



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**ESTUDIO DEL EFECTO SINÉRGICO DE LA COMBINACIÓN DE  
AMOXICILINA Y LEVOFLOXACINA FRENTE A *Staphylococcus  
aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA).**

**Trabajo de Integración Curricular**

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

**BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

**AUTORA: JOSELYN MERCEDES PAUCAR OJEDA**

**DIRECTORA: BQF. AÍDA ADRIANA MIRANDA BARROS MSc.**

Riobamba – Ecuador

2023

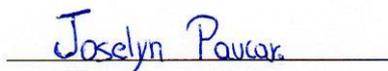
**©2023, Joselyn Mercedes Paucar Ojeda**

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, Joselyn Mercedes Paucar Ojeda, 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 del 2023

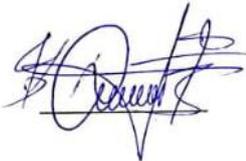
A handwritten signature in blue ink that reads "Joselyn Paucar" is written over a horizontal line.

**Joselyn Mercedes Paucar Ojeda**

**CI: 180469363-6**

**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 LEVOFLOXACINA FRENTE A *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA (MRSA)**, realizado por la señorita **JOSELYN MERCEDES PAUCAR OJEDA**, 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.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
BQF. Diego Renato Vinueza Tapia MSc. <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2023-06-23
BQF. Aida Adriana Miranda Barros MSc. <b>DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2023-06-23
Dr. Igor Eduardo Astudillo Skliarova MSc. <b>ASESOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2023-06-23

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar este Trabajo de Integración Curricular a mi ángel de la guarda mi tía/madre/hermana/amiga, Sonia que desde que soy niña me ha enseñado a trabajar por alcanzar mis objetivos, a ser una buena persona, noble y sensible ante la situación de los demás. Durante este tiempo nunca me dejó sola me apoyo de todas las maneras posibles para ella e imposibles en algunos casos, y gracias a ello este sueño se está haciendo realidad. También a mi abue, por compartir todo lo que ha tenido conmigo y por su gran sacrificio; y a una de las mejores personas que he conocido que desde el cielo me acompaña como una estrella brillante en la oscuridad Ale. Este trabajo es para todas aquellas personas que pusieron fe en mí y me enviaron la mejor de las energías para que esto se dé.

Joselyn

## AGRADECIMIENTO

Nada es imposible en la vida cuando se encuentran las fuerzas necesarias para lograrlo. Quiero agradecer a ser supremo que habla desde mi interior y me ha guiado durante este tiempo; y estoy más que segura que lo seguirá haciendo. Gracias Dios por permitirme cumplir este sueño, y darle un poquito de felicidad a mis seres queridos y amigos, pero sobre todo demostrarme mis capacidades de perseverancia y empeño. Agradezco a cada uno de los docentes que contribuyeron para mi formación académica durante el periodo de estudio, pero sobre todo en especial a los docentes Aida Miranda e Igor Astudillo por su paciencia y ayuda en el proceso del presente trabajo de titulación. Quiero agradecer también a mi tía querida Sonia que a pesar de la distancia ha sido mi incondicional y me ha alentado en momentos de tristeza. Agradezco también el apoyo de mi mejor amigo, novio y compañero Francis que con su paciencia me ha enseñado a no rendirme; él sabe todo lo que hemos atravesado para llegar a este momento. A una gran amiga psicóloga y hermana que la vida me brindó siempre con sus consejos que eran oportunos y me mostraban la realidad, te agradezco mucho por dejarme formar parte de tu familia y estar ahí en momentos de tristeza y felicidad con tus palabras y empuje no dejándome rendir ALE. Y como no reconocer a mi “mami” mi abuela la persona que me alimentado con sabiduría y su ejemplo, me ha acompañado cada noche de desvelo y me ha brindado su fuerza cuando ya no la he tenido. Y en si a todas esas personas que de una u otra manera han aportado para que logre este objetivo. Mi prima querida, mis tíos, mi jefecita y los tantos amigos que he logrado conservar. Gracias a todos de cora.

Joselyn

## 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.....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. <i>Objetivo general</i> .....	4
1.3.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	4

### CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Referencias teóricas.....	5
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	5
2.1.1.1. <i>Epidemiología</i> .....	5
2.1.1.2. <i>Patogenicidad</i> .....	6
2.1.1.2.1. <i>Infección por S. aureus</i> .....	6
2.1.1.2.2. <i>Factores de virulencia</i> .....	6
2.1.1.3. <i>Tipos de SARM</i> .....	7
2.1.1.3.1. <i>CA-MRSA</i> .....	7
2.1.1.3.2. <i>HA-MRSA</i> .....	8
2.1.1.3.3. <i>LA-MRSA</i> .....	8
2.1.1.3.4. <i>Cepas más relevantes</i> .....	8
2.1.1.4. <i>Resistencia bacteriana</i> .....	9
2.1.1.4.1. <i>Mecanismos de resistencia antibacteriana</i> .....	9
2.1.1.4.2. <i>Resistencia a antibióticos betalactámicos</i> .....	10

2.1.4.3. Resistencia a antibióticos no betalactámicos.....	10
2.1.5. <b>Diagnóstico</b> .....	11
2.1.6. <b>Medios de cultivo</b> .....	11
2.1.6.1. Medios de aislamiento para <i>S. aureus</i> .....	12
2.1.6.2. Agar triptona soja.....	12
2.1.6.3. Tryptic soy broth.....	14
2.1.7. <b>Métodos de tratamiento de <i>S. aureus</i></b> .....	14
2.1.7.1. Monoterapia.....	14
2.1.7.2. Antibióticos usados en monoterapia.....	14
2.1.7.3. Péptidos antimicrobianos.....	15
2.1.7.4. Terapia de fagos.....	15
2.1.8. <b>Sinergismo</b> .....	15
2.1.9. <b>Combinación de antibióticos</b> .....	16

### CAPÍTULO III

3. <b>MARCO METODOLÓGICO</b> .....	17
3.1. <b>Descripción de los procesos</b> .....	17
3.1.1. <i>Lugar de la investigación</i> .....	17
3.1.2. <i>Tipo y diseño de la investigación</i> .....	17
3.1.3. <i>Enfoque de la investigación</i> .....	17
3.1.4. <i>Alcance de la investigación</i> .....	17
3.1.5. <i>Normas de la investigación</i> .....	17
3.1.6. <i>Métodos, técnicas e instrumentos de la investigación</i> .....	18
3.1.7. <i>Materiales, equipos y reactivos</i> .....	18
3.1.7.1. <i>Materiales</i> .....	18
3.1.7.2. <i>Equipos</i> .....	20
3.1.7.3. <i>Reactivos</i> .....	20
3.2. <b>Población de estudio</b> .....	21
3.2.1. <i>Muestra de análisis</i> .....	21
3.2.1.1. <i>Criterios de inclusión</i> .....	21
3.2.1.2. <i>Criterios de exclusión</i> .....	21
3.3. <b>Descripción de procesos</b> .....	21
3.3.1. <i>Fases de estudio</i> .....	21
3.3.1.1. <i>Reactivación y realización del antibiograma de <i>S. aureus</i></i> .....	22
3.3.1.2. <i>Realización de pruebas bioquímicas para identificar <i>S. aureus</i></i> .....	23
3.3.1.3. <i>Preparación de soluciones stock de antibióticos</i> .....	24

3.2.1.4. <i>Medición de la densidad óptica de la suspensión bacteriana</i> .....	25
3.2.1.5. <i>Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana</i> .....	26

## **CAPÍTULO IV**

<b>4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	31
4.1. <b>Análisis de la morfología macroscópica y microscópica de la cepa bacteriana</b> .....	31
4.2. <b>Antibiograma</b> .....	31
4.3. <b>Determinación de la CMI individual de amoxicilina y levofloxacin</b> .....	33
4.4. <b>Evaluación del sinergismo in vitro de la combinación de antibióticos</b> .....	36
4.5. <b>Comparación de la efectividad de la CMI de los antibióticos con lienolid</b> .....	38

<b>CONCLUSIONES</b> .....	40
---------------------------	----

<b>RECOMENDACIONES</b> .....	41
------------------------------	----

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-2:</b>	Tipos de medios de cultivo.....	12
<b>Tabla 2-2:</b>	Composición del agar.....	14
<b>Tabla 3-2:</b>	Composición del caldo TSB.....	15
<b>Tabla 4-2:</b>	Tipos de sinergia farmacológica.....	18
<b>Tabla 1-3:</b>	Materiales utilizados en cada procedimiento.....	21
<b>Tabla 2-3:</b>	Equipos utilizados en cada procedimiento.....	22
<b>Tabla 3-3:</b>	Reactivos utilizados en cada procedimiento.....	22
<b>Tabla 4-3:</b>	Pruebas Bioquímicas para la identificación de <i>S. aureus</i> .....	26
<b>Tabla 5-3:</b>	Técnica de microdilución distribución de Amoxicilina y (L) Levofloxacin.....	29
<b>Tabla 6-3:</b>	Técnica de microdilución de la combinación - distribución de antibióticos.....	31
<b>Tabla 1-4:</b>	Análisis macroscópico, microscópico y pruebas bioquímicas de SARM.....	33
<b>Tabla 2-4:</b>	Halos de inhibición comparados con los puntos de corte de CLSI.....	34
<b>Tabla 3-4:</b>	Representación de la CMI de Amoxicilina en microplacas de 96 pocillos.....	35
<b>Tabla 4-4:</b>	Representación de la CMI de Levofloxacin en microplacas de 96 pocillos.....	36
<b>Tabla 5-4:</b>	Resultados de tres replicas biológicas de la CMI de amoxicilina y levofloxacin.....	37
<b>Tabla 6-4:</b>	Representación de la CMI de la combinación de amoxicilina y levofloxacin.....	38
<b>Tabla 7-4:</b>	Resultados de la sinergia por el ensayo tablero de ajedrez por 24 horas.....	39
<b>Tabla 8-4:</b>	Comparación de CMI de la combinación de antibióticos y linezolid.....	41

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1-2:</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
<b>Ilustración 1-3:</b>	Mapa de la Facultad de Medicina de la ESPOCH .....	19
<b>Ilustración 2-3:</b>	Reactivación y evaluación de la resistencia bacteriana de <i>S. aureus</i> .....	25
<b>Ilustración 3-3:</b>	Preparación de solución stock de antibióticos .....	27
<b>Ilustración 4-3:</b>	Preparación de solución stock de antibióticos .....	27
<b>Ilustración 5-3:</b>	Flujograma de métodos y técnicas usados en cada fase de la investigación.	32

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

- ANEXO A:** CALDO SOJA TRIPTICASEÍNA (TSB)
- ANEXO B:** TRIPTEÍNA SOYA AGAR (TSA)
- ANEXO C:** AGAR MANITOL SALADO
- ANEXO D:** BASE DE AGAR DE SANGRE (INFUSIÓN AGAR)
- ANEXO E:** PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN GRAM
- ANEXO F:** PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO G:** PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES
- ANEXO H:** DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS
- ANEXO I:** DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS PARA LA MICRODILUCIÓN
- ANEXO J:** FOTOGRAFÍAS DEL ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO
- ANEXO K:** FOTOGRAFÍAS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS
- ANEXO L:** ANTIBIOGRAMA
- ANEXO M:** CMI DE AMOXICILINA
- ANEXO N:** CMI DE LEVOFLOXACINO
- ANEXO O:** RESULTADOS DE LA COMBINACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CSLI</b>	Instituto de normas clínicas y de laboratorio
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>PBP</b>	Proteínas fijadoras de penicilina
<b>PLV</b>	Leucocidina de Panton Valentine
<b>SCCmec</b>	Cassette cromosomal estafilocócico
<b>STT</b>	Shock tóxico
<b>UCI</b>	Unidad de cuidados intensivos
<b>VRAS</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a vancomicina

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo por objetivo estudiar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y levofloxacin frente *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). El tipo de investigación fue experimental con enfoque cuali-cuantitativo y se desarrolló en tres fases: primero se determinó la concentración mínima inhibitoria de la combinación de amoxicilina y levofloxacin frente a SARM, después se comparó la eficacia que presenta la sinergia de la combinación antibiótica y finalmente, se comprobó la eficacia de la combinación con respecto al linezolid. Como resultados se obtuvo que, al evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos fue de 8 µg/mL en amoxicilina y 3 µg/mL en levofloxacin, con el fin de evaluar la sinergia de la combinación de los medicamentos, se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional (FIC) que al ser de  $0,1458 < 0,5$  se evidenció la sinergia entre los antibióticos analizados y finalmente, al comparar el efecto antibacteriano con el linezolid, se determinó que, la CMI del linezolid fue de 2 µg/mL y la CMI de la combinación de amoxicilina y levofloxacin fue de 2 µg/mL y 3 µg/mL respectivamente. Se concluyó que, sí hubo un efecto sinérgico al combinar amoxicilina y levofloxacin, ya que se potenció el efecto antimicrobiano contra SARM que es una de las principales bacterias causantes de infecciones nosocomiales a nivel sanitario. Se recomienda realizar el análisis del sinergismo de otras combinaciones de antibacterianos sobre las bacterias SARM y emplear un análisis in vivo del sinergismo farmacológico.

**Palabras clave:** <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <ANTIBIÓTICO>, <AMOXICILINA>, <LEVOFLOXACINA>, <SINERGISMO>, <*Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA>.

1335-DBRA-UPT-2023



## ABSTRACT

The objective of this research was to study the synergistic effect of the combination of amoxicillin and levofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The type of research was experimental with a qualitative-quantitative approach and was done in three phases: first, the minimum inhibitory concentration of the combination of amoxicillin and levofloxacin against MRSA was determined, then the efficacy of the synergy of the antibiotic combination was compared, and finally, the efficacy of the combination with respect to linezolid was tested. The results showed that the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics was 8 µg/mL in amoxicillin and 3 µg/mL in levofloxacin, in order to evaluate the synergy of the combination of the drugs, the fractional inhibitory concentration index (FIC) was calculated and when it was  $0.1458 < 0.5$ , the synergy between the antibiotics was evidenced and finally, when comparing the antibacterial effect with linezolid, it was determined that the MIC of linezolid was 2 µg/mL and the MIC of the combination of amoxicillin and levofloxacin was 2 µg/mL and 3 µg/mL respectively, the MIC of the combination of amoxicillin and levofloxacin was 2 µg/mL and 3 µg/mL respectively. It was concluded that there was a synergistic effect when combining amoxicillin and levofloxacin, since the antimicrobial effect against MRSA, which is one of the main bacteria causing nosocomial infections at the sanitary level, was enhanced.

It is recommended to analyze the synergism of other antibacterial combinations on MRSA bacteria and to use in vivo analysis of pharmacological synergism.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <ANTIBIOTIC>, <AMOXYCILLIN>, <LEVOFLOXACIN>, <SYNERGISM>, <METHICILLIN RESISTANT *Staphylococcus aureus*>.



