANTES• ASA BACTERIOLÓGICA• GASA• ALGODÓN• PAPEL ALUMINIO• PROBETA 50 ML	Reactivación del microorganismo <i>K. pneumoniae</i>

<ul style="list-style-type: none"> • ERLENMEYER 100ML • MECHERO • FÓSFORO • ESPÁTULA • GRADILLA • REVERBERO 	
<ul style="list-style-type: none"> • CAJAS PETRI • MECHERO • FOSFORO • ERLENMEYER 250ML • PROBETA 50ML • ALGODÓN • PAPEL ALUMINIO • ESPÁTULA • HISOPOS DE MADERA • PINZA • GASA 	Preparación del antibiograma
<ul style="list-style-type: none"> • GUANTES • TUBOS EPPENDORF • PUNTAS ESTÉRILES • PIPETA DE 1000UL • GRADILLA • TUBOS DE ENSAYO 5ML • GASA • MECHERO • PROBETA 100ML 	Preparación del Stock bacteriano
<ul style="list-style-type: none"> • GRADILLA • TUBOS FALCÓN 15ML • ERLENMEYER 250ML • MORTERO CON PILÓN 	Preparación de la solución Stock de los antibióticos
<ul style="list-style-type: none"> • TUBOS FALCÓN 15ML • MECHERO • ASA • GRADILLA 	Preparación del cultivo Nocturno
<ul style="list-style-type: none"> • MICRO PLACA DE 96 POCILLOS • ALCOHOL • PUNTAS AMARILLAS 	Determinación de la CMI de los antibióticos individualizados y combinados

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

3.7.3.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar

- Balanza analítica
- Reverbero
- Estufa
- Autoclave
- Espectrofotómetro
- Congelador
- Micropipeta multicanal
- Incubadora

3.7.3.3. *Reactivos*

- Agar Müller Hinton
- Caldo Soja Trypticaseína (TSB)
- Agar Triptona- Soja (TSA)
- Caldo Cerebro corazón
- Glicerol al 60 %
- Agua destilada
- Alcohol potable al 70 %

3.7.4. *Descripción de los procesos*

3.7.4.1. *Obtención de la cepa K. pneumoniae*

La cepa de *K.pneumoniae* fue donada por la Institución INSPI (Instituto Nacional de Salud Pública e investigación).

3.7.4.2. *Obtención de los antibióticos*

Los principios activos puros de los antibióticos como: amoxicilina, ciprofloxacina y tetraciclina se obtuvo de la industria farmacéutica de la ciudad de Guayaquil provincia de Guayas.

3.7.4.3. *Reactivación de la bacteria*

- Se desinfectó con alcohol el área de trabajo
- Para la preparación del medio de cultivo se verificó las instrucciones de la botella que contiene caldo Tryptic Soy Broth (TSB), donde se indica que se necesita 30g para 1L de agua.

30g-----1000mL

Xg-----10mL

$$Xg = \frac{10mL \times 30g}{1000mL}$$

$$Xg = 0.30 \text{ g}$$

- Se pesó 0.30 g de TSB en la balanza analítica, posterior se colocó en el erlenmeyer de 100mL.
- En una probeta se midió 10 ml de agua destilada y se colocó en el erlenmeyer de 100mL.
- Se colocó los tubos y erlenmeyer en el autoclave para su esterilización de 30 minutos.
- Una vez transcurrido el tiempo, se sacó del autoclave todos los materiales, luego se colocó en la cámara de flujo laminar y se dejó que se enfrié a una temperatura soportable.
- Se distribuyó el caldo en el tubo de ensayo.
- Para la reactivación de la bacteria, se encendió un mechero, se quemó el asa hasta que este rojo vivo y enfriarle.
- Se introdujo el asa en el tubo eppendorf donde está la cepa bacteriana, flamear el tubo y se colocó en el tubo con caldo TSB con movimientos suaves.
- Se tapó con tapones y dejar que se incube por 24 a 48 horas a 37 °C.

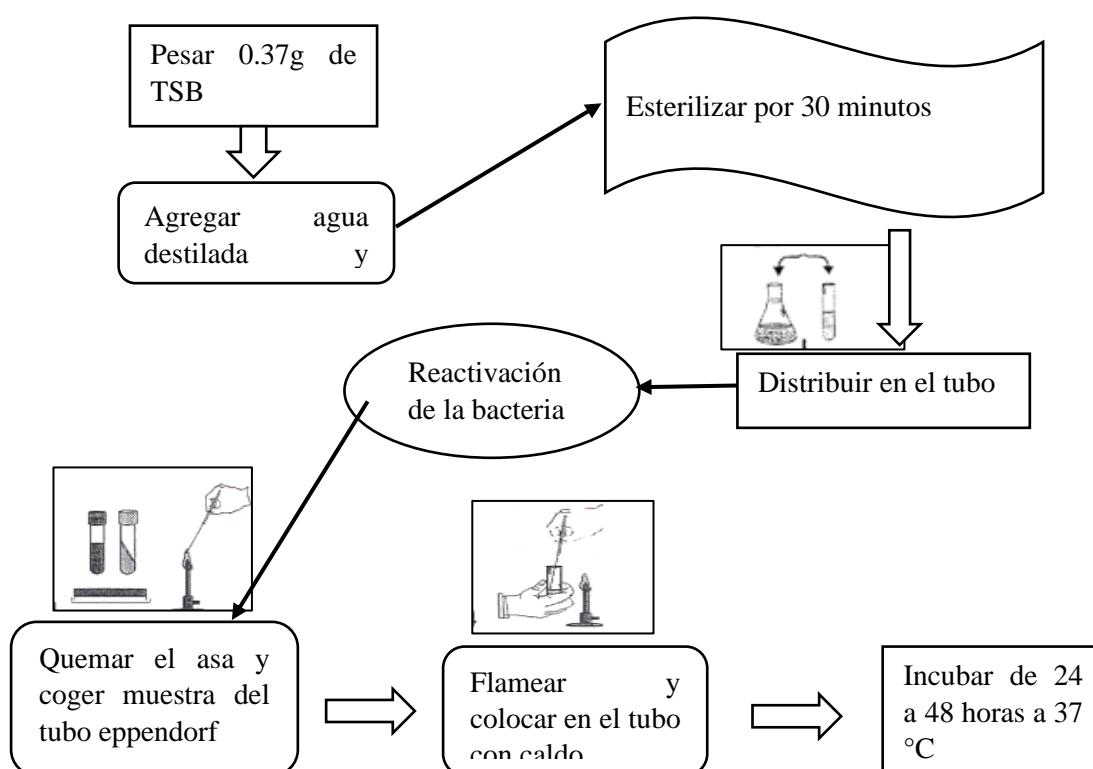


Ilustración 1-3: Reactivación de la bacteria

Realizado por: Vallín, Norma, 2023.

