

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA



**EVALUACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Proteus spp*
AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO,
PROVINCIA DE TUNGURAHUA**

DOCUMENTO FINAL DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PARA
OBTENER EL GRADO DE MÉDICO VETERINARIO

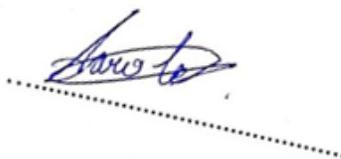
AUTOR: CAROLINA ALEJANDRA COKA ESCOBAR

TUTORA: Dra. SANDRA CRUZ, PhD.

CEVALLOS - ECUADOR 202

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, CAROLINA ALEJANDRA COKA ESCOBAR, portador de la cédula de identidad número: 1600479180, libre y voluntariamente declaro que el Informe Final del Proyecto de Investigación titulado: EVALUACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Proteus* spp AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA es original, auténtico y personal. En la virtud, declaro que el contenido es de mi sola responsabilidad legal y académica, excepto donde se indica las fuentes de información consultadas.



Carolina Alejandra Coka Escobar

C.I. 1600479180

AUTOR

DERECHOS DEL AUTOR

Al presentar este Informe Final del Proyecto de Investigación titulado EVALUACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Proteus* spp AISLADAS EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE TUNGURAHUA, como uno de los requisitos previos para la obtención del título de grado de Médico Veterinario, en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, autorizo a la Biblioteca de la Facultad, para que este documento esté disponible para su lectura, según las normas de la Universidad.

Estoy de acuerdo en que se realice cualquier copia de este Informe Final, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica potencial.

Sin perjuicio de ejercer mi derecho de autor, autorizo a la Universidad Técnica de Ambato la publicación de este Informe Final, o de parte de él.



Carolina Alejandra Coka Escobar

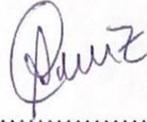
C.I. 1600479180

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

EVALUACIÓN DE ANTIBIORRESISTENCIA DE CEPAS DE *Proteus* spp AISLADAS
EN CARNE DE POLLO EN LA CIUDAD DE AMBATO, PROVINCIA DE
TUNGURAHUA

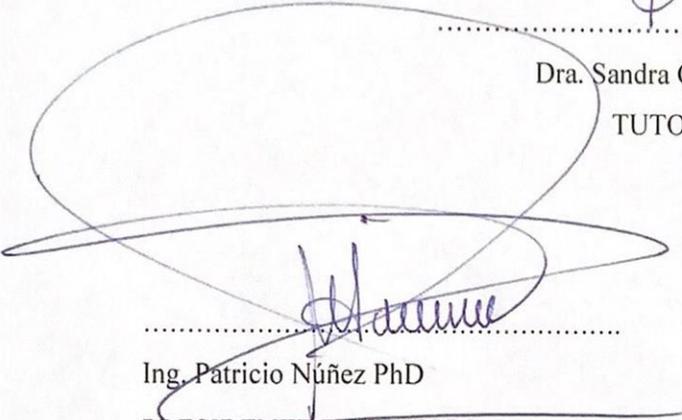
REVISADO POR:



.....
Dra. Sandra Cruz, PhD.
TUTORA

FECHA:

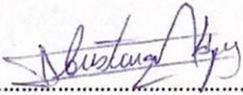
31 de agosto de 2023



.....
Ing. Patricio Núñez PhD

PRESIDENTE DE TRIBUNAL

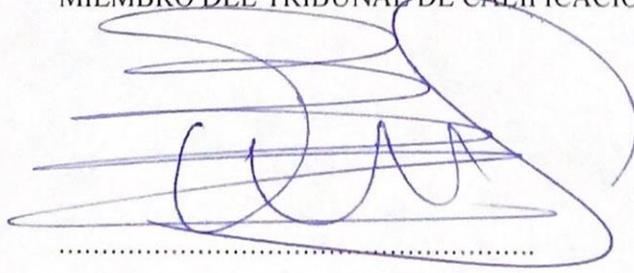
31 de agosto de 2023



.....
BQF. Mg. López Villacís Isabel Cristina

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

31 de agosto de 2023



.....
Méd. Mg. Borja Caicedo Byron Enrique

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE CALIFICACIÓN

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas por apoyarme en todo momento.

A mis perros Clifford y Rigoletto.

Mi gata Frida.

AGRADECIMIENTOS

Al amor, por presentarse de muchas formas para recordarme que es una de las fuerzas más grandes.

A todos los animales que han formado parte de mi vida, por enseñarme que son el amor más puro y real que tendré. Muchas veces fueron el motor para seguir y siempre serán la razón por la que intente ser mejor Medico Veterinaria cada día.

A mi familia, amigos y docentes que me apoyaron y fueron mi soporte durante toda la carrera.

A mi tutora Dra. Sandra Cruz, por los conocimientos compartidos, el apoyo y la paciencia a lo largo del trabajo de titulación

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	4
1.2. CATEGORÍAS FUNDAMENTALES.....	7
1.2.1. <i>Proteus</i> spp taxonomía y generalidades.....	7
1.2.2. Estructura antigénica de <i>Proteus</i> spp.....	8
1.2.3. Aspectos patogénicos de <i>Proteus</i> spp.....	8
1.2.4. Factores relevantes de virulencia en <i>Proteus</i>	9
1.2.5. Sensibilidad de <i>P. mirabilis</i> y <i>P. vulgaris</i> a los antibióticos.....	10
1.2.6. Resistencia adquirida por parte de <i>Proteus</i> spp a los antibióticos.....	11
1.3. OBJETIVOS	12
1.3.1. Objetivo general.....	12
1.3.2. Objetivos específicos.....	13
1.4 HIPÓTESIS	13
CAPÍTULO II.....	14
METODOLOGÍA	14
2.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	14
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR.....	14
2.3. EQUIPOS Y MATERIALES	15
2.4. FACTORES DE ESTUDIO.....	16
2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17
2.5.1. Tamaño de la muestra.....	17
2.5.2. Diseño experimental.....	17
2.6. METODOLOGÍA.....	18
2.6.1. Fase 1. Refrescar las cepas en Tripticasa de soya	19
2.6.1.1. Preparación del medio Agar TS	19