Edgar Mesias Jaramillo Moyano  
0605497397

## INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud y el Foro Económico Mundial, existen múltiples reportes del aumento de la resistencia bacteriana, convirtiéndose en uno de los mayores problemas de salud pública al dificultar el tratamiento de las enfermedades infecciosas, aumentando la morbi-mortalidad, reduciendo la eficacia terapéutica y causando un retroceso de la medicina moderna a la era pre-antibiótica. Además, en términos económicos, causa un aumento en el gasto de la atención de salud, amenazando la seguridad sanitaria al perjudicar el comercio y la economía (Calderón y Aguilar 2018, p. 758).

Durante casi siete décadas la humanidad ha participado del beneficio de los antibióticos. Hoy en día, la gran mayoría de los procesos infecciosos se resuelven con cursos cortos de tratamiento, pero es cada vez más frecuente encontrar en nuestra práctica y en los reportes científicos ejemplos de una amplia resistencia a los antibióticos (Ponce et al. 2019, p. 681).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) menciona que la resistencia a los antimicrobianos es una de las diez principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad, por el uso inadecuado de medicamentos, falta de saneamiento, control inadecuado en el tratamiento de infecciones, entre otras (OPS 2018, p.2).

La Sociedad Española de enfermedades infecciosas de Valencia, en el año 2019 incluyó en el marco de seguimiento un nuevo indicador sobre la resistencia antimicrobiana. Mediante este indicador se efectuó el seguimiento de la frecuencia de las septicemias de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), determinando que, en el 2020 se reportó septicemias debidas al SARM en 25 países, por lo que la tasa de prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina es de 12,11% (SEIMC 2019, p. 1).

Las medidas más eficaces para el control de las infecciones por *S. aureus* en general y SARM en particular, son las barreras que limitan su extensión, por lo cual, se requieren más innovaciones e inversiones en investigaciones operacionales y en investigación y desarrollo de nuevos medicamentos antimicrobianos, vacunas y medios de diagnóstico, especialmente los dirigidos contra bacterias críticas que se han convertido en un problema de salud a nivel global (Herrera 2021, p. 5).

## CAPÍTULO I

### 1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Planteamiento del problema

Uno de los microorganismos que ha ocasionado mayor impacto en la salud de la población a nivel global es *S. aureus*, un tipo de Staphylococcus muy común y el más peligroso dentro de este grupo por su alto índice de patogenicidad; lo que ha generado durante años en expertos y científicos una necesidad de buscar un posible tratamiento capaz de erradicar esta bacteria, sin embargo, este patógeno ha demostrado la capacidad de adquirir farmacorresistencia y producir ineficacia terapéutica (Zendejas et al. 2014, p.17).

El primer tratamiento utilizado en infecciones provocadas por *S. aureus* fue la penicilina; aparentemente por un periodo de tiempo corto este medicamento actuaba de manera eficaz, hasta que aparecieron las primeras cepas resistentes, que fueron aisladas y que generaron un mecanismo de resistencia que consiste en la producción de una enzima llamada penicilinasas (codificada por un plásmido), la cual hidroliza el anillo betalactámico de la penicilina (Martin, 2002, p.31).

En 1960 estas colonias de *S. aureus* resistentes a penicilina se propagaron y provocaron una pandemia, que conllevó a la búsqueda de nuevos tratamientos. Es así que a base de la modificación química del primer antibiótico la penicilina se creó un fármaco semisintético la meticilina. No obstante, los reportes iniciales de cepas resistentes a la meticilina (MRSA) asociadas a infecciones nosocomiales fueron publicados en 1961, en las que se encontraron un gen denominado mecA, el cual codifica una proteína de unión a la penicilina de baja afinidad (Cercenado y Ruiz, 2008 p.22).

Más adelante en los años 70 estas cepas MRSA ocasionaron varias olas de contagios en los hospitales de Europa, que fueron tratados con antibióticos como la vancomicina y teicoplanina. A pesar de ello, en 2002 fueron reportados los primeros casos de infecciones provocadas por *S. aureus* resistentes a vancomicina (VRSA) al igual que cepas con una susceptibilidad reducida a la teicoplanina (Castellano y Perozo, 2010, p.5).

A diferencia de la penicilinasas, la resistencia a la meticilina confiere un amplio espectro de resistencia a antibióticos betalactámicos que incluyen penicilinas, cefalosporinas y carbapénicos.

Además, que las infecciones provocadas por *S. aureus* no solamente se dan a nivel hospitalario sino también a nivel comunitario (Quesada, 2010, p.12).

Es importante analizar esta problemática y generar alternativas terapéuticas, pues la habilidad que posee *S. aureus* para adquirir resistencia a antibióticos, la convierte en uno de los patógenos más letales y por ende una de las mayores amenazas para la salud pública y global.

## **1.2. Justificación**

Los microorganismos han ido generando mecanismos evasivos a antibióticos, desde la utilización de la penicilina hasta antibióticos más resistentes. Esta farmacorresistencia es un gran problema que atraviesan los sistemas de salud. Según datos establecidos por la OMS se proyecta que para el año 2050 se evidenciará mayor resistencia bacteriana lo que ocasionaría por lo menos la muerte de diez millones de personas al año en el mundo (Parra y Zapata, 2020, p.1).

Se realizó un análisis global que indica que de todos los patógenos que generan resistencia *S. aureus* se encuentra en una categoría de Prioridad 2 – Elevada, en específico el *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) que representan más del 20% y según reportes podrían llegar a ser hasta más del 80%. Solo en China la proporción fue del 44,6% en el 2014. En Estados Unidos MRSA causó más de 80.000 infecciones y más de 11.000 muertes durante el año; pues una vez que alcanza el torrente sanguíneo causa la muerte del 10 – 30% de los pacientes (Niola et al. 2020, p.3).

Dado el peligro que constituyen las cepas de MRSA para la comunidad y pacientes hospitalizados y su alto rango de resistencia a antibióticos, se ha considerado en las últimas décadas diferentes alternativas de terapia que incluyen: terapia de fagos, combinación de antibióticos, probióticos y péptidos antimicrobianos. Siendo una de las estrategias que mayor eficacia ha alcanzado en ensayos in-vitro la sinergia de antibióticos. La cual consiste en combinar antibióticos ya aprobados que individualmente no presentan eficacia, pero en combinación su efectividad es significativa e incluso puede ser comparable al uso de antibióticos de última generación (Canut et al. 2020, p.5).

Por otro lado, el desarrollo de nuevos principios activos no es lo suficientemente satisfactorio, pues la formulación no es tan rentable para las compañías farmacéuticas debido al tiempo prolongado de los ensayos (10 a 15 años); y el costo promedio de 2.500 millones de dólares; es por esto que surgen otras alternativas. Se ha evidenciado en diferentes estudios que las

combinaciones de antibióticos presentan efectos sinérgicos, actuando en la inhibición del crecimiento microbiano con dosis menores que las que se requieren de manera individual (Hernández, 2014, p.21).

Para seleccionar la combinación antibiótica más idónea se debe considerar los beneficios y perjuicios posibles de cada fármaco, para lo cual se evalúan parámetros como el mecanismo de acción, la interacción con el órgano diana, las reacciones adversas (asociados son ototoxicidad y nefrotoxicidad) y el coste. La combinación planteada es amoxicilina más levofloxacina, pues se pretende que la amoxicilina sea la puerta de entrada para que se genere la acción de la levofloxacina frente a una cepa MRSA ya que, la amoxicilina inhibe la síntesis del peptidoglucano de la pared celular, mientras que la levofloxacina impide la síntesis de ácidos nucleicos, provocando así la muerte de la bacteria (Alvo et al. 2016, p.10).

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

### **1.3. Objetivos**

#### ***1.3.1. Objetivo general***

Evaluar el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y levofloxacina frente a una cepa de *S. aureus* resistente a meticilina.

### ***1.3.2. Objetivos específicos***

- Determinar la concentración mínima inhibitoria de la combinación de amoxicilina y levofloxacina frente a MRSA.
- Comparar la eficacia que presenta la sinergia de la combinación antibiótica con la eficiencia de los antibióticos por monoterapia.
- Comprobar la eficacia de la combinación con respecto al Linezolid frente a MRSA.

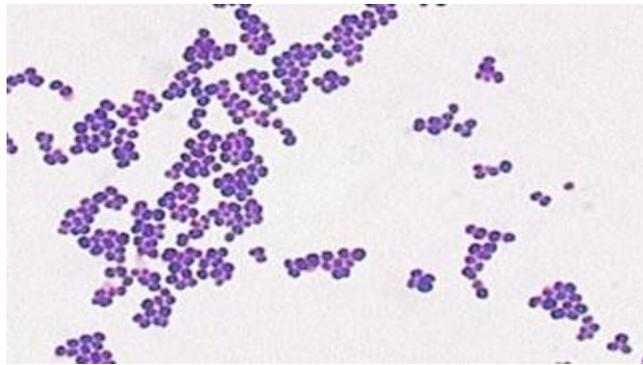
## **CAPÍTULO II**

### **2. MARCO TEÓRICO**

## 2.1. Referencias teóricas

### 2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria que pertenece a la familia Staphylococcaceae, se caracteriza por ser inmóvil, gram positiva, su tamaño varía entre 0,8 y 1,5 micrómetros de diámetro (ilustración 1-2). En cuanto a su metabolismo son anaerobios facultativos, coagulasa positiva, catalasa positiva y oxidasa negativa. En cuanto a su morfología posee colonias brillantes, lisas y convexas que poseen un endopigmento de un color que va desde el amarillo hasta blanco porcelana dorado, por lo cual se le denominó “aureus”. Para que se dé su crecimiento requiere un rango de temperatura de 30-40° C y el medio de cultivo ideal es el agar sangre (Cervantes et al. 2014, p.1).



**Ilustración 1-2:** *Staphylococcus aureus*

**Fuente:** Cervantes et al. 2018.

Esta bacteria forma parte de la microbiota de la piel y coloniza alrededor del 30% de las fosas nasales de un individuo sano. Se considera un microorganismo patógeno ya que causa una gran variedad de infecciones: problemas dérmicos como los forúnculos, ampollas, vejigas y abscesos cutáneos y otras patologías como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock toxico (SST) y sepsis (Cadena et al. 2018, p.2).

#### 2.1.1.1. Epidemiología

*S. aureus* es un patógeno importante, ya que forma parte de la microbiota humana, aunque su colonización más frecuente es a nivel de la mucosa nasal. Existe mayor probabilidad de adquirir

alguna infección en las unidades hospitalarias, en especial, pacientes inmunodeprimidos con diabetes, hemodiálisis, afecciones cutáneas, VIH o pacientes con algún tipo de adicción (Pasachova et al. 2019, p. 25).

También pueden darse casos donde el portador nasofaríngeo es asintomático y esto se relaciona con la presencia de MRSA, siendo frecuente en casos de bacteremias, heridas quirúrgicas y neumonía en pacientes ventilados. En los últimos años se ha observado que esta bacteria ha adquirido mayor resistencia a diversos antibióticos que se usaban generalmente para su tratamiento (Pasachova et al. 2019, p. 26).

## **2.1.2. Patogenicidad**

### **2.1.2.1. Infección de *S. aureus***

La septicemia por *S. aureus* se clasifica en tres categorías:

- Relacionadas con centros asistenciales de salud (nosocomiales).
- Adoptado en la comunidad.
- Asociadas con la comunidad inicio de la salud (no nosocomiales).

Además, entre las patologías que causan se encuentran las enfermedades mediadas por toxinas: síndrome de la piel escaldada, el síndrome del choque tóxico e intoxicación alimentaria. Entre las infecciones supurativas se encuentra el impétigo, carbunco, bacteriemia, endocarditis o endocarditis infecciosa, neumonía necrotizante, osteomielitis, artritis séptica, entre otras (Cervantes et al. 2014, p.14).

### **2.1.2.2. Factores de virulencia**

Los factores de virulencia de *S. aureus* están relacionados con su capacidad para adherirse a las superficies, las diferentes interacciones contra el sistema inmune y el modo en que produce los efectos tóxicos, como se indica a continuación:

- Genoma: está compuesto por plásmidos y pares de bases. Ejemplo: Plásmido pUSA02 (gen tetK) que codifica la resistencia a tetraciclina y plásmido pUSA03 (genes ermC y ileS) que codifica la resistencia a macrólidos, lincosamidas estreptogramina B y mupirocina.
- Islas de patogenicidad: formada por un elemento móvil catabólico arginina, ACME – cepa USA300, SCCmec – gen mecA y vSaα y vSaβ. Su función es persistir y prosperar en diferentes ambientes, da resistencia a la meticilina y codifica genes de virulencia como la leucocidina y los superantígenos.

- Profago: es otro tipo de elemento móvil que posee ciertos genes. Ejemplo: Sa2USA – Toxina PVL es una proteína (LukS-PV y LukF-PV) que provocan muerte celular y Sa3USA: codifican las estafiloquinasas y proteínas inhibitoras de quimiotaxis.
- Cápsula mucoide: formado por polisacáridos celulares (11 serotipos) y la función es facilitar la adherencia y posee capacidad antifagocitaria contra los neutrófilos PMN.
- Biopelícula: matriz extracelular formada por: exopolisacaridos, proteínas y ácidos nucleicos y la función es proporcionar un mecanismo de resistencia bacteriana. (Galli et al., 2019).
- Pared celular: formado por dos componentes como el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano, la parte hidrofóbica del ácido lipoteicoico se encarga de la adherencia; y la parte básica es el peptidoglicano que le confiere resistencia y tolerancia osmótica.
- Enzimas: existen diversas enzimas como las Hemolisinas (alfa, beta, gamma, delta), Leucocidinas, proteína fijadora al colágeno, proteína fijadora de fibronectina, el factor de agregación (clumping factor) y la coagulasa.

También se encuentran la proteína A, catalasas, nucleasas, lipasas, proteasas, penicilinasas y estafiloquinasas. En cuanto a su función, las hemolisinas tienen capacidad hemolítica y citolítica, actuando sobre determinadas células del huésped, como leucocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos, mientras que, la proteína A bloquea la fracción Fc de las IgG, inhibe la opsonización y la fagocitosis. Actúan destruyendo los desmosomas del estrato granuloso.

- Toxinas: están formadas por toxina Pantón-Valentine (PVL) - regulada por el gen agr, y la toxina exfoliativas o epidermolíticas: A y B (ETA y ETB).
- PVL: es una leucocidina formadora de poros.
- Superantígenos: son exotoxinas pirógenas (TSST-1) y las enterotoxinas estafilocócicas que su función es impedir la activación del sistema inmune a través de un contacto normal entre las células presentadoras del antígeno y los linfocitos (Suárez A., 2017).