3.7.5. Comprobación de la resistencia a los betalactámicos de la bacteria *K. pneumoniae*

- Para la preparación del medio de cultivo se verifico las instrucciones del frasco de Agar Müller Hinton donde indica que se necesita 38g para 1L de agua

$$38\text{g}-----1000\text{mL}$$

$$X\text{g}-----20\text{mL}$$

$$X\text{g} = \frac{20\text{mL} \times 38\text{g}}{1000\text{mL}}$$

$$X\text{g} = 0.76 \text{ g}$$

- En la balanza analítica se pesó exactamente el contenido de 0.76 g de agar Müller Hinton
- Con la probeta se midió 20 ml de agua destilada, se colocó en el Erlenmeyer de 250mL
- En el reverbero se colocó el matraz y esperar hasta hervir el agar.
- Se encendió la autoclave y se colocó todos los materiales (cajas Petri, erlenmeyer, hisopos) durante 30 minutos de esterilización.
- Una vez pasado el tiempo se procedió a sacar los materiales, se colocó en la cámara de flujo laminar hasta que el agar este a una temperatura soportable y se distribuyó el agar en la caja Petri y se dejó que se solidifique.
- Para el siguiente procedimiento que es el antibiograma, se cogió un hisopo esterilizado y se introdujo en la suspensión del microorganismo.
- Se cogió el medio de cultivo, se estrió lateralmente por todo el Agar, girar 90 y repetir hasta completar 4 giros de 90.
- Después, con la pinza se pasa con alcohol potable, se quema en el mechero esperar que se enfríe, luego se tomó un disco del antibiótico y se colocó en la superficie del agar presionando.
- Repetir el mismo procedimiento hasta colocar 6 discos de diferentes antibióticos y cuidar la distribución y el espacio de cada disco.
- Se invirtió la caja y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C.
- Una vez pasado el tiempo se midió en milímetros los halos de inhibición.

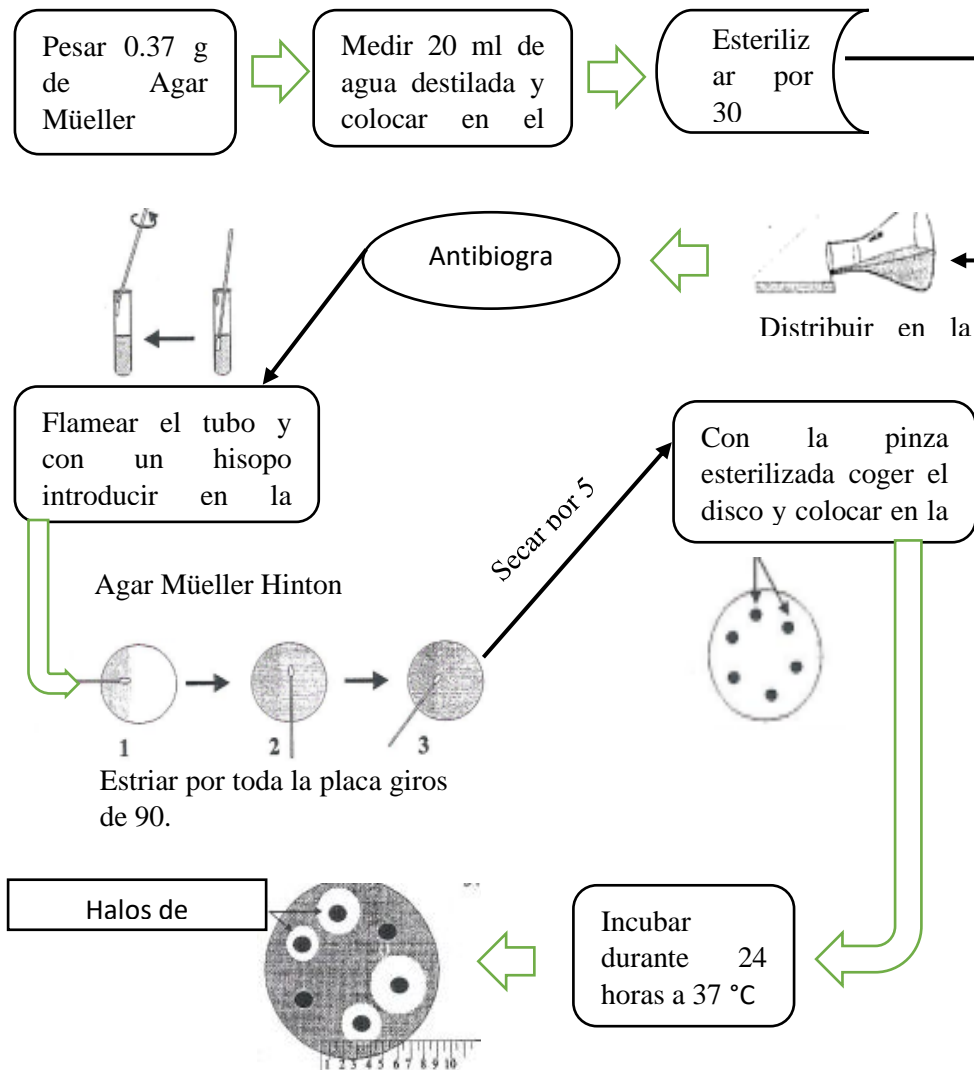


Ilustración 2-3: Comprobación de resistencia a betalactámicos

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

3.7.6. Realización de pruebas bioquímicas para la identificación de *K.pneumoniae* Pruebas macroscópicas

- Para la preparación del medio de cultivo se verificó las instrucciones del envase de Agar MacConkey donde indica que se necesita 50g para 1L de agua.

$$50\text{g}-----1000\text{mL}$$

$$X\text{g}-----20\text{mL}$$

$$X\text{g} = \frac{20\text{mL} \times 50\text{g}}{1000\text{mL}}$$

$$X\text{g} = 1\text{ g}$$

- Se pesó 1g de Agar MacConkey, se puso en un Erlenmeyer posterior a su esterilización de 20 minutos y una vez enfriado se colocó en la placa Petri.
- Con la ajuga bacteriológica se aplicó directamente a la llama del mechero hasta que este rojo vivo, luego se esperó que se enfrié y se cogió un inculo de bacteria.
- Se sembró mediante la técnica triple estriado
- Se incubo durante 24 horas y se observó sus colonias.

3.7.6.1. *Pruebas microscópicas tinción gram*

- En un portaobjetos se colocó dos gotas de solución salina estéril.
- Con un palillo de madera se cogió una porción de cultivo bacteriano, se colocó sobre la gota de solución salina y se realizó un extendido.
- Se dejó secar y se fijó por calor.
- La muestra se colocó sobre un soporte para realizar la tinción Gram.
- Primero se cubrió con una solución cristal violeta, se dejó actuar por 1 minuto y se lavó con agua no directamente sobre la muestra.
- Seguidamente se colocó la solución de yodo por un minuto y se lavó con agua.
- Luego se cubrió con alcohol al 96 % por 30 segundos y se lavó con agua.
- Como paso final se colocó la solución de safranina por 1 minuto, se lavó con agua y se dejó secar la placa.
- Una vez secada la placa se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó en el microscopio.

3.7.7. *Obtención de la solución Stock de los antibióticos (amoxicilina, ciprofloxacina y tetraciclina)*

La Amoxicilina se disolvió en agua destilada estéril tibio, la Ciprofloxacina se disolvió en ácido sulfúrico 0,01 N al igual que la Tetraciclina.

Amoxicilina:

- Se pesó el antibiótico y se le colocó en un balón de aforo de 50mL
- Para diluir se esterilizo agua y se colocó en el balón y se aforo.
- Para realizar las 8 diluciones de concentraciones más bajas hacia las altas, que van desde 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL, 256 µg/mL y 512 µg/mL y se colocó en una probeta de 10ml y aforar con caldo TSB.
- Se colocó las diluciones en los tubos falcón.