2.6.1.2. Siembra de cepas de <i>Proteus</i> spp en TS	20
2.6.2. Siembra de colonias en Infusión Cerebro-Corazón	20
2.6.2.1. Preparación de Infusión Cerebro-Corazón	20
2.6.2.2 Siembra de colonias de <i>Proteus</i> spp en Infusión C.....	21
2.6.3. Antibiorresistencia siembra de <i>Proteus</i> spp en Müller Hilton.....	21
2.6.3.1. Preparación de Agar Müller Hilton.....	21
2.6.3.2. Siembra de <i>Proteus</i> spp en Agar Müller Hilton.....	22
2.6.3.3. Colocación de discos de antibióticos.....	23
2.6.4. Lectura de resultados.....	23
2.6.5. Fase 2. Determinar CMI de cepas Sensibles (S) a los antibióticos...24	
2.6.5.1. Refrescar las cepas y sembrarlas en TS.....	24
2.6.5.2. Siembra de colonias de <i>Proteus</i> spp en Luria Bertani.....	24
2.6.5.2.1. Preparación de Luria Bertani.....	24
2.6.5.2.2. Siembra de colonias en LB.....	25
2.6.5.3. Dilución de antibióticos en diferentes concentraciones...26	
2.6.5.4. Lectura de Resultados	28
2.6.5.5. Determinación de concentraciones definitivas.....	29
2.7. VARIABLES RESPUESTA.....	30
2.7.1. Cualitativas.....	30
2.7.2. Cuantitativas.....	30
2.8. PROCESAMIENTO DE DATOS.....	30
CAPÍTULO III.....	31
ANÁLISIS Y DISCUSIONES DE RESULTADOS.....	31
3.1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	31
3.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)	40
3.2.1. CMI de Aminoglucósidos.....	42
3.2.1.1. CMI de Amikacina.....	42
3.2.1.2. CMI de Gentamicina (CN).....	44
3.2.2. CMI de Betalactámicos.....	48
3.2.2.1. CMI de Ceftriaxona (CRO).....	48
3.2.2.2 CMI de Amoxicilina + ácido clavulánico (AMC).....	49

3.2.3 CMI de Fluoroquinolonas.....	51
3.3. Mecanismos moleculares de resistencia de <i>Proteus</i> spp a los antibióticos....	54
3.3.1. Mecanismos de resistencia de <i>Proteus</i> spp a Betalactámicos.....	54
3.3.2. Mecanismos de resistencia de <i>Proteus</i> spp a Aminoglucósidos.....	56
3.3.3. Mecanismos de resistencia de <i>Proteus</i> spp a fluoroquinolonas.....	58
3.4. VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS.....	59
CAPÍTULO IV.....	60
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	60
4.1. CONCLUSIONES.....	60
4.2. RECOMENDACIONES.....	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. TAXONOMÍA DE <i>Proteus</i> spp.....	7
TABLA 2. FACTORES DE VIRULENCIA PRESENTES DE <i>Proteus</i> spp.....	10
TABLA 3. CARACTERÍSTICAS DEL CANTÓN CEVALLOS.....	14
TABLA 4. EQUIPOS Y MATERIALES.....	15
TABLA 5. DISCOS DE ANTIBIÓTICOS.....	16
TABLA 6. HALOS DE ANTIBIORRESISTENCIA (mm).....	23
TABLA 7. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA ($\mu\text{g/ml}$).....	26
TABLA 8. BATERÍA DE CONCENTRACIONES DE PRUEBA PARA CMI.....	27
TABLA 9. BATERÍA DE CONCENTRACIONES DETERMINADAS.....	27
TABLA 10. BATERÍA DE DILUCIONES PARA CMI.....	29
TABLA 11. SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE CEPAS DE <i>Proteus</i> spp AISLADAS DE CARNE DE POLLO FRENTE A CINCO ANTIBIÓTICOS (AMIKACINA, CIPROFLOXACINA, CEFTRIAXONA, GENTAMICINA, AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÁNICO).....	35
TABLA 12. EFECTIVIDAD DE CINCO ANTIBIÓTICOS (AMIKACINA, CIPROFLOXACINA, CEFTRIAXONA, GENTAMICINA, AMOXICILINA + ÁCIDO CLAVULÁNICO) MEDIANTE ENSAYO DE SENSIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE CEPAS DE <i>Proteus</i> spp AISLADAS DE CARNE DE POLLO.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PORCENTAJE DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA DE <i>Proteus</i> spp.....	32
FIGURA 2. RESISTENCIA INTERMEDIA A LOS ANTIBIÓTICOS POR <i>Proteus</i> spp.....	32
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE 3 CEPAS SENSIBLES Y 3 CEPAS RESISTENTES DE <i>Proteus</i> spp.....	36
FIGURA 4. PORCENTAJE DE CEPAS SENSIBLES A LOS ANTIBIÓTICOS	41
FIGURA 5. BATERÍA DE PRUEBA PARA CMI - AMIKACINA.....	42
FIGURA 6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA AMIKACINA.....	43
FIGURA 7. BATERÍA DE PRUEBA PARA CMI - GENTAMICINA.....	44
FIGURA 8. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA - GENTAMICINA.....	45
FIGURA 9. BATERÍA DE PRUEBA PARA CMI - CEFTRIAXONA.....	48
FIGURA 10. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA CEFTRIAXONA.....	49
FIGURA 11. PRUEBA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA - AMC.....	50
FIGURA 12. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA - AMC.....	50
FIGURA 13. PRUEBA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA - CIP.....	52
FIGURA 14. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA - CIP	52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. REFRESCACIÓN CEPAS DE <i>Proteus</i> spp.....	65
ANEXO 2. ESTRIADO EN AGAR TRIPTICASA DE SOYA.....	65
ANEXO 3. COLOCACIÓN DE DISCOS DE ANTIBIÓTICOS.....	66
ANEXO 4. MEDICIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN.....	66
ANEXO 5. DEPÓSITO DE BACTERIAS EN LURIA BERTANI.....	67
ANEXO 6. COLOCACIÓN DE ANITBIÓTICO EN LURIA BERTANI.....	67
ANEXO 7. UBICACIÓN DE CUBETAS EN ESPECTROFOTÓMETRO PARA MEDICIÓN.....	68
ANEXO 8. LECTURA DE CURVAS DE INHIBICIÓN.....	68