### **2.1.3. Tipos de MRSA**

#### **2.1.3.1. CA-MRSA**

*Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquirido en la comunidad tuvo su aparición en los años 90 los primeros casos en pacientes sin antecedentes de hospitalización. Estos se asocian a infecciones piógenas de piel y tejidos blandos; presentan resistencia a todos los  $\beta$ -lactámicos como la penicilina, oxacilina y cefalosporinas y son sensibles a una gran parte del resto de fármacos. Este mecanismo se confiere por el gen mecA, localizado en un elemento genético móvil

llamado cassette cromosomal estafilocócico (SCCmec) que codifica una proteína de unión a la penicilina (PBP2a) la cual no permite la unión a los  $\beta$ -lactámicos (Gómez, et al. 2008).

#### 2.1.3.2. HA-MRSA

*Staphylococcus aureus* meticilina resistente adquiridos en el hospital o nosocomiales se caracterizan por neumonías y sepsis. Se ha asociado HA-MRSA a varios factores de riesgo, entre los cuales tenemos: hospitalización reciente y permanencia en unidades de cuidados intensivos (UCI); con el agravante de que los trabajadores de la salud y los pacientes colonizados por MRSA pueden convertirse en nuevos focos de infección. Además de deteriorar la salud de los individuos, las infecciones por HA-MRSA generan una gran carga para las instituciones de salud, por su fuerte asociación con altas tasas de morbilidad y mortalidad y por el incremento en los costos de la estancia hospitalaria (Jiménez et al. 2009, p.1).

#### 2.1.3.3. LA-MRSA

*Staphylococcus aureus* meticilina resistente asociado al ganado (LA-MRSA) se utilizó para referirse a este tercer grupo de cepas de MRSA que se consideraban un reservorio en los animales de ganado. Es diferente de otros tipos de MRSA, como las cepas hospitalarias o comunitarias, que se encuentran con más frecuencia en humanos. No se transmite tan fácilmente de una persona a otra. Sin embargo, se ha descubierto que las personas que viven con trabajadores ganaderos pueden ser colonizados (Crespo et al. 2021, p.5).

#### 2.1.3.4. Cepas más relevantes

- *COL*

También conocida como NRS100 es una cepa arcaica de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) del Reino Unido. La cepa COL se depositó como resistente a la tetraciclina; positivo para mec (subtipo I) y también posee una gran variedad de factores de virulencia (Gill, 2014, p.10).

- *USA300*

El *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) del tipo USA300 de electroforesis en gel de campo pulsado surgió probablemente a principios de la década de 1990, es el causante de la mayoría de las infecciones por CA-MRSA. Este linaje es portador de los genes de la leucocidina Pantón-Valentine (PVL) y del cromosoma de cassette estafilocócico mec (SCCmec)

tipo IV, se convirtió en el tipo de cepa predominante de MRSA que circulaba en Estados Unidos en 2011 (Carrel et al. 2015, p.11).

- *USA400 o MW2*

Es un linaje muy común en Estados Unidos y en Europa es muy rara. Sin embargo, fue aislada a finales de noviembre de 2007, en una mujer italiana de 36 años que fue atendida en el Hospital de Pordenone por lesiones cutáneas tipo picadura de araña en la cara, caracterizadas por una rápida evolución a furúnculos y abscesos. Esta clase se asocia a HA-MRSA (Vignaroli et al. 2009).

#### **2.1.4. Resistencia bacteriana**

Se entiende por resistencia microbiana a la supervivencia de las bacterias, debido a la capacidad que estas generan de desarrollar diferentes mecanismos en presencia de una presión selectiva negativa (antibiótico, antiséptico, desinfectante, anticuerpos, complemento, células macrófagas, metales pesados). Las bacterias son naturalmente resistentes a varios antibióticos, ya que algunas son productoras de ciertas sustancias específicas para eliminar microorganismos que compiten con ellas en el mismo medio (Guevara, 2020, p. 4).

La resistencia clínica a los microorganismos patógenos ocurre cuando la concentración mínima inhibitoria del fármaco para una cepa particular excede a aquella que es capaz de alcanzarse *in vivo* en forma segura. Este mecanismo se puede originar por mutación en el gen que determina la sensibilidad/resistencia al agente; y por adquisición de un DNA extracromosomal (plásmido) que contiene genes de resistencia. Muchas cepas han desarrollado entereza a los efectos de los antibióticos; si a los pacientes infectados se les administra antibióticos, estos destruyen las cepas que no son resistentes y sobreviven las cepas resistentes (Mayer. 2016, p.15).

##### **2.1.4.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos**

- *Evolución de los mecanismos de resistencia*

Se han descrito, al menos, tres mecanismos de resistencia de *S. aureus* a los  $\beta$ -lactámicos, que generalmente se relacionan entre sí: producción de  $\beta$ -lactamasas, fenómenos de tolerancia y

resistencia por proteínas fijadoras de penicilina (PBP) modificadas o supernumerarias, conocida como resistencia intrínseca a meticilina (Castellano, 2010, p.20). Las cefalosporinas y las penicilinas resistentes a la penicilinas, poseen una estructuración molecular que cohibe la acción de la  $\beta$  - lactamasa. No obstante, el género *Staphylococcus* ha incrementado sus mecanismos sobre todo de resistencia mucho más complejos de los existentes frente a este grupo de antimicrobianos. (Moujir, 2018, p.2).

#### 2.1.4.2. Resistencia contra antibióticos betalactámicos

- *Mecanismo de acción de la penicilina*

Impide la síntesis de la pared de los microorganismos al inhibir la enzima transpeptidasa, acción que evita la formación del peptidoglucano, y por lo tanto el entrecruzamiento de éste que proporciona rigidez y fuerza a la pared de la bacteria.

- *Resistencia a penicilina*

El mecanismo de resistencia esta mediada por la generación de betalactamasas que son producidas por la penicilinas, que hidroliza exclusivamente a las penicilinas. Este fenotipo de resistencia implica a todas las penicilinas excepto las semisintéticas, como la oxacilina y la cloxacilina. Los genes que las codifican en general están localizados en plásmidos de pequeño tamaño que se pueden transferir de célula a célula por transducción (Ardanuy et al. 2011, p.10).

#### 2.1.4.3. Resistencia de antibióticos no betalactámicos

- *Mecanismo de acción de la meticilina*

Ejerce su acción en la formación de peptidoglicano al momento del enlazamiento de la enzima transpeptidasa que es utilizada en la formación de los enlaces emparejados. (D-alanil-alanina).

- *Resistencia a meticilina*

El mecanismo de resistencia se asocia a la síntesis de PBP (que puede ser PBP2a ó PBP2') de 78 kDa, la cual, posee una baja afinidad a la meticilina y a los demás antibióticos  $\beta$  -lactámicos. El

determinante genético de esta proteína presenta una naturaleza cromosómica (gen *mec*), que tiene loci distintos, el *mecA* se encarga de codificar la PBP2a, mientras que, el *mecR* es conocido como el gen regulador. Las cepas SARM con resistencia intrínseca o verdadera hacia la meticilina poseen marcadores de los genes *mecA* y PBP2a (Córdoba, 2015, p.18).

#### **2.1.5. Diagnóstico**

Para realizar el diagnóstico de esta bacteria es necesario considerar los datos clínicos y epidemiológicos con el fin de orientar la adecuada valoración microbiológica. En el caso de existir alguna sospecha que esta bacteria cause alguna infección, se requiere realizar un aislamiento y la identificación de *S. aureus* a partir de una muestra clínica, que pueden ser: sangre, líquidos normalmente estériles, tejidos o aspirados de abscesos; los cuales deben pasar por un proceso de tinción Gram con el fin de identificar la forma y el modo de agrupación bacteriano, también se visualiza leucocitos y polimorfonucleares. (Cervantes, 2018, p. 31).

#### **2.1.6. Medios de cultivo**

Se define a los medios de cultivo como el conjunto de nutrientes que brindan las condiciones adecuadas para facilitar el crecimiento, desarrollo bacteriano y su metabolismo. Estos medios deben ser puros, por lo cual, su composición a nivel cualitativo y cuantitativo es conocida y según su estado físico pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos (Ortega et al., 2018, p.5):

**Tabla 1-2:** Tipos de medios de cultivo

MEDIOS DE CULTIVO	GENERALIDADES	EJEMPLO
<b>Medios simples</b>	Son medios que permiten el crecimiento de diferentes cepas bacterianas.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar nutritivo</li> <li>• Caldo nutritivo</li> </ul>
<b>Medios enriquecidos</b>	Son medios simples a los cuales se añade ciertas sustancias que aporten al crecimiento bacteriano y neutralicen agentes que inhiban el crecimiento de los microorganismos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar sangre</li> <li>• Medio de Lowenstein-Jensen</li> <li>• Agar desoxicolato lactosa</li> </ul>
<b>Medios selectivos</b>	Son medios a los cuales se agregan componentes químicos nocivos para bacterias que no sean de interés.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar Mac-conkey</li> <li>• Thayer Martin</li> <li>• Caldo lactosa bilis verde brillante</li> </ul>
<b>Medios diferenciados</b>	Son medios a los que se agregan ciertas sustancias para lograr el crecimiento específico de una bacteria, diferenciando sus colonias de otras bacterias.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar sangre</li> <li>• Agar azul de metileno</li> <li>• Agar Salmonella-Shigella</li> </ul>

Fuente: BIOCEN, 2021.

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

#### 2.1.6.1. Medios de aislamiento para *S. aureus*

En los medios de cultivo tradicionales la mayoría de las especies crecen después de incubarse durante 18-24 horas, formando colonias de 0.5-1.5 mm de diámetro. Las colonias de *S. aureus* se observan lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, presentan consistencia cremosa y pigmentación que va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides, y la mayoría de las cepas producen  $\beta$ -hemólisis o hemólisis total alrededor de las colonias cuando se cultivan en agar sangre.

Esta bacteria se diferencia de las demás especies por producir coagulasa que se manifiesta por su capacidad para coagular el plasma, es resistente al calor, a la desecación y puede crecer en medios con grandes cantidades de NaCl (7.5%). También crece bien en medios de cultivos no selectivos, como el agar sangre, agar chocolate, cerebro corazón infusión agar (BHI, por sus siglas en inglés) y medios líquidos para hemocultivo. Se debe considerar el uso de un medio selectivo en muestras clínicas donde hay bacterias Gram negativas junto con *S. aureus* (Cervantes y Salazar, 2018, p. 30).

El medio recomendable y usado por la mayoría de los laboratorios es el agar sal manitol o medio de Chapman por su elevado contenido de sal que inhibe el crecimiento de la mayoría de las

bacterias Gram negativas. Este medio permite realizar la identificación presuntiva de *S. aureus* por la pigmentación amarilla característica de esta bacteria. Debido a que esta bacteria fermenta el manitol se genera un cambio de color en el medio que vira de rojo pálido a amarillo. Los *Staphylococcus coagulasa negativos* no fermentan el manitol y crecen en el medio formando colonias pequeñas de color que varía de blanco a rosado (Cervantes y Salazar, 2018, p. 31).

En la actualidad se han desarrollado medios de cultivo que contiene agar base cromogénico específico para la detección de *S. aureus* resistentes a la metilina de muestras clínicas; en presencia de enzimas específicas, los sustratos son modificados y los cromógenos tiñen específicamente las colonias, permitiendo realizar la identificación directa de *S. aureus* (Cervantes y Salazar, 2018, p. 31).

#### 2.1.6.2. Agar triptona soja (TSA)

Es un medio utilizado para propósitos generales, favorece el desarrollo y aislamiento de una gran variedad de microorganismos aerobios, y anaerobios facultativos y estrictos. Al ser suplementado con sangre permite el crecimiento de microorganismos exigentes y la clara visualización de reacciones de hemólisis. En el medio de cultivo, la tripteína y la peptona de soja aportan nutrientes ricos en péptidos, aminoácidos libres, bases púricas y pirimídicas, minerales y vitaminas. La peptona de soja además es fuente de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de diversos microorganismos.

El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el agar es el agente solidificante. Puede ser utilizado como base a la cual se suplementa con nutrientes o con antimicrobianos, lográndose un medio enriquecido o selectivo de acuerdo al aditivo. El agregado de 5-10 % sangre ovina desfibrinada estéril (Britasheep) promueve el desarrollo de bacterias exigentes en sus requerimientos nutricionales y la adecuada observación de las reacciones de hemólisis.

El agregado de extracto de levadura en concentración 0,6 % favorece el crecimiento de especies de *Listeria*. Es un medio adecuado para cultivar y mantener cepas de *Aeromonas*, y aumentando el porcentaje de cloruro de sodio, para mantener cepas de algunos *Vibrios* (Britania S.A., 2018, p. 1).

#### **Tabla 2-2:** Composición del agar

Componente	Cantidad
Tripteína	15
Peptona de soja	5
Cloruro de sodio	5
Agar	15

**Fuente:** Laboratorio Britania.

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

Para realizar la interpretación de resultados se debe tomar en consideración lo siguiente (Britania S.A., 2018, p. 1):

- **Hemólisis alfa:** lisis parcial de los glóbulos rojos. Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia en estudio. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina (compuesto de color verdoso) por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.
- **Hemólisis beta:** lisis total de los glóbulos rojos. Se observa un halo claro, brillante alrededor de la colonia en estudio.
- **Hemólisis gamma:** ausencia de lisis de los glóbulos rojos. El medio de cultivo no presenta modificaciones de color y aspecto alrededor de la colonia en estudio.

#### 2.1.6.3. *Tryptic soy broth (TSB)*

Medio adecuado para el desarrollo de microorganismos exigentes. Es utilizado en el control de esterilidad de productos biológicos, farmacéuticos y cosméticos. La peptona de soja contiene alta cantidad de hidratos de carbono que estimulan el crecimiento de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato dipotásico otorga capacidad buffer (Britania S.A., 2019, p. 1).

**Tabla 3-2:** Composición del caldo TSB

Componente	Cantidad
Tripteína	17 g
Peptona de soja	3 g
Cloruro de sodio	5 g
Fosfato dipotásico	2.5 g
Glucosa	2.5 g
Agua purificada	1000 ml

**Fuente:** Laboratorio Britania.

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

Para realizar la interpretación de resultados se debe tomar en consideración la presencia de turbidez (Britania S.A., 2019, p. 1).

### **2.1.7. Métodos de tratamiento de *S. aureus***

#### *2.1.7.1. Monoterapia*

Es el tratamiento de una enfermedad infecciosa utilizando un solo medicamento. En infecciones por *S. aureus* se utilizan antibióticos como piperacilina/tazobactám en las infecciones de piel y partes blandas; y también cefalosporinas, como la cefazolina, la nafcilina u oxacilina, la vancomicina, la daptomicina, la telavancina y el linezolid (Soriano et al. 2013, p.4).