Ciprofloxacina:

De igual mente se prepararon 8 concentraciones diferentes que van de 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL y 128 µg/mL.

Tetraciclina:

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 asépticas y la cámara de flujo laminar.

3.7.8. *Preparación del cultivo nocturno a partir de una colonia de K. pneumoniae*

- Para la preparación del medio de cultivo se verificó las instrucciones del frasco de agar TSA donde indica que se necesita 37g para 1L de agua.

$$37\text{g}-----1000\text{mL}$$

$$X\text{g}-----10\text{ml}$$

$$X\text{g} = \frac{10\text{mL} \times 37\text{g}}{1000\text{mL}}$$

$$X\text{g} = 0.37 \text{ g}$$

- Se pesó 0.37g y se colocó en el erlenmeyer para su posterior esterilización de 30 minutos a una temperatura de 121 °C.
- Una vez esterilizado se llevó a la cámara de flujo y se dejó enfriar
- Se colocó el medio en las cajas Petri hasta obtener un volumen de 20mL
- Se tomó un inóculo de la bacteria reactivada, se procedió a sembrar suavemente en el agar en forma de triple estría y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C.
- Para el cultivo nocturno, se preparó caldo de TSB con agua destilada y luego se autoclavó durante 30 minutos a 121 °C.
- Se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar, luego se colocó en un tubo de 10 ml.
- De la caja Petri se tomó con la asa bacteriológica una colonia aislada previamente flameada y se introdujo en el tubo que contiene caldo TSB.
- Se incubó durante 24 horas a 37 °C.

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

- Para realizar este procedimiento se toma el tubo antes preparado en el cual debe estar turbio y se realizó una dilución 1/10.

- Se tomó 1 mL de la dilución, se colocó en una cubeta y después se midió en el espectrofotómetro a 600nm hasta obtener una OD_{600nm} de 0.05

3.7.10. Determinación de la CMI de los diferente antibióticos de forma individualizada

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de amoxicilina y ciprofloxacina en la cepa *K.pneumoniae* se utilizó una técnica microdilución en caldo con el método tablero de ajedrez que consiste en colocar la suspensión de diferentes concentraciones del antibiótico y bacteria en una placa de 96 pocillos, basándose en el manual M7 y M11 del CLSI 2012 “Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución” (CLSI, 2012)

- Para tener en condiciones de esterilidad se dejó durante 20 minutos encendida la UV de la cámara de flujo laminar.
- En una microplaca de 96 pocillos estéril desde la columna 3-10 se colocó con la pipeta multicanal automática en cada pocillo 5 µL de la dilución de la bacteria con una OD_{600nm} 0.05 y 100 µL de las diluciones de los antibióticos a distintas concentraciones de la más baja a la más alta. Se trabajó las diluciones del antibiótico al doble.
- Después se adicionaron en la celdilla 1 como control positivo (caldo más inóculo) y en otra celdilla 12 (caldo más antibiótico de control).
- De la misma manera se realiza el procedimiento tanto para la amoxicilina y ciprofloxacina.
- Se incubo de 18 a 24 horas a 37 °C, después del tiempo transcurrido se observó si hay o no la presencia de turbidez en los pocillos.
- Para cada uno de estos ensayos se realizó por triplicado 3 biológicas con el fin de tener resultados verdaderos.

Tabla 2-3: División de los micropocillos para las diluciones del antibiótico

Nº Columnas microplaca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Blanco	5µL suspensión bacteriana + 100µL dilución de antibiótico										Control
Concentración de las diluciones	A:	5µL suspensión bacteriana + 100µL caldo TSB											5µL suspensión bacteriana + 100 µL dilución de tetraciclina (128µg/mL)
	B:												
	C:												
	D:												
	E:												
	F:												

	G:												
	H:												

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

3.7.11. Determinación de la CMI de forma combinada con los antibióticos

- En condiciones estériles se dejó encendida la UV de la cámara de flujo laminar durante 25 minutos.
- En una microplaca estéril de 96 pocillos con la micropipeta multicanal automática se colocó 5µL de la suspensión bacteriana con una OD_{600nm} 0.05 desde la columna 3 hasta la 10.
- En el eje horizontal X se colocó las 8 diluciones de diferentes concentraciones (0,) en cada pocillo 50 µL de amoxicilina.
- En el eje vertical Y se colocó la dilución del ciprofloxacina, en cada pocillo se almaceno 50 µL del antibiótico diluido de las concentración más baja a las altas.
- Se incubo durante 18 a 24 horas a 37 °C.
- Transcurrido el tiempo se observó de forma cualitativa a través de una lectura directa de la presencia de turbidez o no en los pocillos.
- De igual forma cada ensayo se realizó por triplicado.

3.7.12. Análisis de los resultados

Para los resultados obtenidos se utilizó estadística descriptiva para un análisis de susceptibilidad de las 8 diluciones de amoxicilina/ciprofloxacina mediante la observación directa de la presencia o ausencia de turbidez en cada uno de los pocillos de las microplacas.

Para ver si existe sinergia se aplicó la fórmula de concentraciones inhibitorias fraccionarias:

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

Según los valores de CIF obtenidos, se interpreta:

- Si CIF < 0,5 hay sinergismo
- Si CIF = 1 hay adición
- Si CIF entre 2 ó 4 hay antagonismo