RESUMEN

Proteus spp es uno de los géneros más sensibles dentro de las enterobacterias, mantiene sensibilidad hacia los aminoglucósidos, betalactámicos y fluoroquinolonas, sin embargo, debido al uso frecuente e imprudente de los mismos se ha observado un incremento los puntos de corte para concentración mínima inhibitoria que a nivel estadístico resultan significativos, esto se debe a los diferentes mecanismos de resistencia que presenta la bacteria y que significan un problema relevante en salud pública. En el presente trabajo investigativo se evaluó la antibiorresistencia de 18 cepas de *Proteus* spp mediante el método de Kirby Bauer para el siguiente grupo de antibióticos: Amikacina, Gentamicina, Amoxicilina+ ácido clavulánico, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, los resultados obtenidos se analizan mediante la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney, obteniendo resultados de porcentaje antibiótico de: Ciprofloxacina: 27,7%, Ceftriaxona:16,6%, Amoxicilina + ácido clavulánico: 22,2% , Gentamicina y Amikacina: 0%. Para la segunda fase se tomó en cuenta los puntos de corte expuestos por la CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute, 2023), para evaluar la concentración mínima inhibitoria, sin embargo, las curvas de inhibición incrementaron con los siguientes resultados: Amikacina (AK): 18-20 µg/ml Gentamicina (CN): 18-22 µg/ml Ciprofloxacina (CIP): 19-21 µg/ml Ceftriaxona (CRO):18-22 µg/ml Amoxicilina + Àc. Clavulánico (AMC): 28-33 µg/ml. Por lo que se consideró fundamental estudiar los mecanismos de resistencia que presenta *Proteus* spp, en primera estancia hacia las fluoroquinolonas que fue uno de los grupos con mayor resistencia por la presencia de mutaciones cromosómicas, la producción de BLEE para betalactámicos y alteración del sitio diana o mutaciones de grupos hidroxilos y aminos presentes en aminoglucósidos.

Palabras clave: *Proteus* spp, enterobacterias, antibiorresistencia, inhibición, antibióticos, CMI.

ABSTRACT

Proteus spp is one of the most sensitive genera within the enterobacteria, it maintains sensitivity to aminoglycosides, beta-lactams and fluoroquinolones, however, due to the frequent and imprudent use of these antibiotics, an increase in the cut-off points for minimum inhibitory concentration has been observed which are statistically significant, this is due to the different mechanisms of resistance that the bacteria present and which represent a relevant problem in public health. In this research work, the antibioresistance of 18 strains of *Proteus* spp. was evaluated using the Kirby Bauer method for the following group of antibiotics: Amikacin, Gentamicin, Amoxicillin + clavulanic acid, Ceftriaxone, Ciprofloxacin, the results obtained were analyzed using the Kruskal Wallis test complemented with the Mann Whitney U test, obtaining results of antibiotic percentage of: Ciprofloxacin: 27.7%, Ceftriaxone:16.6%, Amoxicillin + clavulanic acid: 22.2% , Gentamicin and Amikacin: 0%. For the second phase, the cut-off points established by CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute, 2023) to evaluate the minimum inhibitory concentration, however, the inhibition curves increased with the following results: Amikacin (AK): 18-20 µg/ml Gentamicin (CN): 18-22 µg/ml Ciprofloxacin (CIP): 19-21 µg/ml Ceftriaxone (CRO):18-22 µg/ml Amoxicillin + Ac. Clavulanic acid (AMC): 28-33 µg/ml. Therefore, it was considered essential to study the mechanisms of resistance presented by *Proteus* spp, firstly towards fluoroquinolones, which was one of the groups with the highest resistance due to the presence of chromosomal mutations, the production of BLEE for beta-lactams and alteration of the target site or mutations of hydroxyl groups and aminos present in aminoglycosides.

Key words: *Proteus* spp, enterobacteria, antibioresistance, inhibition, antibiotics, CMI.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Una de las problemáticas más relevantes en salud pública ha sido la resistencia antibiótica puesto que su incremento ha sido considerable en los últimos años, dentro de los principales microorganismos causante se encuentran las enterobacterias, que además de contar con una eficaz diseminación también presentan mecanismos de resistencia, presunta habilidad adquirida por el uso desmedido e irresponsable de antibióticos. Dentro de las enterobacterias de mayor interés se encuentra *Proteus* spp, presentando un alto índice de contaminación en productos de consumo humano y planteles de distribución cárnica (Miranda et al., 2019).

El presente trabajo de titulación se basa en evaluar la antibiorresistencia de cepas de *Proteus* spp, las mismas que fueron aisladas con anterioridad de muestras de carne de pollo que se expende en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua. Teniendo como objetivo determinar los mecanismos mediante los cuales *Proteus* inhibe la acción de los fármacos, y de igual manera en aquellas cepas que se muestren sensibles establecer la dosis mínima que inhibe el crecimiento y desarrollo de la misma. Se lo llevará a cabo en dos fases, para la primera fase se empleó el método fenotípico Kirby Bauer el mismo que se encarga de reconocer las cepas como Resistentes (R), Intermedias (I), Sensibles (S) según se den los resultados obtenidos durante la medición de halos y comparándoles con los puntos de corte que se presentan en la (CLSI, 2023). Aquellas que sean determinadas como sensibles deberán someterse a la fase dos en la que se ejecutara CMI mediante dilución antibiótica y la utilización de un espectrofotómetro el cual arroja resultados midiendo la densidad óptica del cultivo y se interpretará por la curva de crecimiento que presenten los datos tabulados.