#### *2.1.7.2. Antibióticos usados en monoterapia*

**Amoxicilina:** Es un antibiótico semisintético que actúa inhibiendo la síntesis de la última etapa de la pared celular bacteriana uniéndose a unas proteínas específicas llamadas PBPs (Penicillin-Binding Proteins) localizadas en la pared celular.

**Levofloxacin:** Es un agente antibacteriano perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas que actúa inhibiendo tanto la topoisomerasa de tipo II (ADN-girasa) como de la topoisomerasa de tipo IV, necesarias para la replicación, la transcripción, la reparación y la recombinación del ADN bacteriano.

**Linezolid:** este fármaco antibacteriano inhibe la síntesis proteica bacteriana por unión al ribosoma y bloqueo de la translación, no es activo frente a infecciones causadas por microorganismos patógenos Gramnegativos. Este debe ser usado en pacientes con infecciones complicadas de piel

y tejidos blandos en los que se sospeche o se tenga la certeza de co-infección por microorganismos Gram-negativos y si no hay otras alternativas terapéuticas disponibles.

Está indicado para: neumonía nosocomial, neumonía adquirida en la comunidad, infecciones de tejidos blandos y afecciones complicadas de la piel (CIMA, 2018, p. 1).

#### *2.1.7.3. Péptidos antimicrobianos*

Son componentes evolutivamente conservados de la respuesta inmune innata. Aunque originalmente fueron descubiertos por sus propiedades microbicidas, su rango de acción se ha incrementado al demostrarse que ejercen actividades inmunomoduladoras y reparadoras de daño. La expresión alterada en diferentes tejidos promueve la patogénesis de varias enfermedades; sus actividades microbicidas se ejercen a través de la formación de poros en membranas de patógenos o inhibiendo el metabolismo al internalizarse en el citoplasma. (Soriano et al. 2013, p.5).

#### *2.1.7.4. Terapia de fagos*

Los fagos, descubiertos hace algo más de un siglo, son virus que presentan una actividad bactericida que infectan bacterias. Además, existe la posibilidad de realizar tratamientos combinados de fagos con antibióticos, así como el uso de fagos modificados genéticamente. El MRSA en un estudio presentó sensibilidad al bacteriófago BK-510 (Guzmán et al. 2019, p.6).

#### *2.1.8. Sinergismo*

Un sinergismo entre dos fármacos es el resultado de la acción de dos o más sustancias que, actuando en conjunto, provocan una respuesta mayor a la suma de los efectos que provocarían por monoterapia. Es así que al actuar en combinación el uno potencia la acción del otro.

La sinergia es la acción conjunta de dos o más sustancias que sean biológicamente activas, para modificar una función o efecto con mayor intensidad. No es necesario que los fármacos ejerzan el efecto en el mismo tejido susceptible, ya que la función fisiológica de los tejidos depende del sistema nervioso y del aparato endócrino, los cuales se pueden ver alterados con la acción conjunta de los fármacos. Existen diferentes tipos de sinergia como se indica a continuación:

**Tabla 4-2:** Tipos de sinergia farmacológica

Tipo	Características
<b>Sinergia de adición</b>	Es el tipo de sinergia más frecuente  La sinergia resulta de la adición del efecto del fármaco A y el efecto del fármaco B
<b>Sinergia de potenciación</b>	Al asociar dos fármacos surge un efecto que supera la el efecto parcial de cada uno de ellos.  Requiere que la acción se ejerza en diferentes tejidos o si actúa en el mismo tejido, su efecto debe producirse en diferentes cadenas de reacciones metabólicas
<b>Sinergia de preservación</b>	Surge cuando la acción de un fármaco causa la prolongación de la duración del efecto del otro medicamento.  Se puede lograr esta sinergia si se perturba la inactivación de un fármaco o si se dificulta su excreción Esta sinergia puede ser también de potenciación
<b>Sinergia de activación</b>	Un fármaco tiene la capacidad de activar a otro.  Puede darse un aumento del efecto del medicamento o puede surgir un nuevo efecto.
<b>Sinergia de sensibilización</b>	Un fármaco es capaz de sensibilizar un tejido para que pueda actuar otro fármaco, considerando que el tejido era indiferente a la acción del mismo.

**Fuente:** Probiotek.

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023

### **2.1.9. Combinación de antibióticos**

La combinación de antibióticos engloba tres situaciones clínicas: lograr sinergia antimicrobiana, ampliar el espectro antimicrobiano y prevenir la aparición de resistencia. Algunas combinaciones de antibióticos podrían funcionar juntas de manera sinérgica: un antibiótico actúa para debilitar una parte de la bacteria, mientras que la otra afecta una estructura clave ejerciendo el efecto deseado en la bacteria (Guzmán et al. 2019, p.10).

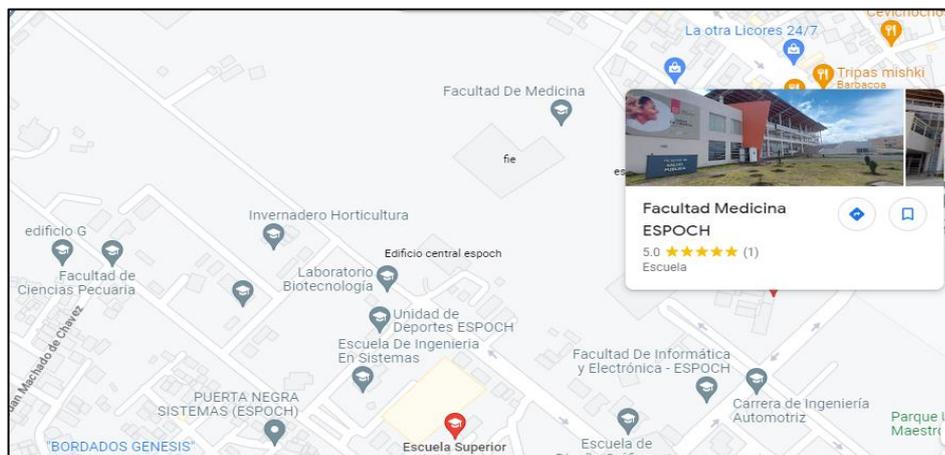
## CAPITULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1. Descripción de los procesos

##### 3.1.1. Lugar de la investigación

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Salud Pública y en el laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ilustración 1-3).



**Ilustración 1-3:** Mapa de la Facultad de Medicina de la ESPOCH

Fuente: Google Maps, 2023.

##### 3.1.2. Tipo y diseño de investigación

El tipo de investigación es experimental pues se realizó un análisis in-vitro del efecto sinérgico de la combinación de dos antibióticos (amoxicilina y levofloxacina) frente a *Staphylococcus aureus* MRSA. Es un trabajo prospectivo ya que se recogieron datos a medida que la variable de estudio es expuesta a factores como los antibióticos. Y de corte longitudinal pues se desarrolló en un periodo de tiempo en el que se realizaron varias replicaciones.

### **3.1.3. Enfoque de la investigación**

El enfoque que presentó es cuali-cuantitativo debido a que en la interpretación de resultados se basó exclusivamente en la observación de la presencia de turbidez en los pocillos sembrados en las microplacas determinado de esta manera la sensibilidad y concentración mínima inhibitoria (CMI) de la bacteria.

### **3.1.4. Alcance de la investigación**

El alcance que presenta es de carácter exploratorio, descriptivo y correlacional; puesto que este tipo de experimentos no son realizados con frecuencia. Además, se hizo una relación entre la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos de estudio de forma individual con la CMI de la combinación. Asimismo, se realizó un análisis descriptivo de la efectividad de la combinación amoxicilina/levofloxacina con un antibiótico de amplio espectro (linezolid) que fue usada como control.

### **3.1.5. Normas aplicadas en la investigación**

El método de la investigación se guió en la Norma Española UNEN-EN ISO 20776-1, que explica la técnica de microdilución en caldo para determinar la actividad in vitro de antibióticos frente a bacterias anaerobias de rápido crecimiento causante de enfermedades contagiosas. (UNE, 2021)

### **3.1.6. Métodos, técnicas e instrumentos de investigación**

El fundamento técnico del experimento consistió en la microdilución en caldo aplicando el ensayo conocido como tablero de ajedrez en microplacas de 96 pocillos que permitió cuantificar las interacciones sinérgicas relativas entre la amoxicilina y levofloxacina. El instrumento usado fue microdilución en caldo según la guía M07-ED 11 del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2018.

### **3.1.7. Materiales, equipos y reactivos**

#### **3.1.7.1. Materiales**

Los materiales usados en el desarrollo del presente estudio se indican a continuación:

**Tabla 1-3:** Materiales utilizados en cada procedimiento

<b>PROCEDIMIENTO</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>Reactivación de la bacteria y Antibiograma</b>	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
	Fósforos	1
	Cinta adhesiva	1
<b>Obtención de la solución</b>	Tubos falcon 15 mL	20
	Erlenmeyer 125 mL	3
<b>Stock de antibióticos y dilución a diferentes concentraciones</b>	Erlenmeyer 500 mL	1
	Probeta 100 mL	1
	Papel aluminio	1
	Pipetas de 5 mL	3
<b>Preparación del cultivo nocturno y medición de la densidad óptica</b>	Pera de succión	1
	Tubos Falcon 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

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

### 3.1.7.2. Equipos

**Tabla 2-3:** Equipos utilizados en cada procedimiento

PROCEDIMIENTO	EQUIPO	FUNCIÓN
1. Antibiograma y reactivación de la bacteria.	Cámara de flujo laminar	Sirve para mantener el ambiente de trabajo libre de contaminación por partículas y/o contaminación cruzada.
2. Obtención de la solución Stock de antibióticos y diluciones de diferentes concentraciones.	Autoclave	Nos ayuda a la esterilización mediante vapor de agua.
3. Preparación del cultivo nocturno y medición de la densidad óptica.	Incubadora	Nos permite mantener una humedad y temperatura adecuadas para el cultivo microbiológico.
4. Determinación de la CMI de las diluciones de antibióticos individual y combinada	Balanza	Medir la masa de una sustancia.
	Refrigeradora	Conservar las muestras a temperatura de 2- 6 °C.
	Espectrofotómetro	Cuantificar sustancias y microorganismos.

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

### 3.1.7.3. Reactivos

**Tabla 3-3:** Reactivos utilizados en cada procedimiento

PROCEDIMIENTO	REACTIVOS	DESCRIPCIÓN
Antibiograma	Agua destilada	Utilizado como solvente para medios de cultivo.
	Agar Müller Hinton	Medio de cultivo sólido para la realización de antibiogramas.
	Discos de antibióticos: meticilina, ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, levofloxacina, azitromicina, vancomicina, linezolid.	Identifican si la bacteria es resistente o sensible mediante la medición de los halos de inhibición.
Obtención de la solución Stock de antibióticos y preparación de las diluciones a diferentes concentraciones	Dimetilsulfóxido (DMSO)	Disolvente orgánico.
Reactivación de la bacteria. Preparación del	Agar Tripton- Soja (TSA)	Medio de cultivo nutritivo sólido de uso general.

cultivo nocturno.	Caldo Soja Trypticaseína (TSB)	Medio de cultivo liquido nutritivo de uso general.
Determinación de la CMI de las diluciones de antibióticos individual y combinada	Disolución de amoxicilina	Preparación de antibiótico de concentración conocida.
	Disolución de levofloxacin	Preparación de antibiótico bactericida de concentración conocida.
	Disolución de linezolid	Preparación de antibiótico antibacteriano que será utilizado como control.

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

### 3.2. Población de estudio

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

#### 3.2.1. Muestra de análisis

Se aplicó un muestreo no probabilístico por conveniencia escogiendo de manera directa la cepa de *S. aureus* MRSA la cual mediante el antibiograma y ensayos bioquímicos específicos se pudo determinar su legitimidad.

##### 3.2.1.1. Criterios de inclusión

Cepa de *S. aureus* resistente a meticilina que presentó resistencia comprobada.

##### 3.2.1.2. Criterios de exclusión

Cepa de *S. aureus* que no presentó resistencia a antibióticos.

### 3.3. Descripción de los procesos

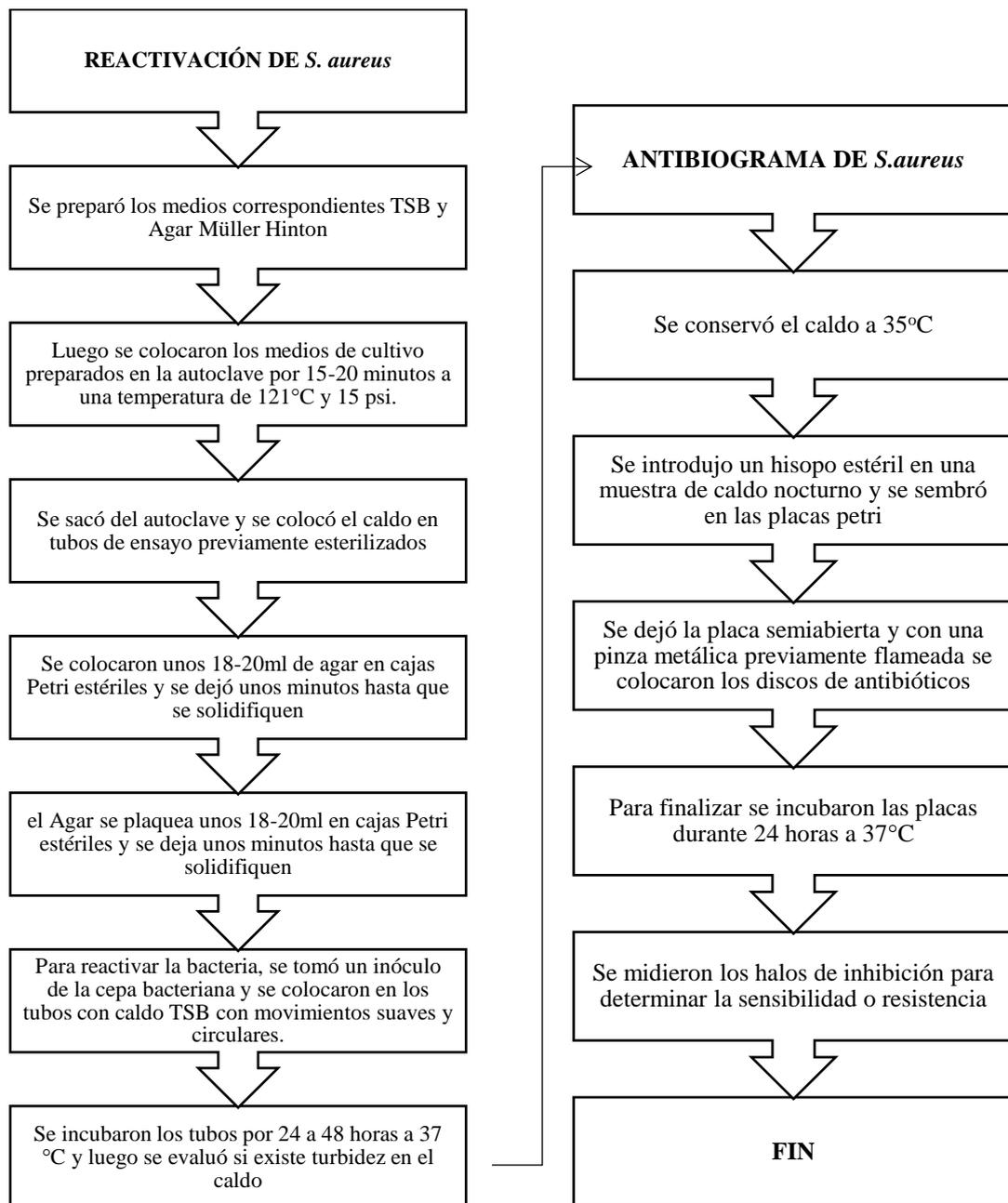
#### 3.3.1. Fases de estudio

Este trabajo se realizó en tres procesos, los cuales se detallan a continuación:

### 3.3.1.1. A) Reactivación y realización del antibiograma de la cepa de *S. aureus*.

El procedimiento que se siguió para la reactivación de la bacteria y el antibiograma fue realizado estrictamente dentro de la cámara de flujo laminar como se observa en la ilustración 2-3:

- Se preparó los medios correspondientes TSB y Agar Müller Hinton de acuerdo con las descripciones del fabricante en agua destilada. Luego se colocaron los medios de cultivo preparados en la autoclave por 15-20 minutos a una temperatura de 121°C y 15 psi.
- Después se procedió a sacar de la autoclave y una vez que los medios estén en condiciones se colocan en tubos de ensayo previamente esterilizados (el caldo); mientras que el Agar se plaqueó unos 18-20ml en cajas Petri estériles y se dejó unos minutos hasta que se solidifiquen.
- Para reactivar la bacteria, se tomó un inóculo de la cepa bacteriana preservada en glicerol con el asa correspondiente previamente flameada. Esta muestra se colocó en los tubos con caldo TSB con movimientos suaves y circulares. Luego estos tubos se procedieron a incubar por 24 a 48 horas a 37 °C (cultivo nocturno).
- Transcurridas las 24 horas se observó la turbidez en el caldo de tal manera que se comprobó el crecimiento bacteriano y con ello se obtuvo la suspensión bacteriana.
- Para el antibiograma se introdujo un hisopo estéril en una muestra de caldo nocturno y se procedió a sembrar en las placas petri previamente preparadas con agar Müller Hinton que debió estar a temperatura ambiente o a 35 °C.
- Se dejó la placa semiabierta y con una pinza metálica previamente flameada se procedió a colocar los discos de antibióticos.
- Para finalizar se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C.



**Ilustración 2-3:** Reactivación y evaluación de la resistencia bacteriana de *S. aureus*

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

*B) Realización de pruebas bioquímicas para la identificación de S. aureus resistente a meticilina*

Se realizaron las siguientes pruebas para comprobar que la cepa de estudio correspondía a *S. aureus*.

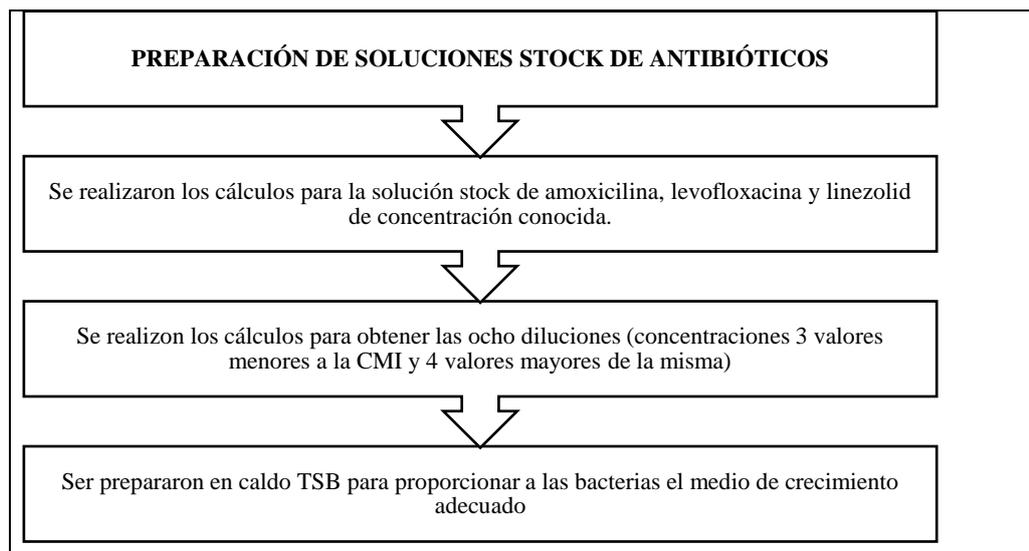
**Tabla 4-3:** Pruebas Bioquímicas para la identificación de *S. aureus*

Prueba	Interpretación
Manitol salado	Medio de cultivo selectivo y diferencial específico para Estafilococos. Es positivo si se presenta fermentación del manitol por lo que en presencia de <i>S. aureus</i> da un viraje de color del indicador rojo de fenol a amarillo.
Coagulasa	Las cepas de esta especie patógenas poseen una enzima capaz de desnaturalizar la fibrina del plasma. Un resultado positivo se da cuando se forma un pequeño coagulo al realizar esta prueba.
Catalasa	Se usa para diferenciar cocos grampositivos por lo que un resultado positivo se da cuando en presencia de peróxido de hidrogeno la muestra de bacteria genera burbujeo.
Citrato	Esta prueba nos ayuda a determinar si un organismo es capaz de usar citrato como única fuente de carbono y compuestos amoniacaes como fuente de nitrógeno en su metabolismo. Da positivo cuando existe un viraje de color.
Movilidad	La prueba de SIM nos ayuda a observar si una bacteria es móvil. Un resultado positivo se da cuando existe turbidez y crecimiento al sembrar la bacteria en el medio.
Ureasa	Este test se utiliza para determinar la capacidad de un organismo de desdoblar la urea formando dos moléculas de amoniaco por acción de la enzima ureasa.

**Realizado por:** Paucar Joselyn, 2023.

#### 3.3.1.2. A) Preparación de las soluciones stock de antibióticos y las diluciones

- Se realizaron los cálculos correspondientes para preparar una solución stock de amoxicilina, levofloxacina y linezolid de concentración conocida. ANEXO
- Una vez obtenida la solución stock se realizaron los cálculos para obtener las ocho diluciones.
- Para preparar las diluciones de antibióticos se consideró que, las concentraciones elegidas fueran 3 valores menores a la CMI encontrada en bibliografía y 4 valores mayores de la misma, y además estas diluciones fueron preparadas en caldo TSB para proporcionar a las bacterias el medio de crecimiento adecuado, como se observa en la ilustración 3-3.

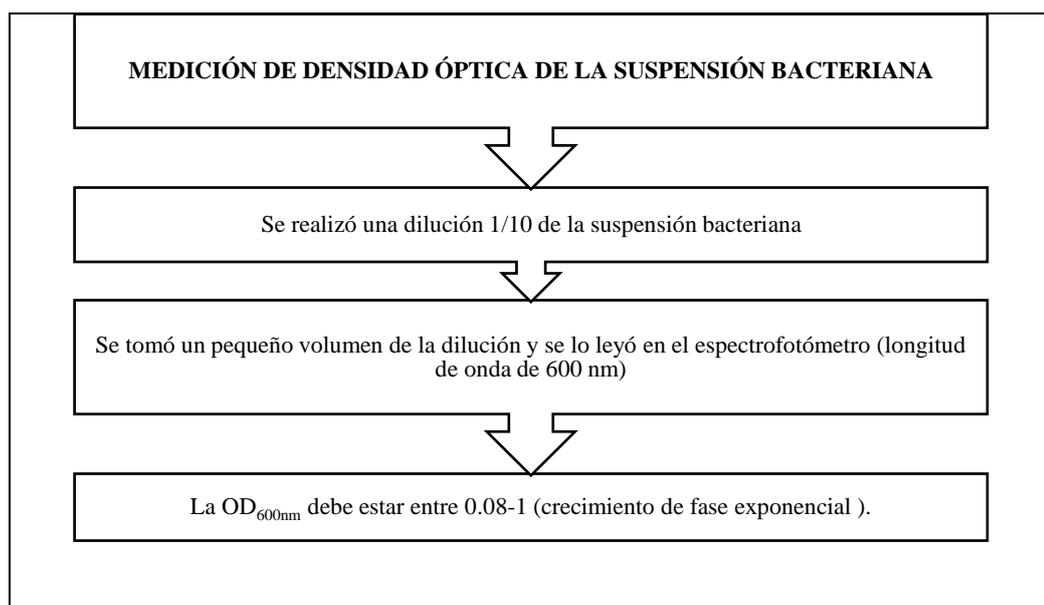


**Ilustración 3-3:** Preparación de solución stock de antibióticos

Realizado por: Paucar Joselyn, 2023.

*B) Medición de la densidad óptica (OD) de la suspensión bacteriana (caldo nocturno)*

- Se realizó una dilución 1/10 de la suspensión bacteriana previamente preparada.
- Luego se tomó un pequeño volumen de la dilución y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm para obtener el valor de la densidad óptica. La OD<sub>600nm</sub> debe estar entre 0.08-1 que es la concentración adecuada donde la bacteria está en crecimiento de fase exponencial, como se indica en la ilustración 4-3.



**Ilustración 4-3:** Preparación de solución stock de antibióticos

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

### 3.3.1.3. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

- *Determinación de la CMI de cada antibiótico*

Para determinar la CMI de la amoxicilina y levofloxacin frente a la cepa de *S. aureus*, se realizó la prueba de microdilución en caldo que consiste en utilizar una placa de poliestireno de 96 micropocillos correspondientes a 12 columnas (1-12) y 8 filas (A-H); donde se colocaron en cada fila una a una las 8 diluciones de antibiótico sea amoxicilina o levofloxacin de manera individual a diferente concentración. Se realizaron 8 repeticiones técnicas de cada concentración en cada microplaca para obtener resultados más exactos y con mayor precisión.

Además, se coloca un blanco que en este caso se utilizó el mismo caldo más suspensión bacteriana en la columna 1 (control de crecimiento bacteriano); y en la fila 12 un control de caldo más suspensión bacteriana y más el antibiótico de amplio espectro que en este caso es el linezolid (control de la actividad inhibitoria). Tabla 5-3.

Cada pocillo tuvo un volumen aproximado de 300  $\mu\text{L}$  y se realizó la siembra usando una micropipeta multicanal automática (8 canales) de volumen variable (5-50  $\mu\text{L}$ ); en cada micropocillo se colocaron 10 $\mu\text{L}$  de dilución de la suspensión bacteriana ( $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.08$ ) y 200  $\mu\text{L}$  de las diferentes diluciones de antibióticos de manera ascendente.

Esto se incubó durante 14 a 24 horas a 37 °C, y posterior a este tiempo se observó la presencia de turbidez en cada micropocillo. Se realizaron tres repeticiones biológicas para que el experimento tenga validez.

**Tabla 5-3:** Técnica de microdilución - distribución del antibiótico (A) Amoxicilina y (L) Levofloxacina

N°		1		2	3		4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Columna		Blanco													Control	
Concentración Diluciones (µg/mL) A/L	A [1]	10µL suspensión bacteriana	200 µL caldo TSB		10µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de antibiótico A - L									10µL suspensi ón bacteria na	200 µL dilución de linezolid (4µg/m L)
	B [2]															
	C [3]															
	D [4]															
	E [5]															
	F [6]															
	G [7]															
	H [8]															

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

- *Determinación del sinergismo de la combinación de antibióticos (amoxicilina y levofloxacinina)*

Para determinar el sinergismo de la combinación planteada se sembró en una microplaca nueva 100µL de la suspensión bacteriana a una OD de 0,08. Trazando un plano cartesiano en la microplaca se colocó en el eje X a partir de la columna 4, 100µL en sentido ascendente de izquierda-derecha las 7 diluciones de diferentes concentraciones del antibiótico A; y en el eje Y partiendo de la fila G de manera ascendente de abajo hacia arriba las 7 diluciones del antibiótico L.

Se realizó cada ensayo por triplicado y se procedió a incubar las microplacas de 14 a 24 horas a 37 °C, y posterior a este tiempo se observó la presencia de turbidez en cada micropocillo.

- *Comprobación de la efectividad de la combinación con un antibiótico de control*

Para comprobar la efectividad de la combinación planteada se utilizó un control que fue sembrado en la microplaca anterior; colocando en la columna 1 (200µL caldo + 10 µL de la suspensión bacteriana); tomando el micropocillo 3H como el punto de referencia de crecimiento bacteriano (10 µL de suspensión bacteriana + 200 µL de caldo).

Se completó la microplaca ubicando en la columna 4 la concentración más baja del antibiótico A de tal manera que la columna 10 contuvo la concentración más alta.

Cada uno de los ensayos se los realizó por triplicado y después de las 14-24 horas de incubación de las microplacas se compararon los resultados obtenidos con el control.