3.7.13. Proceso llevado a cabo en la investigación

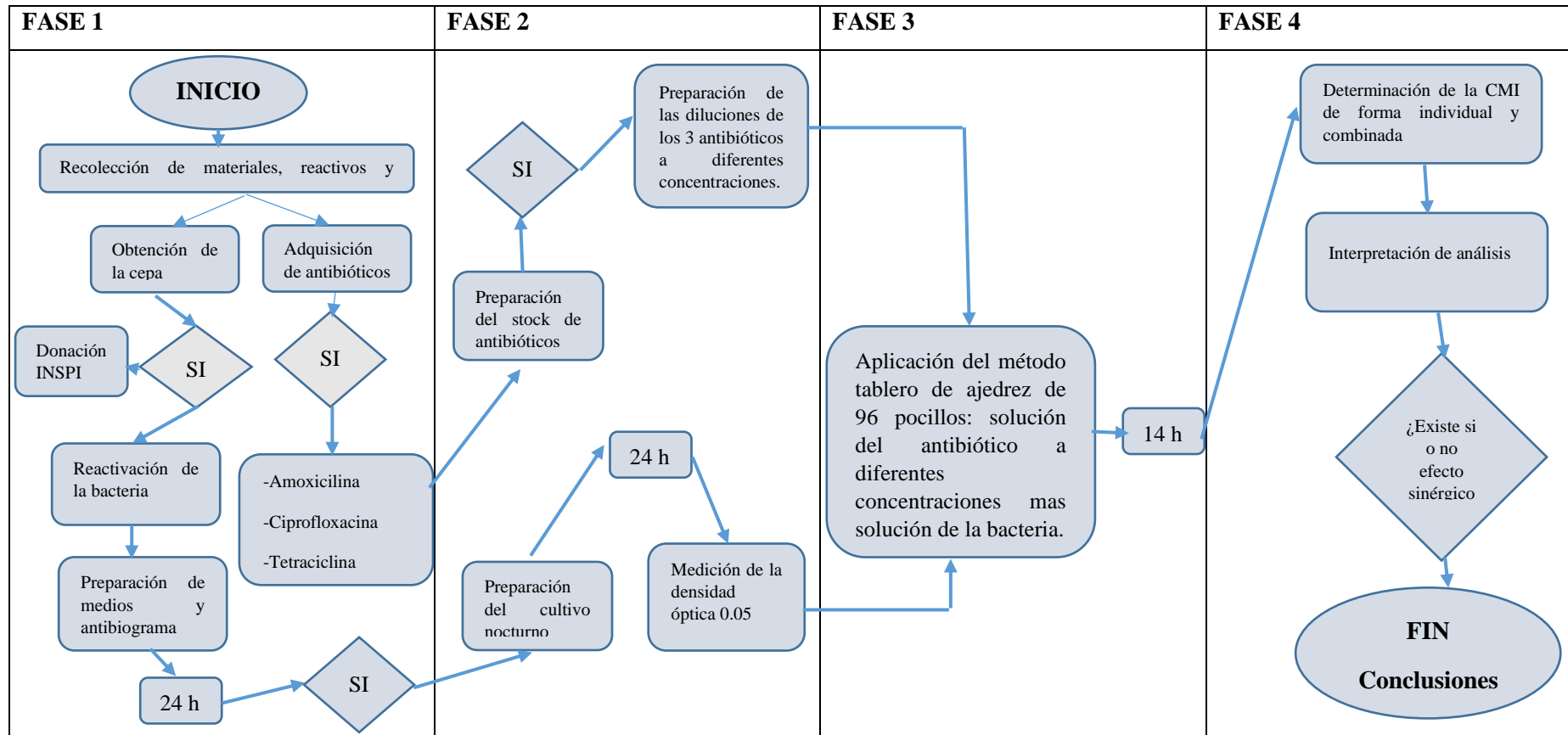


Ilustración 3-3: Flujoograma de métodos y técnicas usados en cada fase de la investigación

Realizado por: Vallin, Norma, 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 de las pruebas bioquímicas y microscópicas para la identificación de la cepa bacteriana

Tabla 1-4: Resultados de pruebas bioquímicas y microscópicas de la cepa de *K. pneumoniae*

Análisis microscópicas y macroscópicas								
Tipo de análisis			Resultados					
Macroscópicas			En agar MacConkey se formó colonias rosadas, grandes, brillantes, mucoides y un aspecto de huevo estrellado.					
Microscópicas			Bacilos Gram negativos					
Pruebas Bioquímicas								
MIO		CITRATO	UREA	SIM		KLIGER		
Movilidad	-	+	+	Indol	-	Fermentación		
Indol	-			Motilidad	-	Glucosa	+	
						Sacarosa	+	
Ornitina descarboxilasa	-			SH ₂	-	Lactosa	+	

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

Una vez obtenida y reactivada la cepa de *Klebsiella pneumoniae* se realizaron las pruebas de identificación para lo cual se sembró en un medio de diferenciación selectivo para la familia *Enterobacteriaceae* como lo es el Agar MacConkey, los análisis macroscópicos, microscópicos y pruebas bioquímicas realizadas coinciden con lo reportado por el Instituto Nacional de Rehabilitación “Dra. Adriana Rebaza Flores de Perú (2013, pp. 9-10) donde se afirma que tras las 24 horas de incubación en Agar MacConkey, se observan colonias rosadas con aspecto mucoso, bacilos gram negativos bajo el microscopio y las pruebas bioquímicas determinaron mediante el medio MIO: Movilidad (-), Indol (-) y Ornitina (-); prueba de Citrato y Urea positivas, fermentan todos los carbohidratos y no son productoras de SH₂. (ANEXO A)

Dichos datos se complementan con lo establecido por (Sierra, 2016, pp. 39-40) quien para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* proveniente de diversas muestras clínicas observó un total de 93 cepas cuya vista bajo al microscopio confirma pertenecer al grupo de los bacilos gram negativos, además de ser lactosa positivas, mucoides, catalasa positiva y oxidasa negativo; de la misma manera las pruebas bioquímicas para la identificación de *Enterobacterias*, confirman la presencia de *Klebsiella pneumoniae* en los medios de cultivo utilizados.

4.2. Antibiograma

Tabla 2-4: Resultados del antibiograma de *K. pneumoniae*

Antibiótico		Diámetro de la zona (mm) EUCAST,2022			Resultado	
		R ≤	I	S ≥	Medición en mm	R / I / S
AZM	15	13	14-17	18	13	R
CXM	30	19	20-47	50	24	I
AM	10	14	-	14	13	R
AMC	30	19	-	20	19	R
CRO	30	25	-	25	32	S
CIP	5	22	22-24	25	21	R

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

Nota: **R:** resistente, **S:** sensible, **I:** intermedio. Azitromicina (AZM), Cefuroxima (CXM), Ampicilina (AM), Amoxicilina + ácido clavulánico (AMX), Ceftriaxona (CRO), Ciprofloxacina (CIP) tomados de CLSI 2020.

Una vez identificado el microorganismo se procedió a realizar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos, para lo cual se emplearon antibióticos de distintos grupos farmacológicos: Betalactámicos (CXM, AM, AMC, CRO), Macrólidos (AZM) y Quinolonas (CIP), considerando las recomendaciones de EUCAST respecto a la consideración de sensibilidad y resistencia, para la familia *Enterobacteriaceae*, teniendo como resultado que, la cepa de *K. pneumoniae* presentó resistencia a tres antibióticos betalactámicos (Ampicilina, y Amoxicilina/Ácido clavulánico) y a la única quinolona considerada en el estudio (Ciprofloxacina) (**ANEXO C**) (Rapoport, 2023, pp. 16-20).

Para el año 2001, *Klebsiella pneumoniae* presentó resistencia elevada frente a betalactámicos de uso clásico, mientras que, para las quinolonas de 14.970 aislamientos, el 10% presentaba resistencia a dicho grupo de antibióticos (De la Parte et al. 2001, pp. 14-22).

Tan solo 9 años se reportó que, los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* presentaron 10% de resistencia a ampicilina, 80% para Amoxicilina/Ácido clavulánico y 45.5% de resistencia para Ciprofloxacina, lo que demuestra una alarmante situación frente a la resistencia que presenta el microorganismo estudiado después (Castro, et al. 2010, pp. 1013-1016).

A nivel general *Klebsiella pneumoniae* presenta un elevado porcentaje de resistencia a los Betalactámicos, el cual en su mayoría es explicado por el uso indiscriminado de antibióticos a escala mundial, lo cual ha ocasionado que la expresión de los genes se propague entre los miembros de la misma especie (Sierra, 2016, pp. 53-54).

4.3. Determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) individual de Amoxicilina y Ciprofloxacina

Tabla 3-4: Determinación de la CMI de la Amoxicilina frente a *K. pneumoniae*

Nº Columnas microplaca		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentración de las diluciones (µg/mL)	A: 4												CONTROL
	B: 8												
	C: 16												
	D: 32												
	E: 64			CMI									
	F: 128												
	G: 256												
	H: 512												

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina frente a la cepa de *K. pneumoniae*, se empleó un panel de microdilución en caldo de 96 pocillos frente a 8 concentraciones diferentes de Amoxicilina. Como se observa en la Tabla 5-4, la presencia o ausencia de crecimiento microbiano se comprobó visualmente a través de la turbidez del medio, por lo tanto, a una concentración menor a 8 µg/mL el medicamento no tiene efecto sobre la

bacteria (turbio), cuando la concentración se encuentra entre 16-32 µg/mL tiene un ligero efecto en el crecimiento bacteriano.