La importancia del desarrollo de dicha investigación se ve reflejada en la evidente influencia que tiene el estudio de la resistencia antibiótica en la salud pública, la misma que tiene una relación directa con la medicina veterinaria, debido a que los patógenos se encuentran presentes en productos de alto consumo humano como es la carne de pollo.

1.1 Antecedentes investigativos

Genética de *Proteus* spp que presentan genes adquiridos de resistencia a antibiótica.

Según Girlich et al. (2020) *P. mirabilis* se muestra resistente a varios antibióticos, entre ellos la colistina, y una notable reducida susceptibilidad al imipenem. Por otro lado, en aislados de *P. mirabilis* se registran altos niveles de resistencia al imipenem consecutivos a la pérdida de porinas, esto se debe a una expresión reducida de proteínas de unión a penicilina (PBP) PBP1a, PBP2, o podría deberse también a la adquisición de genes resistentes a antibióticos, como los genes de carbapenemasas. Además, se informa con frecuencia la resistencia a los no β -lactámicos, sobresalen los fármacos utilizados para tratar infecciones del tracto urinario (ITU) como las fluoroquinolonas y nitrofuranos. La propagación y aparición de aislados de *P. mirabilis* resistentes fármacos que producen betalactamasas de espectro extendido (ESBL), AmpC, cefalosporinasas y carbapenemasas.

Análisis del perfil microbiológico y resistencia antibiótica marcada de los urocultivos en pacientes ambulatorios

Según Díaz (2020), al analizar el perfil microbiológico de urocultivos realizados a pacientes ambulatorios se obtuvieron como resultados la presencia de varios agentes patógenos causantes de diferentes patologías del tracto urinario, entre ellos se destacaba *Escherichia coli* (89,7%) y *Proteus mirabilis* (3,6%). Al procesar las muestras para resistencia antibiótica, se obtuvieron resultados acerca de *Proteus* spp y la resistencia que

presenta de manera porcentual hacia Ciprofloxacina (57%), Ampicilina (71%), Norfloxacina (71%), Ácido Nalidíxico (71%), resaltando las cefalosporinas de 2° y 3° generación que presentaban resistencia de 53% y 57% de manera respectiva. En los estudios realizados se concluyó que dichos resultados se debían a la expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y de igual manera inhibidores de betalactama en *Proteus* spp evidenciando la necesidad por optimizar el tratamiento farmacéutico.

Distribución de genes de resistencia a betalactamasas de espectro extendido TEM y CTX-M entre especies de *Proteus* aisladas en Sudán

Según Musa et al. (2019) la sensibilidad antimicrobiana se alarga frente al juego de antibióticos: amoxiclav, amoxicilina, ceftazidima, cotrimoxaso, gentamicina, cefotaxima meropenem, ciprofloxacina y ceftriaxona. Se determinó resistencia antibiótica: amoxicilina 40%, gentamicina 22,2%, ceftazidima 25,6%, cotrimoxasol 21,1%, ceftriaxona 23,3%, y cefotaxima 18,9%. Pero la mayoría de los aislados fueron sensibles a ciprofloxacina (86,7%) y meropenem (92,2%). Usando la técnica de sinergismo de doble disco se encontró positividad a BLEE en alrededor de 20 aislamientos (22,2%). Mientras que mediante PCR se logró destacar que el gen que codifica TEM se encontraba presente en 18 aislamientos (90%); de forma combinado con el gen CTX-M en los otros siete (35%) y aislada en 11 aislamientos (55%).

Evolución e incremento de la resistencia antibiótica en agentes patógenos causantes de infecciones urinarias adquiridas en la comunidad.

Según Garín et al. (2020) en su investigación buscada dar a conocer la prevalencia de agentes patógenos causantes de infecciones a nivel del tracto urinario en la comunidad siendo una de las principales *Proteus* spp de igual manera determinar la sensibilidad que presenta hacia los antibióticos que se utilizan con mayor regularidad en los tratamientos

farmacológicos. Se llevó a cabo un estudio longitudinal de tipo retrospectivo manejando alrededor de 8.000 muestras de urinocultivos recogidos de los cuales 54% pertenecían a *Proteus* spp. La misma que presentó una tasa de resistencia incrementada para la mayoría de los antibióticos que fueron testados, significativamente hacia las quinolonas resultando en porcentajes cercanos al 30%. Dichos resultados podrían haber sido influenciados por la alta demanda que tienen las quinolonas al momento de emplear un tratamiento farmacológico, es decir su uso desmedido.

Identificación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* en pollos de engorde suplementados con diferentes aditivos comerciales.

Según Pacsi (2021) se llevó a cabo el presente estudio con objetivo de reconocer los patógenos bacterianos oportunistas de la familia *Enterobacteriaceae* aislados que se presentan con mayor frecuencia en pollos de engorde suplementados con varios aditivos comerciales. Dentro de las enterobacterias que fueron encontradas están; *Escherichia Coli*, *Enterobacter* spp y *Proteus* spp. Destacando que en este estudio no hubo presencia alguna de *Salmonella* spp. Los resultados que se obtuvieron mostraron que los pollos del grupo alimentados con dieta basal con probióticos (DPB) y dieta basal con extracto de plantas (DEP) obtuvieron un menor porcentaje de bacterias encontradas en intestino, lo cual estuvo seguido del grupo de pollos con la dieta control que contenía una basal estándar sin aditivos (DCSA). Dentro de 10 días en las aves DEP y DPB se determinó un 0% de *Enterobacter* spp.

1.2 Categorías fundamentales

1.2.1 *Proteus* spp taxonomía y generalidades

Tabla 1. Taxonomía de *Proteus* spp

Dominio	<i>Bacteria</i>
Filo	<i>Pseudomonadota</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Enterobacterales</i>
Familia	<i>Morganellaceae</i>
Género	<i>Proteus</i>

Fuente: (NIH, 2023)

Proteus, son identificados como bacilos gram negativos anaerobios facultativos y quimioorganótrofos que poseen movilidad gracias a sus flagelos peritricos. Destacando también su habilidad para adaptarse hacia dos tipos de metabolismo tanto fermentativo como respiratorio. En su mayoría son patógenos oportunistas, pero también se podrían presentar como agentes causales en infecciones comunitarias por lo que se reconoce su importancia tanto en salud animal como humana (Wang et al., 2021).