**Tabla 65-3:** Técnica de microdilución de la combinación - distribución del antibiótico A (Amoxicilina) vs el antibiótico L (Levofloxacina)

N°			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Columna												CONTROL	
[ ] LEVOFLOXACINA (µg/mL)	A	12										10µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de linezolid 4 µg/mL
	B	6											
	C	3											
	D	1.5											
	E	0.75											
	F	0.5											
	G	0.25											
	H	0											
Y			0	0.5	1	2	4	8	12	32		[ ] AMOXICILINA (µg/mL)	
En cada micropocillo se agrega 10µL de la suspensión bacteriana con OD <sub>600nm</sub> : 0.08 y 100 µL dilución amoxicilina más 100 µL de la dilución de levofloxacina de acuerdo con las concentraciones establecidas en la tabla													

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

- *Análisis de los resultados*

Para realizar el análisis de los datos obtenidos se determinó la concentración mínima inhibitoria tanto de las diluciones de amoxicilina y levofloxacina como de la combinación de ambas mediante una técnica de observación directa constatando la presencia de turbidez en cada uno de los pocillos de las microplacas. Las concentraciones inhibitorias fraccionarias (FIC) se calcularon aplicando la siguiente ecuación:

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

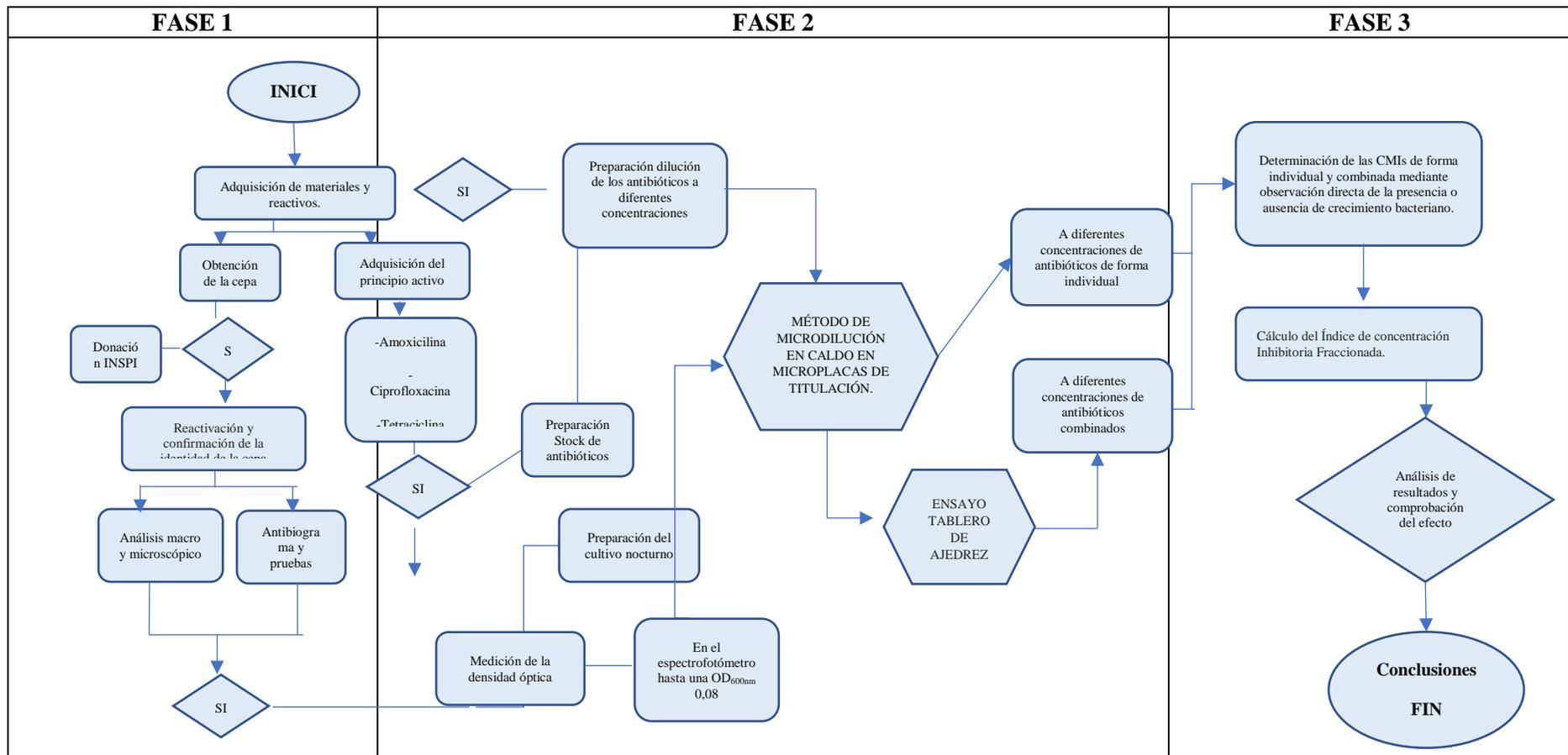
Según los valores determinados de CIF se interpreta:

Si CIF < 0,5 presenta sinergismo

Si CIF = 1 indica adición

Si CIF entre 2 ó 4 corresponde a antagonismo

Los resultados de los datos de índice inhibitorio fraccionario obtenidos permitió determinar si existía sinergismo al combinar amoxicilina más levofloxacina frente a *S. aureus* MRSA.



**Ilustración 5-3:** Flujograma de métodos y técnicas usados en cada fase de la investigación

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

## CAPÍTULO IV

### 4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de la reactivación y comprobación de la autenticidad de la cepa bacteriana de *S. aureus*.

#### 4.1. Análisis de la morfología macroscópica y microscópica de la cepa bacteriana de estudio y pruebas bioquímicas

**Tabla 6-4:** Análisis macroscópico, microscópico y pruebas bioquímicas de la cepa *S. aureus* resistente a meticilina

ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO	
Tipo de análisis	Resultados
Macroscópico	Colonias lisas, brillantes y convexas de color amarillo-naranja.
Microscópico	Cocos gram positivos coloración violeta.
PRUEBAS BIOQUÍMICAS	
Catalasa	Positiva (no fermentadora de glucosa).
Coagulasa	Positiva.
Citrato	Negativa.
Manitol	Positiva (se aprecia que es <i>S. aureus</i> ).
Movilidad	Negativa.
Ureasa	Negativa.

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

Como se indica en la Tabla 1-4, en la evaluación macroscópica, la cepa de *S. aureus* formó colonias lisas y convexas de color amarillo naranja brillante; mientras que, en la tinción gram se observaron cocos gram positivos que generalmente se encuentran en forma de racimos o sueltos. Estas características son similares a las reportadas en un estudio de la Universidad de Buenos Aires sobre “Estafilococos y estreptococos”, donde se describe que *S. aureus* se caracteriza por formar colonias doradas brillantes y que al realizar la tinción gram, se observan formas cocoides agrupadas y sueltas (San Juan, 2019, p.5).

Respecto a las pruebas bioquímicas se obtuvo un resultado positivo para catalasa, coagulasa y manitol; por el contrario, las pruebas de citrato, movilidad y ureasa son negativas, lo que confirma que la cepa tratada corresponde a *S. aureus*.

De acuerdo a un estudio realizado en México sobre “Microbiología general de *Staphylococcus aureus*”, se determinó que, la bacteria posee enzimas como: coagulasa (encargada de convertir el fibrinógeno en fibrina), catalasa (descompone el peróxido de hidrógeno), lipasa (hidroliza lípidos), fibrolisina (disuelve aquellos coágulos de fibrina), entre otras, por lo que dan positivo para estas pruebas bioquímicas (Zendejas et al. 2018, p. 133).

Otra prueba característica para la identificación de *S. aureus* es el cultivo en agar sal manitol, el cual, se encarga de inhibir el crecimiento de las bacterias gram negativas, dando como resultado la identificación presuntiva de *Staphylococcus aureus*, ya que la bacteria es capaz de tolerar altas concentraciones de sal y tiene la capacidad de fermentar el manitol, provocando un cambio de color del medio de cultivo, de rojo a amarillo (Cervantes et al. 2018, p. 31).

#### 4.2. Antibiograma

**Tabla 7-4:** Halos de inhibición comparados con los puntos de corte de CLSI

Antibiótico	Contenido del disco	Resultados obtenidos medición de halos	
		M (mm)	S / I / R
ME	5 µg	0	R
C	30 µg	30	S
P	10 µg	26	R
LEV	5 µg	22	S
VA	30 µg	15	S
AX	25 µg	19	R
LZD	10 µg	17	S

Fuente: Registro de la investigación

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

**Nota:** **S:** sensible; **I:** Susceptibilidad intermedia; **R:** Resistente. Meticilina (ME), Cloranfenicol (C), Penicilina (P), Levofloxacina (LEV), Vancomicina (VA), Amoxicilina (AX), Linezolid (LZD). Puntos de corte correspondientes a *S. aureus* tomados de CLSI 2020.

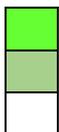
En la Tabla 2-4 se presentan los resultados del antibiograma de la cepa de *S. aureus*, donde se observó resistencia a la meticilina, levofloxacina, amoxicilina y penicilina; y presentó sensibilidad al cloranfenicol, levofloxacina, vancomicina y linezolid.

De acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CSLI), los principales agentes antimicrobianos que se sugiere para realizar el análisis de *Staphylococcus spp.* son azitromicina, claritromicina, eritromicina, meticilina y penicilina, además, en caso de presentar resistencia a los antibióticos mencionados anteriormente, se puede incluir el uso de medicamentos como linezolid, vancomicina, cloranfenicol y quinolonas (CSLI 2021, p. 21).

Según el Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana, *S. aureus* es resistente en un 90% a la penicilina, así como a la oxacilina y ciprofloxacino, mientras que es susceptible al linezolid, vancomicina y gentamicina, lo que coincide con los datos obtenidos en este estudio (Cavalieri et al. 2005, p.10),

#### 4.3. Determinación de la CMI individual de Amoxicilina y Levofloxacina frente a *S. aureus* resistente a meticilina

**Tabla 8-4:** Representación de la CMI de Amoxicilina en microplacas de 96 pocillos

N° Columnas microplacas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A: 0.50	<b>CONTROL PARA CRECIMIENTO BACTERIANO</b>											<b>CONTROL</b>
B: 1												
C: 2												
D: 4												
E: 8												
F: 16												
G: 32												
H: 64												
<b>Nota:</b>	 <p><b>Turbio</b>  <b>Ligeramente turbio</b>  <b>Ausencia de turbidez</b></p>											

**Fuente:** Registro de la investigación

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

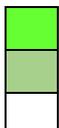
La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja del antibiótico en  $\mu\text{g/mL}$ , que puede inhibir el crecimiento bacteriano y además, es una prueba cuantitativa de sensibilidad que permite determinar el antibiótico más eficaz (IDEXX 2022, p. 1).

Para el análisis se utilizó el método de dilución, que se basa en la presencia o ausencia del crecimiento microbiano en un caldo con interferencia de un antibiótico, lo que se comprueba visualmente a través de la formación de turbidez. Este método es efectivo para determinar la CMI de los antimicrobianos en un gran número de muestras (Pérez y Rivas 2021, p. 6).

Los datos presentados en la Tabla 3-4 indican que, cuando la amoxicilina tiene una concentración menor a 1 µg/mL, no tiene ningún efecto sobre la bacteria (lo que se evidencia con la turbidez de la dilución); mientras que, si el medicamento tiene una concentración entre 1-4 µg/mL genera una ligera acción frente a la bacteria (medio ligeramente turbio). Además, se determinó que, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la amoxicilina es de 8 µg/mL, ya que no hubo turbidez.

Un estudio realizado en España sobre “Sensibilidad bacteriana a los antibióticos comerciales amoxicilina y ciprofloxacino” determinó que, la CMI de la amoxicilina para *Staphylococcus aureus* fue de 7,5 µg/mL, siendo similar al resultado obtenido en este estudio. Además, este medicamento se caracteriza por ser bactericida debido a que impide la unión a nivel de la cadena de peptidoglicano, evitando la formación de la pared celular e induciendo la muerte bacteriana (Varela 2018, p. 10).

**Tabla 9-4:** Representación de la CMI de Levofloxacina en microplacas de 96 pocillos

N° Columnas microplacas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Concentración Diluciones (µg/mL)	A: 0.25	<b>CONTROL PARA CRECIMIENTO BACTERIANO</b>											<b>CONTROL</b>
	B: 0.50												
	C: 0.75												
	D: 1.5												
	E: 3												
	F: 6												
	G: 12												
	H: 24												
<b>Nota:</b>	 <p><b>Turbio</b> <b>Ligeramente turbio</b> <b>Ausencia de turbidez</b></p>												

Fuente: Registro de la investigación

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

Como se observa en la Tabla 4-4, cuando el levofloxacino está a una concentración menor de 0,50 µg/ml no presenta ninguna acción sobre la bacteria (dilución turbia); y a una concentración entre 0.50-1.5 µg/mL se evidencia un ligero efecto del antibiótico frente a *S. aureus* (medio ligeramente turbio). Es así que se determinó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la levofloxacina en este estudio es de 3 µg/mL, lo que indica que, es la concentración más baja a la cual este medicamento puede inhibir el crecimiento bacteriano (ausencia de turbidez).

La levofloxacina es un medicamento que pertenece al grupo de las quinolonas, presenta un espectro de acción que incluye a bacterias gram negativas y gram positivas, además, se caracteriza por ser bactericida ya que inhibe la formación del ADN de la bacteria (AEMPS 2018, p. 1).

Un estudio realizado en España sobre “Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos”, determinó que, a una concentración de 2 µg/mL de levofloxacina, se pueden inhibir las bacterias ya que es el punto de corte del crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Picazo 2019, p. 15). Los resultados reportados son similares a los obtenidos en este estudio, debido a que se evaluó la CMI a una concentración de 1,5 µg/mL y 3 µg/mL, donde se empezó a observar el efecto antibacteriano.

**Tabla 10-4:** Resultados de las tres replicas biológicas de la CMI de amoxicilina y levofloxacina

Inóculo	Antibiótico	CMI replica 1	CMI replica 2	CMI replica 3
10 <sup>6</sup> ufc/mL	Amoxicilina	8 µg/mL	8 µg/ml	8 µg/mL
10 <sup>6</sup> ufc/mL	Levofloxacina	3 µg/mL	3 µg/mL	3 µg/mL

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

En la Tabla 5-4 se indican los resultados obtenidos de las tres replicas biológicas de la concentración mínima inhibitoria de la amoxicilina y la levofloxacina, señalando que hubo una CMI promedio de 8 µg/mL en la amoxicilina y 3 µg/mL para la levofloxacina, validando de esta manera los resultados obtenidos.

En un estudio similar, llevo a cabo en la Universidad de Buenos Aires sobre “Actividad *in vitro* de ampicilina-ceftriaxona frente a aislamientos de *Enterococcus faecalis* recuperados de infecciones invasivas”, utilizaron la técnica de diluciones en caldo Mueller-Hinton con el agregado de concentraciones subinhibitorias del medicamento, precisando que esta técnica permite obtener resultados fiables frente a algunas cepas de estudio clínico con resultados más exactos (Moreira et al. 2019, p. 58).

#### 4.4. Evaluación del sinergismo *in vitro* de la combinación de Amoxicilina y Levofloxacina frente a *S. aureus* resistente a meticilina

**Tabla 11-4:** Representación de la CMI de la combinación de amoxicilina y levofloxacina

N° Columnas microplacas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentración Levofloxacina (µg/mL)	12	CONTROL PARA CRECIMIENTO BACTERIANO											CONTROL
	6												
	3						CMI						
	1.5												
	0.75												
	0.50												
	0.25												
	Caldo + bacteria												
			0	0.5	1	2	4	8	12	16			
			Concentración Amoxicilina (µg/mL)										

Fuente: Registro de la investigación

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

Para la representación de la CMI de la combinación de amoxicilina y levofloxacina se aplicó la técnica tablero de ajedrez en microplacas de 96 pocillos como se indica en la Tabla 6-4, obteniendo que, la CMI de *S.aureus* en este estudio es de 2 µg/mL de amoxicilina y 3 µg/mL levofloxacina (ausencia de turbidez en el medio).

*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina se ha convertido en un patógeno común a nivel de las infecciones nosocomiales, ya que presenta resistencia a medicamentos como la meticilina, nafcilina, oxacilina, carbapenémicos y otros antibióticos betalactámicos. De este modo, las terapias clínicas contra SARM se han visto limitadas llevando incluso al fracaso terapéutico. (Yu et al. 2020, p. 2).