La CMI se determinó en la fila E con una concentración de 64 µg/mL (ANEXO D), debido a que hubo ausencia de turbidez, que indica la capacidad del medicamento de inhibir a *K. pneumoniae*. De acuerdo al Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), la CMI para la Amoxicilina es >512 µg/mL frente a *K. pneumoniae* es alta, debido a que esta bacteria tiene un mecanismo de resistencia por betalactamasas de espectro extendido (BLEE), también puede deberse al origen de la cepa y distintas condiciones como: temperatura, humedad, así como también al uso indiscriminado por parte del ser humano, sin embargo, el valor obtenido en este estudio (64 µg/mL) está dentro del rango de resistencia (IDEXX, 2022).

Un estudio sobre la “Resistencia a la colistina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogorresistente del período 2015-2018 en un instituto materno perinatal de Lima, Perú”, al evaluar la resistencia bacteriana de 36 cepas aisladas de *K. pneumoniae*, reportó una sensibilidad disminuida de esta bacteria a los betalactámicos: cefotaxima (88.8%), ceftazidima (63.8%) y amoxicilina + ácido clavulánico (55.5%), determinando que, la resistencia observada pudo deberse a que los bacilos gram negativos tienen como principal mecanismo de resistencia, la producción de beta-lactamasas (Matsuoka, et al. 2021, pp. 7181).

Tabla 4-4: Determinación de la CMI de la ciprofloxacina frente a *K. pneumoniae*

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

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

La Concentración Mínima Inhibitoria de Ciprofloxacina frente a la cepa de *Klebsiella pneumoniae* se realizó con la misma metodología, empleando un panel de microdilución en caldo con 96 pocillos, se obtuvo que la CMI para ciprofloxacina fue de 32 µg/mL (**ANEXO E**). Según el Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), para el grupo de las *Enterobacteriaceae*, los valores de concentración mínima inhibitoria de Ciprofloxacina deben ser ≥ 8 µg/mL, al ser microorganismos resistentes al tratamiento antibiótico. Dicha información concuerda con lo reportado en un estudio sobre “Resistencia a la colistina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogorresistente del período 2015-2018” donde se determinó que, esta bacteria era resistente a quinolonas, en 36% para levofloxacina y 47% para norfloxacina (Matsuoka et al. 2020).

Para explicar esta problemática, se estableció que la restricción para el uso de cefalosporinas de amplio espectro acarrea el uso de otros antibióticos de generación reciente, promoviendo la aparición de bacterias multidrogorresistentes, siendo la ciprofloxacina un factor de riesgo para adquirir una infección por *K. pneumoniae* BLEE (+), pues en este estudio el 78% de las cepas de *K. pneumoniae* eran resistentes a ciprofloxacina (Bermejo et al., 2006, pp. 316-318).

4.4. Determinación de la sinergia in vitro de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina frente a *K. pneumoniae* resistente a los betalactámicos.

Tabla 5-4: Determinación de la CMI de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina

Nº Columnas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentración de las diluciones Ciprofloxacina	A: 64											
	B: 32											
	C: 16											
	D: 8							CMI				
	E: 4											
	F: 2											
	G: 1											
	H: 0											
			0	4	8	16	32	64	128	256		
Concentración de las diluciones Amoxicilina (µg/mL)												

Realizado por: Vallin, Norma, 2023.

El aumento de la resistencia bacteriana es un hecho evidente y a la vez un problema de salud a nivel mundial, ya que a pesar que las industrias farmacéuticas producen nuevos antibióticos disponibles, la presencia de microorganismos multirresistentes es cada vez más frecuente, por esa razón se ha identificado una nueva terapia mediante la combinación de dos antibióticos cuyos mecanismo de acción actúen en diferente diana y sobre todo que tengan menos efectos adversos durante el tratamiento (Guevara y Maldonado 2021).

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina frente a cepas de *K. pneumoniae* se empleó el método tablero de ajedrez una dilución de placa, lográndose determinar que, al combinar dichos antimicrobianos existe una disminución de la CMI del antibiótico A (Amoxicilina) en presencia del antibiótico B (Ciprofloxacina) (**ANEXO F**).

La combinación de antibióticos no debe realizarse a menos que se establezca un efecto sinérgico. Un estudio sobre “Combinaciones de antibióticos y quimioterápicos”, estableció que, la combinación de quinolonas con betalactámicos reduce el desarrollo de resistencias, causando la lisis bacteriana por los diferentes mecanismo de acción, pues las quinolonas actúan inhibiendo el ADN girasa y los betalactámicos inhiben la síntesis de la pared celular, por lo que su combinación se reservará para infecciones persistentes o complicadas de tratar (Lorenzo, 2017, p. 12)

Un estudio sobre “Evaluación del efecto de antraquinonas sintéticas combinadas con ciprofloxacina sobre cepas de *K. pneumoniae* resistentes a antibióticos”, al evaluar el efecto de la combinación de ciprofloxacina con antraquinonas sintéticas sobre esta bacteria, determinó que, la sensibilidad *in vitro* de *K. pneumoniae* no tuvo mejoría con dicha combinación. Al comparar con los resultados obtenidos en este estudio, se pudo concluir que la asociación de un medicamento con la antraquinona (quinona natural) no tuvo resultados efectivos, mientras que, la asociación de dos compuestos químicos (amoxicilina + ciprofloxacina) que tienen un mecanismo de acción farmacológico conocido frente a diversas bacterias, sí tuvo un efecto sinérgico (Olivo y Grunauer, 2020, p. 46).

Para la comprobación del sinergismo entre dos antibióticos, se requiere que el efecto de la combinación sea mayor al efecto individual. Como se observa en la **Tabla 7-4 (ANEXO F)**, la CMI de amoxicilina es 64 µg/mL y del ciprofloxacina es 32 µg/mL, mientras que, al combinar estos medicamentos, se redujo la CMI a 16 µg/mL para amoxicilina y 8 µg/mL para ciprofloxacina. El mecanismo de acción de la combinación de los dos medicamentos se basa en

que la amoxicilina inhibe la síntesis del peptidoglicano (principal componente de la pared bacteriana) y la ciprofloxacina ingresa a la célula e inhibe la síntesis del ADN de la bacteria.

4.4.1. Cálculo del Índice de la concentración inhibitoria fraccionaria (CIF)

Antibiótico A: Amoxicilina

- (CMI)_a Amoxicilina: 64 µg/mL
- CMI de la combinada del antibiótico A en presencia del antibiótico B: 16 µg/mL

$$CIFa = \frac{(A)}{(CMI)a}$$

$$CIFa = \frac{(16 \mu\text{g/mL})}{(64 \mu\text{g/mL})a}$$

CIFa: 0.25

Antibiótico B: Ciprofloxacina

- (CMI)_b Ciprofloxacina: 32 µg/mL
- CMI de la combinada del antibiótico B en presencia del antibiótico A: 8 µg/mL

$$CIFb = \frac{(B)}{(CMI)b}$$

$$CIFb = \frac{(8 \mu\text{g/mL})}{(32 \mu\text{g/mL})b}$$

CIFb: 0,25

- Cálculo de la concentración inhibitoria fraccionada total

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

$$CIF = 0.25 + 0.25 = 0.50$$

Tabla 6-4: Resultados del experimento de sinergia mediante el método de tablero de ajedrez

Antibiótico		14 horas de incubación			
A	B	FIC a	FIC b	FICt	Interacción
Amoxicilina	Ciprofloxacina	0.25	0.25	0.50	Sinergia

Realizado por: Vallín, Norma, 2023.