Generalmente pueden llegar a medir de 0,4 a 0,6 μm por 1 a 3 μm , sin embargo, podrían verse también como cadenas de cocobacilos o aislados y filamentosas durante su forma joven. Actualmente el género *Proteus* se encuentra altamente distribuidas y juegan un papel vital al momento de degradar la materia orgánica, por lo que podrían encontrarse en el agua, suelos, a nivel intestinal en humanos y varios animales domésticos, de granja incluso aves y reptiles (Wang et al., 2021).

1.2.2 Estructura antigénica de *Proteus* spp

Proteus se encuentra conformada por antígenos flagelares (H), somáticos (O) y capsulares (K) los mismos que se utilizan para la diferenciación de serovares, además posee cadenas polisacáridicas del LPS que muestran varias diferencias estructurales lo que hace posible clasificar y agrupar las diferentes cepas de *Proteus* que hay en serogrupos, las mismas que se rigen por el tipo de aglutinación que presente frente a los anticuerpos (Girlich et al., 2020).

1.2.3 Aspectos patogénicos de *Proteus* spp

1. Estructuras superficiales que brindan mayor importancia a los flagelos y su influencia en el efecto swarming, además de proteínas de membrana, diversos tipos de fimbrias, lipopolisacáridos y cápsula (Musa et al., 2019).
2. Principalmente productos secretados como enzimas y proteínas, destacando una proteasa ZapA como la ureasa por su habilidad durante la degradación de IgA e IgG y de igual manera hemolisinas, además de la formación de biopelículas (Musa et al., 2019).

1.2.4 Factores relevantes de virulencia en *Proteus*

Al hablar de las características fenotípicas de *Proteus* se destaca siempre su capacidad para desplazarse desde su punto de inoculación hacia toda la superficie de medios sólidos como son el agar, lo cual conocemos como efecto swarming que se presenta debido a las propiedades dimórficas de *Proteus* así como su comportamiento grupal de las colonias en la periferia, desplazándose unos sobre otros (Bello, 2023).

El efecto swarming se lleva a cabo en tres fases: la diferenciación, migración y consolidación. Durante la primera fase cuando se da el crecimiento en medios líquidos se los puede presenciar como bacilos aislados y cortos que poseen alrededor de 6 a 10 flagelos peritricos, pero su estructura suele cambiar cuando son trasladados a medios sólidos por lo que podrían apreciarse como células largas no septadas, además incrementan su número de flagelos a más de 1000, a esta restructuración se las denomina células swarmer. Durante la segunda fase todo el contenido celular tiende a moverse en diferentes direcciones que partes del sitio de inoculación original, este fenómeno podría durar varias horas (Bello, 2023).

Una vez terminada la etapa de movimiento empieza la tercera fase denominada también etapa de consolidación, consiste en una nueva división activa de las bacterias filamentosas que darán lugar a nuevas formas cortas por lo que la masa de bacterias aumentará considerablemente junto en el punto donde la colonia se detuvo, haciendo que el borde se aprecie mucho más grueso (Soriano & Pool, 2019).

Después se da inicio a otro ciclo de tres fases brindado a la colonia su aspecto característico. Es importante aclarar que la diferenciación en células swarmer está vinculada al incremento de síntesis de lipopolisacáridos que brinda fluidez a la membrana externa y la presencia de polímeros largos O. También se presentan eventos que facilitan su migración, como la producción del polisacárido capsular y extracelular de biopelículas que forman una fina capa para cubrir las células. Por lo tanto, las células swarmer son conocidas como la forma virulenta de *Proteus* y en la etapa de diferenciación ocurre eventos importantes como la síntesis de hemolisinas, ureasa y proteasas (Musa et al., 2019).

Tabla 2. Factores de virulencia presentes de *Proteus* spp.

Factores de virulencia	Efecto en la patogenicidad
Fimbrias	Brinda adhesión epitelial.
Flagelos	Brinda movilidad facilitando la colonización y diseminación.
Ureasa	Desdoblamiento eficaz de la urea y alcalinización de pH.
Proteasas	Enzimas degradadoras de inmunoglobulinas.
Desaminasas	Formación de sideróforos conocidos como alfa-cetoácidos.
Hemolisinas	Posibilitan la adherencia y por ende la invasión celular.
Lipopolisacáridos	Contribución a la endotoxicidad.
Polisacáridos capsular	Esencial para la producción de biofilms.

Fuente: (Girlich et al., 2020).

1.2.5 Sensibilidad de *Proteus mirabilis* y *Proteus vulgaris* a los antibióticos

En cuanto a la sensibilidad que *Proteus* spp presenta se debe reconocer que las cepas de *Proteus mirabilis* son mucho más sensibles a los antibióticos que las de *Proteus vulgaris*, pero en general *Proteus* tiende a presentar cierta resistencia a las tetraciclinas y la colistina. La resistencia que se presenta hacia la colistina está ligada a la presencia de un lipopolisacárido que posee extensos grupos de 4-amino-L-arabinosa reduciendo notablemente la afinidad hacia los antibióticos polipéptidos. Se debe a que imposibilitan el desplazamiento de los iones Ca^{2+} y Mg^{2+} del lipopolisacárido y de igual manera una notable desorganización de membranas internas y externas de la pared bacteriana así mismo la muerte celular (Soriano & Pool, 2019).

Por otro lado, la resistencia que presentan hacia las tetraciclinas se encuentra regulado por el gen cromosómico TetJ el cual podría ser inducido. *Proteus* presenta también un sistema de transporte denominado AcrAB el cual se asocia a la resistencia intrínseca hacia las

tetraciclinas y de igual manera a la falta de sensibilidad en cuanto a glicilciclinas (Soriano & Pool, 2019).