Una investigación similar sobre "Sensibilidad bacteriana a los antibióticos comerciales amoxicilina y ciprofloxacino", observó que, la concentración mínima inhibitoria derivada del

sinergismo de los antibióticos fue de 0,06 µg/mL para la levofloxacina y de 5 µg/mL para la amoxicilina (Smith et al. 2018, p. 85). En este estudio se analizó el efecto de la sinergia con otro medicamento perteneciente al grupo de las quinolonas y fue posible determinar que cuando se combinan dos antibióticos se potencia su efecto y se reduce su concentración mínima inhibitoria.

Se realizó el cálculo del Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF):

**Antibiótico A:** Amoxicilina

- (CMI)<sub>a</sub> Amoxicilina: 8 µg/mL
- CMI de la combinada del antibiótico A en presencia del antibiótico B: 2 µg/mL

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

$$CIFa: 0.0625$$

**Antibiótico B:** Levofloxacina

- (CMI)<sub>b</sub> Levofloxacina: 3 µg/mL
- CMI de la combinada del antibiótico B en presencia del antibiótico A: 3 µg/mL

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

$$CIFb: 0,083$$

- Calculo de la concentración inhibitoria fraccionada total

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

$$CIF = 0.0625 + 0.083 = 0.1458$$

**Tabla 12-4:** Resultados del experimento de sinergia por el ensayo tablero de ajedrez a 24 horas

Compuesto		24 horas de incubación			
A	B	FIC a	FIC b	FICt	Interacción
Amoxicilina	Levofloxacina	0.0625	0.083	0.1458	Sinergia

**Fuente:** Registro de la investigación

**Realizado por:** Paucar, Joselyn, 2023.

En la Tabla 7-4 se presentan los resultados de la evaluación del sinergismo tras 24 horas de incubación del medio y se obtuvieron valores de FIC para amoxicilina de **0,0625**, y de levofloxacina **0,083**, dando un valor de FICt de **0,1458**. El FIC se conoce como el índice de la

concentración inhibitoria fraccional, que es un parámetro que se calcula en estudios de asociación de antibióticos, para determinar si existe un efecto sinérgico, aditivo, indiferente o antagónico (Canut et al. 2020, p. 8).

Un estudio publicado en Polonia sobre “Efectos sinérgicos de las tiosemicarbazidas con fármacos clínicos contra *Staphylococcus aureus*” determinó que, al evaluar el índice racional de la concentración inhibitoria se debe considerar que, si el FIC es menor a 0,5, hay un efecto sinérgico, si su valor oscila entre 0,5-1 es aditivo (suma de los dos efectos individuales de los antibióticos), en tanto que si el valor oscila entre 1-4 la relación es indiferente y si el valor es superior a 4, existe un efecto antagónico (Chudzik et al. 2020, p. 9). En este caso, al obtener un valor **FIC=0,1458** se comprueba que la interacción entre amoxicilina y levofloxacina presenta un efecto sinérgico.

En un artículo sobre “Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana”, se señaló que, el objetivo de las combinaciones de antimicrobianos es poder comprobar sinergismo, con el fin de contrarrestar el aumento de la resistencia bacteriana, sobre todo a nivel hospitalario. Los estudios de las interacciones entre antibióticos se realizan *in vitro*, sin embargo, para que puedan administrarse a nivel clínico, se requiere de la evaluación en sistemas *in vivo* porque se debe evaluar parámetros como las concentraciones del medicamento, la farmacocinética y farmacodinámica (De la Fuente et al. 2019, p. 11).

También es importante resaltar que la terapéutica de combinación se ha empleado en mayor medida en los últimos años, sobre todo en pacientes hospitalizados con sepsis graves, sin embargo, se ha observado un aumento en la incidencia de los efectos adversos y un incremento en el costo del tratamiento en comparación a la monoterapia. Por esto, se requiere de un análisis adecuado del sinergismo para evitar que la eficacia clínica de un medicamento se reduzca por la presencia de otro (Cordiés y Machado 2018, p. 103).

#### **4.5. Comprobación de la efectividad de la CMI de la combinación de Amoxicilina y Levofloxacina en comparación con el Linezolid**

Se realizó la comprobación de la efectividad de la CMI de la combinación de los medicamentos de estudio:

**Tabla 13-4:** Comparación de CMI de la combinación de amoxicilina/levofloxacin con linezolid frente a SARM

N° Columnas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
CMI Amoxicilina / Levofloxacin (µg/mL)	2 µg/mL A +	<b>CONTROL PARA CRECIMIENTO BACTERIANO</b>												
	1 µg/mL B													
	2 µg/mL A +													
	3 µg/mL B													
	1 µg/mL A +													
	2 µg/mL B													
			<b>CONTROL</b>											
													Concentración Linezolid (x 4µg/mL)	

Realizado por: Paucar, Joselyn, 2023.

Como se observa en la Tabla 8-4, se utilizó el antibiótico linezolid como control positivo para la inhibición de *S. aureus*, debido a que es un medicamento de amplio espectro, con acción frente a cocos gram positivos. Se comparó de manera cualitativa con el efecto de la combinación de amoxicilina y levofloxacin, observando que, con el medicamento de control no hubo crecimiento bacteriano, mientras que, con la combinación de amoxicilina (2 µg/mL.) y levofloxacin (3 µg/mL.) se alcanzó un efecto similar al inhibir el crecimiento de esta bacteria.

Un artículo publicado en Madrid sobre “Interacción microbiológico clínico, ajuste de tratamiento según CMI”, indica que la concentración mínima inhibitoria del linezolid para *S. aureus* resistente a meticilina es de 2mg/L, comparándolo con el sinergismo de amoxicilina y levofloxacin se encuentran valores similares de la CMI a este patógeno (Soriano et al. 2018, p. 22).

Actualmente se justifica la aplicación de las combinaciones de antimicrobianos con el fin de extender el espectro antibacteriano y conseguir un sinergismo que permita mejorar el efecto terapéutico y a la vez minimizar la resistencia a los antibióticos. Es así que se han realizado diversas experimentaciones *in vivo* usando combinaciones de antimicrobianos de diversa naturaleza, para obtener resultados prometedores que aceleren su implementación en la medicina humana, con el objetivo de combatir un amplio grupo de bacterias multirresistentes (De la Fuente

et al. 2019, p. 13). Debido a esto, la evaluación del sinergismo de amoxicilina y levofloxacin es una opción terapéutica para el tratamiento de diversas patologías.

## **CONCLUSIONES**

- Se evaluó el efecto sinérgico de la combinación de amoxicilina y levofloxacin frente a una cepa de *S. aureus* resistente a metilina, determinando que la interacción de los dos antibióticos potenció el efecto antimicrobiano contra esta bacteria que es causante de infecciones nosocomiales a nivel asistencial.

- Al evaluar la concentración mínima inhibitoria de la amoxicilina y el levofloxacina contra MRSA se determinó que individualmente presentaron: 8  $\mu\text{g/mL}$  en amoxicilina y 3  $\mu\text{g/mL}$  en la levofloxacina, mientras que en combinación se evidenció un efecto sinérgico entre ambos (mayor efecto sobre las bacterias).
- Se evaluó la eficacia de la sinergia de la combinación de antibióticos y se calculó el índice de la concentración inhibitoria fraccional  $\text{FIC} = 0,1458$ , el cual, al ser menor a 0,5 establece que, la combinación de amoxicilina y levofloxacina presenta un efecto sinérgico.
- Se comprobó la eficacia de la combinación de amoxicilina más levofloxacina, con respecto al linezolid y se determinó que, la CMI de este antibiótico de control fue de 2  $\mu\text{g/mL}$  y la CMI al combinar los antibióticos amoxicilina y levofloxacina fue de 2  $\mu\text{g/mL}$  y 3  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, alcanzando un acertado efecto inhibitorio frente a SARM.

## **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda realizar el análisis del sinergismo de otras combinaciones de antibacterianos sobre las bacterias SARM.
- Es importante realizar un análisis in vivo del sinergismo farmacológico para determinar si existe alguna diferencia significativa en la aparición de efectos adversos entre la monoterapia y la combinación de antibióticos.
- Se recomienda evaluar en términos económicos, si la combinación antibacteriana presenta un menor o mayor valor respecto a la adquisición de estos medicamentos en monoterapia.

## BIBLIOGRAFÍA

**AEMPS.** *Levofloxacin*. 2018, pp. 1-23.

**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/>.

**BCM.** *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA)* [en línea] 2023. Disponible en: [www.bcm.edu](http://www.bcm.edu)

**BULDAIN, D.** *Estudio de la eficacia in vitro de combinaciones de antimicrobianos con aceite esencial de Melaleuca armillaris Sm. frente a S. aureus.* [en línea] 2019. Disponible en: [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/82453/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/82453/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

**CANUT, 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>.

**CAVALIERI, J. et al.** *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana.* [en línea] 2005. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>.

**CERVANTES, E et al.** *Características generales del Staphylococcus aureus.* *Medigraphic*, vol. 11, no. 4, 2018, pp. 11-14.

**CHAMBERS, H.** *Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic* [en línea] 2023. Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871281/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2871281/)

**CHUDZIK, B et al.** *Efectos sinérgicos de las tiosemicarbácidas con fármacos clínicos contra S. aureus.* 2020, pp. 1-13.

**CORDIÉS, L. y MACHADO, L.** *Combinaciones de antimicrobianos.* *Acta Medica*, vol. 8, no. 1, 2018, pp. 101-4.

**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>.

**DE LA FUENTE, N. et al.** *Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas,* vol. 46, no. 2, 2019, pp. 7-16.

**DEYNO, S et al.** *Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolates isolated from ear discharges of patients at University of Hawassa comprehensive specialized hospital.* [en línea] 2023. Disponible en: <http://bmcpharmacoltoxicol.biomedcentral.com>

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

**FLORES, J. et al.** *Interacciones farmacológicas relacionadas con la administración de antibióticos betalactámicos.* [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>.

**GALLI, L et al.** *Staphylococcus aureus; Inter-Médica;* 2019.

**GÓMEZ, J Y GÓMEZ, J.** *Combinaciones de antibióticos: Nuevas perspectivas y futuro.* [en línea] 2008. Disponible en: [https://seq.es/seq/html/revista\\_seq/0396/edit1.html](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](https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/seq_0214-3429_28_1_gomez.pdf).

**HERNÁNDEZ, Met 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](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152009000200006).

**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](https://www.idexx.com/media/filer_public/9a/96/9a96e4f7-8127-4306-981a-c60920f092f6/mic-guia-microbiologica-es.pdf).

**IJMS.** *Free Full-Text / Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Staphylococcus aureus.* [en línea] 2019. Disponible: [www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8088](http://www.mdpi.com/1422-0067/23/15/8088)

**LOWY, F.** *Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. (n.d.)* [en línea] 2023. Disponible en: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154455/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154455/)

**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>.

**MOREIRA, N et al.** *Actividad in vitro de ampicilina-ceftriaxona frente a aislamientos de Enterococcus faecalis recuperados de infecciones invasivas. Revista Argentina de Microbiología,* vol. 48, no. 1, 2019, pp. 57-61.

**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](https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf).

**MUKHERJEE, R et al.** *Antimicrobial Resistance in Staphylococcus aureus* [en línea] 2023. Disponible en: [www.intechopen.com/chapters/75953](http://www.intechopen.com/chapters/75953)

**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.* [dn línea] 20 de 10 de 2020. <https://www.guia-abe.es/generalidades-descripcion-general-de-los-principales-grupos-de-farmacos-antimicrobianos-antibioticos->.

**OMS.** *Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS.* [en línea] 2021. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-paraoms#:~:text=Helicobacter%20pylori%2C%20Staphylococcus%20aureus%2C%20Streptoco>

ccus,riesgo%20la%20salud%20de%20la.

**PUBMED.** *Mechanisms of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus* [en línea] 2019. Disponible en: [pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17661706/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17661706/)

**PÉREZ, E. y RIVAS, A.** *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos.* , no. Cmi, 2021, pp. 1-9.

**PICAZO, J.** *Serotypes and antibiotic susceptibility patterns of Salmonella spp. Isolates from spur-thighed tortoise, Testudo graeca illegally introduced in Italy. Human and Veterinary Medicine*, vol. 4, no. 2, 2019, pp. 76-81.

**RAMÍREZ, J. Y USCANGA, I.** *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. Y ZHURBENKO, R.** *Manual biocen de medios de cultivo* [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.biocen.cu/wp-content/uploads/2021/05/Manual-MC-2018.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>.

**SMITH, C et al.** *Assessment of the synergistic interactions of levofloxacin and ampicillin against Enterococcus faecium by the checkerboard agar dilution and time-kill methods. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, vol. 27, no. 3, 2018, pp. 85-92.

**SORIANO, A et al.** *Guia de tratamiento antimicrobiano para Staphylococcus Aureus.* *Sociedad Española de Quimioterapia* [en línea], vol. 26, 2018, pp. 1-84. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf>.

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

**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

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

**VARELA, I.** *Sensibilidad bacteriana a los antibióticos comerciales Amoxicilina y Ciprofloxacino.* *Universidad de Coruña* [en línea] 2018, pp. 1-28. Disponible en: [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21169/LechugaVarela\\_Isabel\\_TFG\\_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/21169/LechugaVarela_Isabel_TFG_2018.pdf?sequence=2&isAllowed=y).

**YU, Y. et al.** *Synergistic Potential of Antimicrobial Combinations Against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.* *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, no. August, 2020, pp. 1-10.

**ZENDEJAS, G. et al.** *Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades de patogenicidad, metodos de identificacion.* *Revista Biomed*, vol. 25, no. 3, 2018, pp. 129-143.



## **ANEXOS**

### **ANEXO A: CALDO SOJA TRIPTICASEÍNA (TSB)**

Es un medio enriquecido que posee nutrientes que permiten el aislamiento y cultivo de microbianos patógenos.

#### **PREPARACIÓN:**

- ✓ Colocar 30 gramos del medio en 1000 mL de agua destilada según la ficha técnica.
- ✓ Poner en ebullición hasta que el medio se disuelva completamente y proceder a esterilizarlo en la autoclave a 121 °C durante 15 minutos para luego dejar enfriar hasta llegar a una temperatura aproximada de 45 a 50 °C.
- ✓ Verter en frascos estériles, almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos con papel aluminio y etiquetar la fecha de preparación.
- ✓ Realizar la siembra con un inóculo de un cultivo con un asa bacteriológica previamente flameada que obtendrán como resultados crecimiento de colonias (Condalab, 2020 pág. 2).