Una vez determinado la Concentración Mínima Inhibitoria de la combinación de Amoxicilina y Ciprofloxacina, se procedió a determinar la existencia del efecto sinérgico *in vitro* en comparativa con su concentración de manera individualizada, para lo cual, se realizó el cálculo del Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada para cada uno de los antibióticos utilizados y para su combinación, obteniendo un valor a las 14 horas de incubación de 0.25 para Amoxicilina y Ciprofloxacina, mientras que la CIF total fue de 0.50 valor que es considerado como combinación sinérgica *in vitro*, dado que su valor es ≤ 0.5 (Blasco et al. 2020, pp. 10).

Un estudio sobre “Evaluación de la sinergia en la asociación de antibióticos de productos farmacéuticos”, evidenció que existe un sinergismo parcial en la asociación de amoxicilina/norfloxacino para cepas de *E. coli*, valores que se relacionan con los resultados obtenidos en el presente estudio, debido a que son bacterias de la misma familia *Enterobacteriaceae* (Cachicatari y Palomino 2017, pp. 45).

La combinación de dos grupos de antibióticos tiene diversas ventajas entre las que destaca la posibilidad que el microorganismo sea sensible al menos a uno de los antibióticos. Una investigación sobre “Indicaciones de la antibioterapia combinada en la neumonía comunitaria que precisa ingreso”, determinó que, el uso de terapias combinadas entre betalactámicos y fluoroquinolonas han reducido la mortalidad de los pacientes hospitalizados con diagnóstico de neumonía debido a *K. pneumoniae* (Fernández 2019, p.29).

CONCLUSIONES

- Se evaluó el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a *K. pneumoniae* resistente, mediante el método de tablero de ajedrez en un tiempo de 14 horas observando un buen comportamiento inhibitorio in vitro frente a la cepa debido a que la combinación de antibióticos con diferente mecanismo de acción detiene el desarrollo bacteriano en dos puntos diferentes de su crecimiento, en este caso, un betalactámico y una fluoroquinolona, impidiendo la formación de la pared bacteriana y la replicación de su ADN.
- Se determinó la concentración mínima inhibitoria de la combinación de amoxicilina y ciprofloxacina frente a una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente posterior a su cultivo y antibiograma, empleando las CMI para los dos antibióticos individualmente (64 µg/mL en amoxicilina y 32 µg/mL en ciprofloxacina) y al realizar la combinación de los antimicrobianos la CMI se redujo a 16 µg/mL para amoxicilina y 8 para ciprofloxacino, con un CIF total de 0,50.
- Se comparó la eficacia de la combinación de los antibióticos amoxicilina y ciprofloxacina con la CMI individualizada de los medicamentos, determinando que, al obtener un valor de CIF de 0,5 se comprobó el efecto sinérgico contra *K. pneumoniae* resistente a betalactámicos.
- Se comparó la efectividad de la combinación entre Amoxicilina y Ciprofloxacina con un antibiótico de amplio espectro como la tetraciclina (CMI de 128 µg/mL), que fue utilizado en cada microplaca como control, concluyendo que, con el efecto sinérgico se alcanzó un adecuado efecto inhibitorio frente a *K. pneumoniae* resistente a betalactámicos.

RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto sinérgico in vitro de más combinaciones de antibióticos como propuesta para el tratamiento de infecciones bacterianas con etiología resistente o multirresistente en ambientes hospitalarios y comunitarios.
- Implementar métodos basados en Biología Molecular para el estudio in vitro de efectos sinérgicos o antagónicos de asociaciones farmacológicas frente a microorganismos resistentes.
- Estudiar el comportamiento farmacológico de la asociación de los principios activos amoxicilina y ciprofloxacino en una misma forma farmacéutica posterior a su diseño.

BIBLIOGRAFÍA

ALDUENDA, C. et al. *Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas. Medicina Interna de Mexico*, vol. 34, no 1 (2018), p. 89-105.

ALVARADO, A. *Determinación del gen blaKPC en muestras de Klebsiella pneumoniae resistentes a carbapenémicos en el hospital de especialidades Carlos Andrade Marín durante el período abril 2019- diciembre 2019.* [en línea]. 2020. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/22650/1/T-UCE-0014-CME-135.pdf>

BAHAMONDE, T. *Estudio retrospectivo de la situación de resistencia bacteriana frente a los antibióticos en el hospital de especialidades eugenio espejo.* [en línea]. 2019. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6361/1/T-UCE-0008-078.pdf>

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

CACHICATARI, V. *Evaluación de la sinergia en la asociación de antibióticos de productos farmacéuticos de uso veterinario.* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/323345486.pdf>

CASTRO, R et al. *Patrones de resistencia antimicrobiana en uropatógenos gramnegativos aislados de pacientes ambulatorios y hospitalizados Cartagena, 2005-2008. Revista de salud pública*, 2010, vol. 12, no 6, 2017, p. 1010-1019

CLSI. *Metodo de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución.* 32(2), 20-29. [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>

CRÉMIEUX, A. et al. *Efficacy of colistin alone and in various combinations for the treatment of experimental osteomyelitis due to carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74, 2666-2675. [en línea]. 2019. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31263884/>

CRUZ, M. *Efecto de las proteínas nucleoides en la transcripción de factores de virulencia en Klebsiella pneumoniae.* [en línea]. 2020. Disponible en: <http://bq.facmed.unam.mx/tab/wp-content/uploads/2020/06/13-De-la-Cruz.pdf>

DE LA PARTE-PÉREZ, M., et al. *Resistencia de Klebsiella pneumoniae a los antimicrobianos en Venezuela: Análisis de una década.* *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 2001, vol. 2018, p. 22.

ECHEVARRÍA, J et al. *Infección del tracto urinario y manejo antibiótico.* *Acta Médica Per.* 2006. pp. 26 – 27

ECHEVERRI, L. *Klebsiella pneumoniae como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia.* *Iatreia*, vol. 23, 2010, p. 240-249.

EUCAST. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 13.0, valid from 2023-01-01.* [en línea]. 2019. Disponible en: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf

FERNÁNDEZ, V et al. *Indicaciones de la antibioterapia combinada en la neumonía comunitaria que precisa ingreso.* *Pneuma*, 2007, p. 29 – 33.

FLORES, B. *Caracterización molecular de aislamientos clínicos de Klebsiella pneumoniae de un hospital público de la ciudad de Querétaro.* [en línea]. 2021. Disponible en: <http://ring.uaq.mx/bitstream/123456789/3027/1/MEMAC223057Bibiana%20Flores%20Monzon%20%20-A.pdf>

GÓMEZ, J. *Combinaciones de antibióticos: Nuevas perspectivas y futuro.* *Rev Esp Quimioterap*, 1996, vol. 9, p. 231-5.