También poseen porinas que denotan la baja permeabilidad logrando así la pérdida de sensibilidad a los carbapenemes específicamente al imipenem, se ha llegado a verificar este fenómeno por la marcada elevación en los valores de CIM denotando rangos entre 4-8mg/l. Sin embargo, *Proteus mirabilis* no posee la habilidad de sintetizar de forma natural β -lactamasas cromosómicas como AmpC o similares, debido a esto este fenotipo es sensible a todos los antibióticos β -lactámicos a los que se pueda exponer, teniendo como excepción la penicilina (Girlich et al., 2020).

Proteus vulgaris también posee fenotipos salvajes que presentan resistencia a las cefalosporinas de primera y segunda generación y de igual manera a las aminopenicilinas, es representativa su resistencia a la cefuroxima, sin embargo, las colonias aisladas podrían ser presentadas como sensibles al menos hasta un 30% (Girlich et al., 2020).

1.2.6 Resistencia adquirida por parte de *Proteus* spp a los antibióticos.

Proteus mirabilis se caracteriza por presentar la habilidad de adquirir resistencia hacia los β -lactámicos aunque no sea nada común, lo hace mediante enzimas que incluyen β -lactamasas de amplio espectro (BLEA), enzimas de tipo AmpC plasmídicas y de igual manera de espectro extendido (BLEE). En cuanto a su resistencia presentada hacia la amoxicilina es debido a la presentación de otras enzimas betalactamasas conocidas como TEM-1 y TEM-2, e incluso podrían presentar enzimas que le hacen frente a los inhibidores como TEM-44, TEM-65, TEM-74 y TEM-73 (Mouiche et al., 2019).

También se resalta la resistencia marcada de *Proteus* spp para las fluoroquinolonas, algunos de los mecanismos más conocidos son la sobreproducción de bombas de eflujo AcrAB y la modificación del sitio blanco, durante el cual se da una combinación de varias mutaciones en QRDR que se conoce como la región determinante de resistencia a quinolonas, de los genes que se encargan de codificar al ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) de igual manera a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) (Mouiche et al., 2019).

En cuanto a *Proteus vulgaris* se identificaron mutaciones a nivel de los genes reguladores, presentando posibles desrepresiones de las enzimas β -lactamasas H μ gA y CumA, brindando así resistencia exclusivamente para ceftriaxona y una ligera pérdida de sensibilidad hacia las cefalosporinas en general. Dicha sensibilidad podría verse revertida cuando el antibiótico es combinado con ácido clavulánico o tazobactam (Mouiche et al., 2019).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la antibiorresistencia de cepas de *Proteus* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, provincia Tungurahua.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los fármacos en las cepas de *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris* clasificadas como sensibles.

- Establecer los mecanismos moleculares de resistencia de *Proteus mirabilis* y *P. vulgaris* ante los antibióticos.

1.4 Hipótesis

H0: Las cepas de *Proteus* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua muestran mayor resistencia a los antibióticos utilizados en la fase experimental de la investigación.

H1: Las cepas de *Proteus* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua no muestran mayor resistencia a los antibióticos utilizados en la fase experimental de la investigación.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Ubicación del experimento

La ubicación del presente estudio recae en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato, situada en la provincia de Tungurahua, cantón Cevallos como una extensión de 19,000 km², altitud de 2.882 msnm, latitud 1°22'08.7" y longitud 78° 36'23.8".

2.2 Características del lugar

Tabla 3. Características del Cantón Cevallos

Parámetro	Valor
Clima	Ecuatorial Meso TérmicoSeco
Temperatura °C	13 a 16
Humedad relativa, %	60 a 75
Velocidad del viento, m/s	2.1 a 8.9
Precipitación, mm	200 a 500

Fuente: (GAD Cevallos, 2022)

2.3 Materiales y Equipos

Tabla 4. Equipos y Materiales

Materiales de laboratorio	
<ul style="list-style-type: none">• Cajas Petri• Vasos de precipitación• Tubos de ensayo• Micropipetas• Varilla de agitación• Gradilla• Papel de Aluminio• Cucharas de medición• Puntas de micropipeta• Tubos Eppendorf• Guantes de látex• Tampones• Palillos de cultivo	<ul style="list-style-type: none">• Probeta• Matraz Erlenmeyer• Mecheros bunsen• Mascarilla• Zapatones• Bata quirúrgica• Cofia• Papel Kraft• Portaobjetos• Cintas testigo• Cubetas• Asas de siembra• Jeringas
Reactivos	
<ul style="list-style-type: none">• Agua destilada• Infusión cerebro-corazón (TM MEDIA)• Agar Müller Hilton (TM MEDIA)• Agua Luria Bertani (TM MEDIA)• Alcohol	<ul style="list-style-type: none">• Discos de antibiograma• Agar Tripticasa de Soya• Amikacina (1g/2ml)• Ceftriaxona• Amoxicilina + Ác. Clavulánico• Gentamicina• Ciprofloxacina
Equipos	
<ul style="list-style-type: none">• Balanza Analítica FC 2000 (2000 g; 0,01 g)	<ul style="list-style-type: none">• Incubadora• Refrigeradora

-
- Baño María
 - Agitador magnético con plancha de calentamiento
 - Espectrofotómetro
 - Autoclave
 - Vortex

Insumos extra

- Computadora
 - Rotulador
 - Cinta adhesiva
 - Cámara fotográfica
 - Cuaderno de apuntes
 - Esferos
-

2.4 Factores de Estudio

Tabla 5. Discos de antibióticos

Fármaco	Simbología	Descripción
Amikacina	AK 30 µg	Aminoglucósido con acción bactericida, actúa uniéndose a la subunidad 30s de los ribosomas bacterianos, con el espectro más amplio, interfiere en la síntesis proteica.
Ceftriaxona	CRO 30 µg	Cefalosporina de tercera generación, presenta acción bactericida debido a su capacidad de inhibir la síntesis de la pared celular de la bacteria.
Ciprofloxacina	CIP 5 µg	Fluoroquinolona, inhibe el superenrollamiento del ADN por la girasa, bloqueando la replicación del ADN bacteriano.
Amoxicilina + Ácido Clavulánico	AµG 3 µg	Betalactámico junto a un inhibidor de betalactamasas, inhibe la síntesis de la pared bacteriana previniendo también la acción de las enzimas bacterianas resistentes.