## **ANEXO B: TRIPTEÍNA SOYA AGAR (TSA)**

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

### **PREPARACIÓN:**

- ✓ Colocar 40 gramos en 1000 mL de agua destilada y agitar para mezclar.
- ✓ 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 el medio en las placas Petri estériles dentro de la cámara de flujo laminar y dejar que se solidifiquen.
- ✓ Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y dentro de una funda estéril etiquetando la fecha de preparación.
- ✓ Realizar la siembra en estría sobre la superficie cuidadosamente con un asa bacteriológica previamente flameada para obtener resultados de crecimiento de colonias (Condalab, 2021 pág. 3).

## **ANEXO C: AGAR MANITOL SALADO**

Medio de cultivo selectivo y diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de estafilococos a partir de diversas muestras.

### **PREPARACIÓN:**

- ✓ Suspender 111 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 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: BASE DE AGAR DE SANGRE (INFUSIÓN AGAR)**

Base de Agar de Sangre es recomendable usar una base a la que se puede añadir sangre para el aislamiento y cultivo de microorganismos patógenos.

### **PREPARACIÓN:**

- ✓ Colocar 40 gramos en 1000 mL de agua destilada según la ficha técnica.
- ✓ Poner en ebullición para disolver el medio en su totalidad 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 10 % de sangre al medio esterilizado y homogenizar.
- ✓ Verter en las placas Petri estériles dentro de la cámara de flujo y esperar que se solidifiquen.
- ✓ Almacenar a 2 – 8 °C en un refrigerador envueltos en papel aluminio y dentro de una funda estéril etiquetando con la fecha de preparación.
- ✓ Realizar la siembra en estría sobre la superficie cuidadosamente con un asa bacteriológica previamente flameada para tener como resultados crecimiento de colonias (Condalab, 2020 pág. 2).

## **ANEXO E: PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE LA TINCIÓN GRAM**

### **Preparación del frotis:**

- Se tomará una colonia de un cultivo nocturno de 24 horas y se la extenderá en un portaobjetos.
- Se procede a fijar 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.

### **Tinción**

1. Colocar el frotis en un soporte para tinción en un lavabo y recubra la superficie con solución de violeta de genciana.
2. Pasado el minuto lavar con agua destilada.
3. Se procede a cubrir el frotis con lugol durante un minuto y nuevamente lavar con agua destilada.
4. Poner alcohol cetona por 15 segundos y enjuagar delicadamente con agua destilada.
5. Cubrir el frotis con safranina diluida 1:10 por 30 segundos y enjuagar con agua destilada.
6. Colocar el frotis en posición vertical, para permitir que el exceso de agua caiga por gravedad y el frotis se seque. Posteriormente se observará al microscopio con el objetivo de 100x (de inmersión), utilizando aceite de inmersión. Las bacterias grampositivas se tiñen de violeta (Gonzales, y otros, 2020 pág. 42).

## ANEXO F: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

### ❖ UREA

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

#### **Preparación:**

- ✓ Colocar 24 gr en 950 ml de agua destilada y dejar reposar aproximadamente 5 minutos. Calentar mediante agitación frecuente hasta conseguir la dilución total.
- ✓ Distribuir en recipientes estériles y colocar en la autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Enfriar a 50 ° C.
- ✓ Añadir asepticamente 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)

### ❖ COAGULASA

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 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Durante 5 minutos.
- ✓ Calentar con agitación frecuente y hervir durante un minuto para disolución total.
- ✓ Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
- ✓ Agregar al medio de cultivo 3 a 5 gotas de Indol Reactivo.
- ✓ Colocar los tubos con el medio más el reactivo en posición vertical formando un pico de flauta, dejar que se solidifique el medio.
- ✓ 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 H<sub>2</sub>S y tiene tiosulfato de sodio fuente de azufre y hierro peptonado como indicador de H<sub>2</sub>S, lo que lo hace más sensible en la detección de H<sub>2</sub>S 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).

**❖ CATALASA**

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:**

- ✓ En un portaobjetos se depositan una o dos gotas de peróxido de hidrogeno.
- ✓ Se recoge una muestra con el asa de siembra y se toma un inóculo del centro de una colonia pura cultivada de 18-24 horas.
- ✓ Calentar con agitación suave y hervir por un minuto para que se disuelva el medio completamente (MCDLAB, 2014 pág. 2).

## ANEXO G: PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES MADRES

### Solución Madre de amoxicilina

DATOS DEL ANTIBIÓTICO	
<b>Potencia:</b> 99.50%	<b>Almacenamiento:</b> < 25°C
<b>Solvente:</b> H <sub>2</sub> O estéril	<b>N° de análisis:</b> CMP26232
<b>código:</b> A4	

Pesar 28.7 mg de amoxicilina trihidratado estándar (equivalente a 25mg de Amoxicilina Base) en una balanza analítica, colocar el estándar pesado en un matraz volumétrico de 100mL y aforar con el solvente (agua estéril), agitar y calentar a baja temperatura, hasta conseguir una solución homogénea.

De esta solución se toma una alícuota de 1mL y colocar en un matraz volumétrico de 25 mL y aforar con el solvente (agua estéril).

Concentración St: 0.01 mg/mL

#### Cálculos:

#### Preparación de las diluciones

### Solución madre de levofloxacin

DATOS DEL ANTIBIÓTICO	
<b>Potencia:</b> 99.26%	<b>Almacenamiento:</b> < 25°C
<b>Solvente:</b> HCl	<b>N° de análisis:</b> CMP26232
<b>código:</b> C4	

Pesar 46.6 mg de Levofloxacin clorhidrato estándar (equivalente a 40 mg de Levofloxacin Base) en una balanza analítica, colocar el estándar pesado en un matraz volumétrico de 100mL y aforar con el solvente (ácido clorhídrico 0,01N), agitar hasta conseguir una solución homogénea.

Concentración estándar: 0.04 mg/mL

#### Preparación de las diluciones

**Solución de madre de la linezolid**

**DATOS DEL ANTIBIÓTICO**

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

Colocar 1 mL del medicamento en un matraz volumétrico de 100mL y aforar con el solvente (agua estéril), agitar hasta conseguir una solución homogénea.

Concentración estándar: 0.02 mg/mL

## ANEXO H: DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS

### Microdilución de amoxicilina (antibiótico A) de forma individualizada

N°		1		2		3	4	5	6	12	
Columnas microplacas		Blanco		1		2	3	4	5	Control	
Concentración Diluciones (µg/mL)	A:0.5	5µL suspensión bacteriana	200 µL caldo TSB	5µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de antibiótico A					5µL suspensión bacteriana	200 µL dilución de linezolid (4 µg/mL)
	B:1										
	C:2										
	D:4										
	E:8										
	F:16										
	G:32										
	H:64										

#### Observaciones:

- Se utilizaron 8 diluciones del antibiótico, desde la concentración de pocillo 0.5 µg/mL hasta 32 µg/mL.
- En la columna 1 se encuentra el blanco utilizada como control del medio (TSB).
- La columna 12 fue utilizada como control del medio donde se encuentra el linezolid a una concentración bactericida más suspensión bacteriana.

### Microdilución de levofloxacina (antibiótico B) de forma individualizada

N° Columnas microplacas		1		2		3	4	5	6	7	8	12	
Muestras		Blanco		1		2	3	4	5	6	7	Control	
Concentración Diluciones (µg/mL)	A:0.25	5µL	200 µL	5µL	200 µL							5µL	200 µL
		suspensión bacteriana	caldo TSB	suspensión bacteriana	dilución de antibiótico A							suspensión bacteriana	dilución de linezolid (4 µg/mL)
	B:0.50												
	C:0.75												
	D:1.5												
	E:3												
	F:6												
	G:12												
H:24													

**Observaciones:**

- Se utilizaron 8 diluciones del antibiótico, desde la concentración de pocillo 0.25 µg/mL hasta 24 µg/mL.
- En la columna 1 se encuentra el blanco utilizada como control del medio (TSB).
- La columna 12 fue utilizada como control del medio donde el linezolid a una concentración bactericida más suspensión bacteriana.

**ANEXO I: DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROPOCILLOS PARA LA MICRODILUCIÓN DE LA COMBINACIÓN**

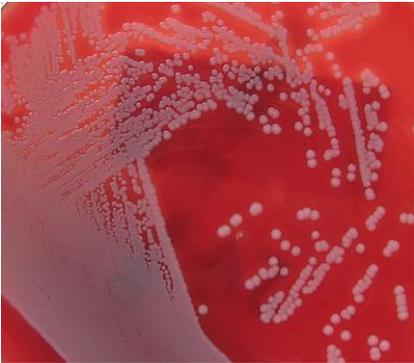
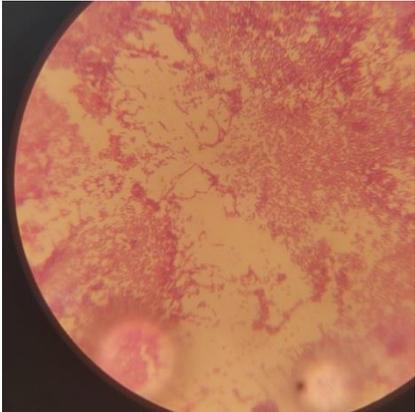
N° Columnas microplacas		1	2	3	4	5	6	7	8	9	12		
												CONTROL	
<b>B [ ] CIPROFLOXACINA (µg/mL)</b>	A:0.25	<b>BLANCO</b> 5µL suspensión bacteriana y 200 µL de caldo TSB										5µL suspensión bacteriana	200 5µL suspensión bacteriana dilución de linezolid (4µg/mL)
	B:0.50												
	C:0.75												
	D:1.5												
	E:3												
	F:6												
	G:12												
	0												
<b>X</b>				0	0.5	1	2	4	8	12			
		<b>A [ ] AMOXICILINA (µg/mL)</b>											

En cada pocillo agregar 5µL de la suspensión bacteriana con OD<sub>600nm</sub>: 0.08 y 100 µL dilución amoxicilina más 100 µL de la dilución de levofloxacina de acuerdo con las concentraciones establecidas en la tabla.

**Observaciones:**

- Se utilizaron 7 diluciones para cada antibiótico, amoxicilina desde la concentración del pocillo 0.5 µg/mL hasta 16 µg/mL.
- Para levofloxacina las concentraciones fueron desde 0.25 µg/mL hasta 12 µg/mL.
- En la columna 1 se encuentra el blanco utilizada como control del medio (TSB).
- La columna 12 fue utilizada como control del medio donde se encuentra el linezolid a una concentración bactericida más suspensión bacteriana.

**ANEXO J: FOTOGRAFIAS DEL ANÁLISIS MACROSCÓPICO Y MICROSCÓPICO DE *S. AUREUS***

<b>Tipo de análisis</b>	<b>Resultados</b>
<b>Macroscópico (Agar Sangre)</b>	Colonias lisas, brillantes y convexas de color amarillo-naranja. 
<b>Microscópico (Tinción Gram)</b>	Cocos gram positivos coloración violeta. 

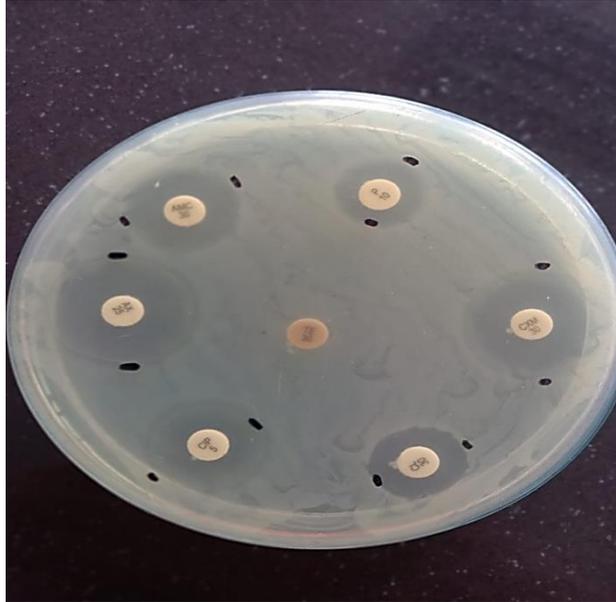
**ANEXO K: FOTOGRAFIAS DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS**

<b>PRUEBAS BIOQUÍMICAS</b>	
<b>Catalasa</b>	Positiva (no fermentadora de glucosa). 
<b>Coagulasa</b>	Positiva. 
<b>Citrato</b>	Negativa. 
<b>Manitol</b>	Positiva (se aprecia que es <i>S. aureus</i> ). 

<b>Movilidad</b>	Negativa. 
<b>Ureasa</b>	Negativa. 

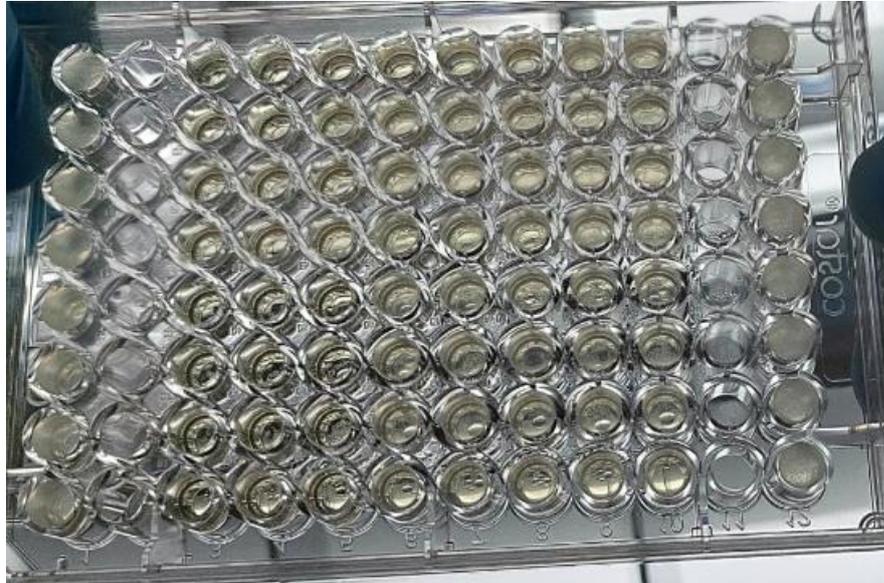
## ANEXO L: ANTIBIOGRAMA

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



## ANEXO M: CMI DE AMOXICILINA

Fotografías de las microplacas del método de microdilución en caldo Amoxicilina de forma individual.



## ANEXO N: CMI DE LEVOFLOXACINO

Fotografías de las microplacas del método de microdilución en caldo de Levofloxacin de forma individual.



## **ANEXO O: RESULTADOS DE COMBINACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS DE ESTUDIO**

Fotografías de la observación del efecto sinérgico de la combinación de Amoxicilina y Levofloxacin por el método de microdilución en caldo mediante el ensayo tablero de ajedrez.





epoch

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:** 28 / 09 / 2023

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Joselyn Mercedes Paucar Ojeda
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Ciencias
<b>Carrera:</b> Bioquímica y Farmacia
<b>Título a optar:</b> Bioquímica Farmacéutica
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



1335-DBRA-UPT-2023