GONZÁLEZ, M. *Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de Klebsiella pneumoniae.* Barcelona: Universitat de Barcelona. 2016.

GONZÁLEZ, M. *Características generales de Klebsiella pneumoniae.* [en línea]. 2021. Disponible en: <https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/157640/MariadelMar.pdf?sequence=1>

GUEVARA, J. y MALDONADO, M. *Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2021/ei213e.pdf>

GUEVARA, M. y PÁEZ, A. *Resistencia antimicrobiana en infecciones del tracto urinario del Servicio de urgencias en Colombia entre los años 2017-2019*. [en línea]. 2022. Disponible en: https://repositorio.unbosque.edu.co/bitstream/handle/20.500.12495/7581/Guevara_Qui%C3%B1ones_Ana_Maria_2022.pdf?sequence=1&isAllowed=y

GUEVARA, T. *Estudio retrospectivo de la situación de resistencia bacteriana frente a los antibióticos en el hospital de especialidades eugenio espejo para el año 2013*. [en línea]. 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6361/1/T-UCE-0008-078.pdf>

IDEXX. *Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*. [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>

JESÚS, F. *Combinación de antibióticos en pediatría*. *Scielo*, 71(3), [en línea]. 2008. Disponible en: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06492008000300007

KON, K. *El problema de salud que causará 10 millones de muertes en 2050 si no lo remediamos*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://theconversation.com/el-problema-de-salud-que-causara-10-millones-de-muertes-en-2050-si-no-lo-remediamos-159555>

LOPARDO, H. *Antibióticos: Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia*. Universidad Nacional de la PLata. 2019.

LORENZO, N. *Combinaciones de antibióticos y quimioterápicos* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.veterinariadigital.com/articulos/combinaciones-de-antibioticos-quimioterapicos/>

MARTÍNEZ, F et al. *Monoterapia vs. terapia combinada en el tratamiento de las infecciones por bacterias gramnegativas multirresistentes*. *Portal Regional de la Biblioteca Virtual en Salud*, [en línea]. 2018. Disponible en: https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_29_sup1_10sagasti.pdf

MATSUOKA, A. y VARGAS, M. *Resistencia a la colistina en cepas de klebsiella pneumoniae multidrogorresistente del período 2015-2018 en un instituto materno perinatal de*

lima, Perú. [en línea]. 2020. Disponible en: <https://scielosp.org/pdf/rpmesp/2020.v37n4/716-720/es>

MIKHAIL, S. y KEBRIAEL, R. *Evaluation of the Synergy of Ceftazidime-Avibactam in Combination with Meropenem, Amikacin, Aztreonam, Colistin, or Fosfomycin against Well-Characterized Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae.* [en línea]. 2019. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/AAC.00779-19>

MOHAMED, A. et al. *Estudio clínico prospectivo comparativo entre la monoterapia con colistina en dosis altas y la terapia combinada con colistina y meropenem para el tratamiento de la neumonía adquirida en el hospital y la neumonía asociada a la ventilación mecánica causada.* *Revista de resistencia global a los antimicrobianos.* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213716518301358?via%3Dihub>

MSP. *Resistencia antimicrobiana.* [en línea]. 2019. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf

NAKONIECZNA, J. et al. *Photoinactivation of ESKAPE pathogen overview of novel therapeutic strategy.* 2019.

OLIVEIRA, D et al. *Evaluación de la susceptibilidad a colistín y meropenem en Klebsiella pneumoniae productoras de carbapenemasas* [en línea]. 2019. Disponible en: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/10/1123250/04-oliveira-d-37-41.pdf>

OLIVO, R. y GRUNAUER, S. *Evaluación del efecto de antraquinonas sintéticas combinadas con ciprofloxacina sobre cepas de Escherichia coli Resistentes* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/ucacue/10176/1/Trabajo%20de%20Tesis%20Final.pdf>

OMS. *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.* [en línea]. 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

OMS. *Resistencia a los antibióticos.* [en línea]. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

ORHAN, G et al. *Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against Brucella melitensis.* *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, no 1 (2005), p. 140-143.

PAPOUTSAKI, V. et al. *Evaluation of in vitro methods for testing tigecycline combinations against carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates.* *ELSEVIER.Revista de resistencia global a los antimicrobianos* , [en línea]. 2022. Disponible en: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2213716519301948?token=773CD795816E8A7D353E8328E130DBC4A86BABF7B7C64A547583027C4B03FB4E384FA4F9C13783D984C35C9FDCF34ED2&originRegion=us-east-1&originCreation=20220620023659>

PATERSON, D et al. *Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in Klebsiella pneumoniae isolates causing bacteremia.* *Clinical Infectious Diseases*, vol. 30, no 3 (2000), p. 473-478.

PÉREZ, M. *Bacterias ESKAPE y nuevas estrategias de combate.* [en línea]. 2020. Disponible en: https://oa.upm.es/67013/1/TFG_MALENA_PEREZ_LORENZO.pdf

PÉREZ, M. *Determinación fenotípica y molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de Klebsiella spp. aisladas de diferentes hospitales mexicanos".* [en línea]. 2021. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12371/11721>

RAPOPORT, M. *Novedades CLSI / EUCAST 2022.* [en línea]. 2022. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2022/04/NOVEDADES-CLSI-2022.pdf>

ROMERO, M. *Evaluación del uso racional de antibióticos en el área de cirugía del hospital provincial general docente de riobamba.* [en línea]. 2020. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/14552/1/56T00943.pdf>

ROSS, J. et al. *Evolución de la Resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador.* [en línea]. 2020. Disponible en: <https://practicafamiliarrural.org/index.php/pfr/article/view/144/177>

SEIJA, V. *Principales grupos de antibióticos.* [en línea]. 2019. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/55015597/Antibioticoslibre.pdf?1510761409=&response-contentdisposition=inline%3B+filename%3DTEMAS_DE_BACTERIOLOGIA_Y_VIROLOG

IA_MEDIC.pdf&Expires=1682095157&Signature=Hzs7xOKfIF0MAFsons3YD6NJbR7avLbVwgMH1KQHvgGwLr3I

SIERRA, E. *Tipificación de aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae por la técnica de Multilocus Sequence Typing.* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/25051/SIERRA%20ATANACIO%20ERIKA%20GABRIELA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

SORIA, G. *Caracterización clínica, epidemiológica y factores de riesgo para la infección por Enterobacteriales productores de carbapenemasa.* [en línea]. 2021 Disponible en: <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/71419/88352%281%29.pdf?sequence>

SUÁREZ, C. *Mecanismo de acción :betalactámicos, Antibióticos.* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-antibioticos-betalactamicos-S0213005X08000323>

TAMMA, P. et al. *Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Clinical microbiology reviews,* vol. 25, 2012, p. 450-455.

UNE. *Norma Española UNE-EN ISO 20776-1.* 2021.