Gentamicina	CN 120 µg	Aminoglucósido, acción bactericida por unión irreversible a la subunidad ribosómica bacteriana 30S, evitando la síntesis proteica.
-------------	-----------	--

Fuente: (Mouiche et al., 2019).

2.5 Análisis estadístico

2.5.1 Tamaño de la muestra

Se trabaja con un total de 18 muestras identificadas molecularmente de *Proteus* spp, actualmente conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Ambato.

2.5.2 Diseño experimental

La presente investigación se desarrolló en dos fases.

Durante la primera fase que consiste en la medición de sensibilidad bacteriana frente a los diferentes fármacos, la variable será considerada la respuesta de sensibilidad/resistencia para los diferentes fármacos evaluados.

Los datos que fueron recolectados en la primera fase son considerados como variables cualitativas por lo tanto no presentan homogeneidad y tampoco una distribución normal, por esa razón el análisis estadístico se llevó a cabo con pruebas no paramétricas empleando la prueba de Kruskal Wallis integrada con la prueba U de Mann Whitney, se utilizó también el programa SPSS 26.0 ejecutando un nivel de significación del 95%.

En la segunda fase, los fármacos que hayan sido determinados como sensibles en la fase 1, se someterán a evaluación en términos de CMI a diferentes concentraciones farmacológicas considerando las directrices expuestas por la CLSI. La evaluación será llevada a cabo mediante un análisis de densidad óptica en el cual se usará el espectrofotómetro, midiendo la concentración bacteriana (# de bacterias/ml) por la cantidad de luz absorbida en las muestras de los cultivos.

Los datos que se han recolectado durante la fase dos fueron tabulados en Microsoft Excel 2016, se interpretó los resultados para presentarlos en estadística descriptiva complementada con gráficos y tablas.

2.6 Metodología

Para el desarrollo del presente proyecto investigativo se trabajó con 18 cepas de *Proteus* spp las cuales fueron molecularmente identificadas y se encuentran conservadas en los Laboratorios de Biología Molecular de la Universidad Técnica de Ambato, cada una de ellas se mantienen a -20°C en eppendorfs, con su respectivo etiquetado y organizados en gradillas para crioviales.

2.6.1 Fase 1. Refrescar las cepas de *Proteus* spp en Trypticase de soya

2.6.1.1 Preparación del medio Agar TS

El Agar TS fue utilizado para refrescar las cepas debido a que no es un medio selectivo, sin embargo, para aquellos microorganismos exigentes se aprecia en su composición sangre y peptona de soya lo cual ayuda específicamente con el crecimiento de los mismos, además de cloruro de sodio que brinda equilibrio dentro del balance osmótico, gracias a todos estos componentes se puede promover el aislamiento y desarrollo de los

microorganismos independientemente de que sean aerobios o anaerobios (Britanialab, 2021).

1. Empezamos esterilizando todo el material en la autoclave a 120°C.
2. Pesar la cantidad que se vaya a utilizar en la balanza analítica, generalmente 38g.
3. Añadimos los 38g de TS en 1000ml de agua destilada esterilizada, siguiendo las indicaciones del producto, todo en un vaso de precipitación.
4. Colocar el vaso de precipitación en el agitador magnético durante 10 minutos para homogenizar.
5. La temperatura del agitador magnético se debe ir incrementando cada 10 minutos, iniciando desde 150°C, esperar al punto de ebullición.
6. Al llegar al punto de ebullición se trasvasa la mezcla a un frasco de vidrio de borosilicato y se vuelve a autoclavar a 120°C durante 20 minutos.
7. Una vez autoclavado, se debe placar inmediatamente usando placas Petri esterilizadas, esperamos 15 minutos para voltear las placas.
8. Dejar reposar por 24 horas hasta obtener un aspecto sólido para proceder a sembrar.

(TM media, 2022).

2.6.1.2 Siembra de cepas de *Proteus* spp en TS

1. Buscamos los eppendorfs que contengan la cepa que se vaya a utilizar y se deja ambientar por 10 minutos en el cuarto estéril cerca del mechero.
2. Mientras se ambienta la bacteria se puede proceder a rotular las placas Petri, colocando el código y nombre de cada cepa.
3. Color la gota, con ayuda de un palillo estéril para siembra se recoge una muestra del eppendorf y se coloca en la placa, siempre cerca del mechero.
4. Esperar de 3-4h hasta que la gota se seque completamente y estriar con un asa estéril.
5. Debemos colocar las placas volteadas en la incubadora a 37°C por 24h.

2.6.2 Siembra de colonias de *Proteus* spp en Infusión Cerebro-Corazón

2.6.2.1 Preparación de Infusión Cerebro-Corazón

Se decidió utilizar Infusión Cerebro-Corazón debido a que es un medio altamente nutritivo, algunos de sus componentes de mayor interés son: cerebro de ternera y corazón de bovino que promueven el crecimiento de microorganismos, además contiene peptona que aportan nitrógeno, carbono, péptidos, aminoácidos y varias vitaminas que promueven el desarrollo de las colonias (Britanialab, 2021).

1. Primero se debe esterilizar todos los materiales a 120°C en la autoclave.
2. Preparar el medio, pesar 37g de Infusión CC en la balanza analítica y colocarla en el vaso de precipitación con 1000ml de agua destilada.
3. Mezclar con ayuda del agitador magnético por 10 minutos, hasta homogenizar la mezcla.
4. Incrementar la temperatura cada 10 minutos partiendo siempre desde los 150°C.
5. Al llegar al punto de ebullición se debe, trasvasamos la mezcla a un frasco de vidrio y coloca en la autoclave a 120°C durante 20 minutos.
6. Al salir de la autoclave de coloca inmediatamente en baño maría por 30 minutos a 35°C, hasta ambientar la mezcla y poder utilizarla.
7. Cerca del mechero, rotular los tubos de ensayo colocando el nombre, código y número de réplica de cada cepa (#3), y llenar con 5ml de Infusión CC colocando siempre tampones esterilizados

(TM media, 2022).