VALDIVIEZO, B. *Detección de serotipos capsulares K1, K2, K5 y genes de hipervirulencia magA y rmpA mediante PCR en Klebsiella pneumoniae obtenidas del cepario del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos durante el periodo 2016-2017.* [en línea]. 2018. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18020/1/T-UCER-0008-CQU-093.pdf>

VELÁZQUEZ, 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

VERA, A. *KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias.* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v34n5/0716-1018-rci-34-05-0476.pdf>

VILLAVERDE, A. *Sinergismo de farmacología.* [en línea]. 2019. Disponible en: <https://es.slideshare.net/AnikaVillaverde/tema-11-sinergismo-de-farmacologa>

VIRGA, L. *Farmacología en infecciones.* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/27397/Farmacolog%C3%ADa%20de%20las%20infecciones.pdf?sequence=3>

WEI, Jiang, et al. *Antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae through β -arrestin recruitment-induced β -lactamase signaling pathway.* *Experimental and therapeutic medicine*, vol. 15, 2021, p. 1 – 8

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



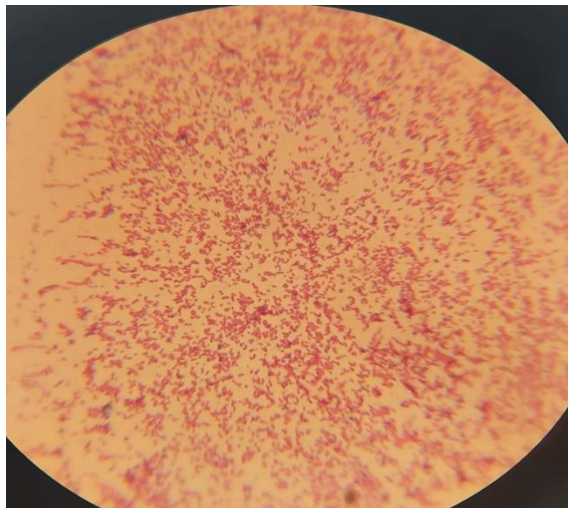
ANEXOS

ANEXO A: ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS

Pruebas macroscópicas



Pruebas microscópicas

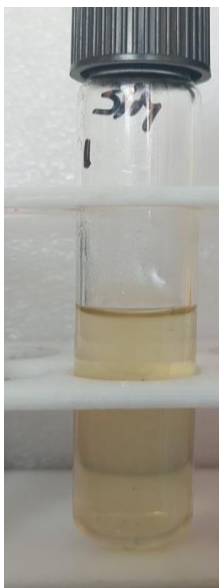


ANEXO B: ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS

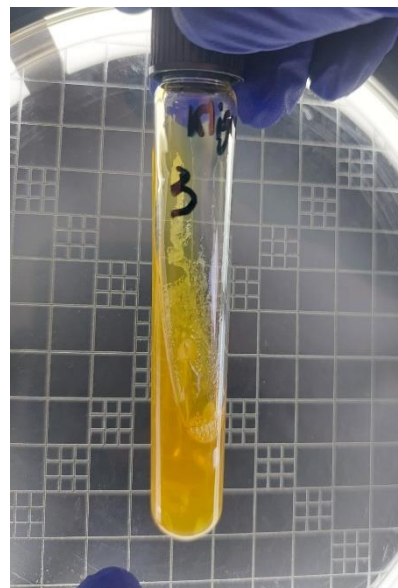
UREA



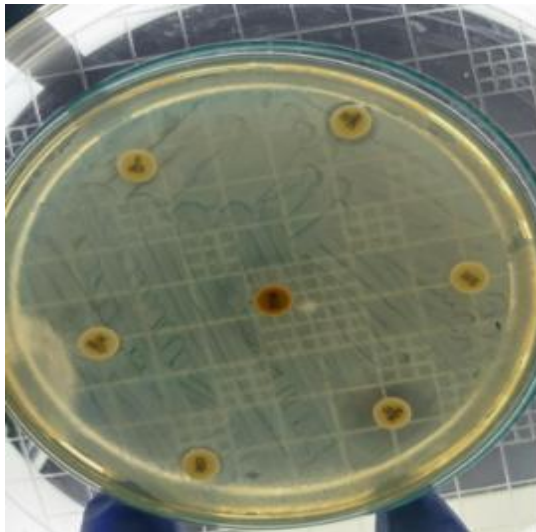
SIM



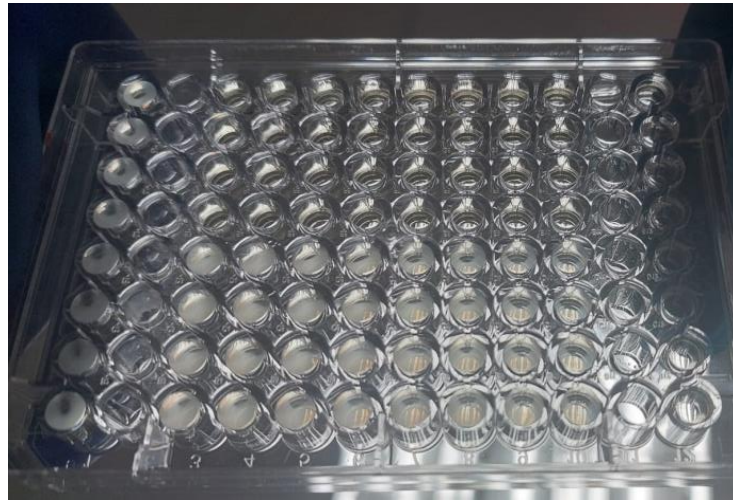
KLIGER



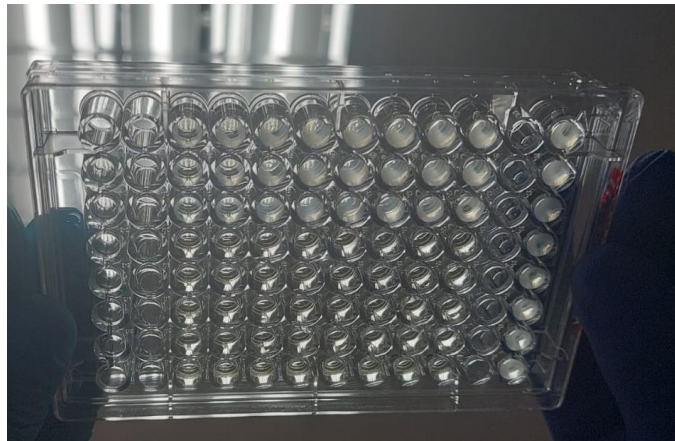
ANEXO C: ANTIBIOGRAMA



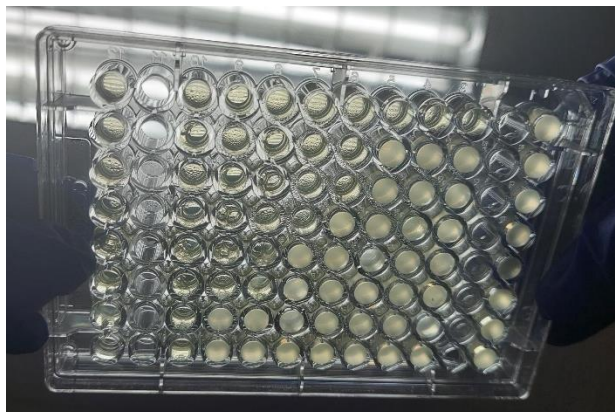
ANEXO D: CMI INDIVIDUAL DE AMOXICILINA



ANEXO E: CMI INDIVIDUAL DE CIPROFLOXACINA



ANEXO F: CMI COMBINADA ENTRE AMOXICILINA Y CIPROFLOXACINA





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: 25 / 08 / 2023

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

1342-DBRA-UPT-2023