2.6.2.2 Siembra de colonias de *Proteus* spp en Infusión CC.

1. Con un asa estéril recolectar de 5-6 colonias aisladas anteriormente sembradas en Agar TS cerca del mechero.
2. Añadir las cepas recolectadas en los tubos de ensayo que fueron llenados anteriormente con Infusión CC.
3. Llevar a la incubadora a 37°C por 3 horas.

2.6.3 Para Antibiorresistencia siembra de *Proteus* spp en Müller Hilton

2.6.3.1 Preparación de Agar Müller Hilton

El presente medio fue seleccionado debido a una recomendación elaborada de parte de la CLSI, además de ser uno de los medios más utilizados para procedimientos de antibiorresistencia., debido a que no es selectivo y sus componentes estimulan el desarrollo y crecimiento de los microorganismos, posee almidón, infusión de carne, sangre ovina y peptona ácida de caseína lo que promueve una reproductividad eficaz lote a lote en pruebas de sensibilidad antibiótica (Britanialab, 2021).

1. Colocar todos los materiales en la autoclave a 120°C para esterilizarlos.
2. Con ayuda de la balanza analítica pesar 38g y añadir en un vaso de precipitación con 1000ml de agua destilada esterilizada.
3. Homogenizar la mezcla durante 10 minutos en el agitador magnético.
4. Incrementar la temperatura del agitador cada 10 minutos hasta llegar al punto de ebullición.
5. Trasvasar la mezcla a un frasco de vidrio y llevarlo a la autoclave durante 20 minutos a 120°C.
6. Al salir de la autoclave se debe placar enseguida para evitar que la mezcla se solidifique.

7. Una vez placado se debe dejar reposar por 24 horas el Agar hasta lograr un aspecto sólido y poder sembrar.

(TM media, 2022).

2.6.3.2 Siembra de *Proteus* spp en Agar Müller Hilton

1. Debemos partir de las cepas que fueron inoculadas previamente en Infusión Cerebro Corazón, tomar una muestra con ayuda de un hisopo estéril escurriendo siembre en los bordes del tubo para evitar el exceso de líquido.
2. Separar tres placas por muestra para mantener las réplicas y etiquetar cada una de ellas con el nombre y código de la cepa.
3. Estriamos la muestra en placas con Müller Hilton intentado rellenar toda la superficie y girar la placa durante 4 veces para cubrirla totalmente.
4. Reposar las placas durante 15 minutos para seguir con el procedimiento.

2.6.3.3 Colocación de discos de antibióticos en las placas

1. Verificar que las placas se encuentren completamente secas.
2. Colocar los discos con ayuda de una pinza esterilizada, empezando con el disco blanco que se usa como control y se debe ubicar en el centro de la placa.
3. Ordenar los 5 discos de antibióticos (AMC, CIP, CN, AK, CRO) alrededor del disco blanco manteniendo una distancia de 2cm entre discos y del borde de la placa.
4. Voltar las placas e incubar a 37°C durante 24h para poder comenzar con la lectura.

2.6.4 Lectura de resultados

1. Para poder proceder con la lectura de los resultados se debe verificar los valores establecidos por la CLSI.

Tabla 6. Halos de antibiorresistencia (mm).

Antibiótico	Sigla	Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina 30µg	AK	≤14	15 - 16	≥17
Gentamicina 10µg	CN	≤12	13 - 15	≥16
Ciprofloxacina 5µg	CIP	≤15	16 - 20	≥21
Ceftriaxona 30µg	CRO	≤19	20 - 23	≥23
Amoxicilina + Ácido Clavulánico 20/10 µg.	AMC	≤13	14 - 17	≥18

Fuente (Manual CLSI, 2023).

2. Para medir los halos de sebe posicionar la placa sobre una superficie oscura y una luz reflectante por encima, medir con ayuda de una regla (mm).
3. Tomar los datos de las tres réplicas para tabularlos en Excel y obtener la media de los mismos.

2.6.5 Fase 2. Determinar CMI de cepas Sensibles (S) a los antibióticos.

Según la tabulación realizada en la fase 1 se debe separar las cepas determinadas como sensibles (S) para establecer Concentración Mínima Inhibitoria de los diferentes antibióticos, incorporando desde la dosis más baja hasta que el antibiótico logre inhibir el crecimiento bacteriano.

2.6.5.1 Refrescar las cepas de *Proteus* spp y sembrarlas en TS.

Se debe seguir el mismo procedimiento de la fase 1, por lo que preparamos en primer lugar el Agar Trypticase de Soya y procedemos a sembrar las cepas sensibles seleccionadas y estriarlas en la placa, la cual usaremos para el desarrollo de la fase 2.

2.6.5.2 Siembra de colonias de *Proteus* spp en Luria Bertani (LB).

2.6.5.2.1 Preparación del medio Luria Bertani

El agar Luria Bertani fue el medio seleccionado para realizar CMH por brindar buenos parámetros de crecimiento para las colonias de *Proteus* spp, algunos de los componentes esenciales han sido extracto de levadura y peptona caseína, también se mantiene el equilibrio osmótico gracias al cloruro de sodio, se esta manera se presta un medio propicio para el crecimiento de microorganismos (Britanialab, 2021).

1. Esterilizar los materiales en la autoclave a 120°C durante 20 minutos.
2. Con ayuda de la balanza analítica pesar 25gr y añadir en un vaso de precipitación con 1000ml de agua destilada previamente esterilizada.
3. Colocar el vaso en el agitador magnético durante 10 minutos para homogenizar la mezcla.
4. Activar la temperatura a 150°C e incrementar cada 10 minutos hasta llegar al punto de ebullición.
5. Trasvasamos la mezcla de LB a un frasco de vidrio y se lo lleva a la autoclave a 120°C durante 20 minutos.
6. Colocamos 8ml del medio LB en los tubos de ensayo con ayuda de una jeringa estéril, los tubos deben estar rotulados incluyendo las 3 réplicas de cada cepa.

(TM media, 2022).

2.6.5.2.2 Siembra de colonias de *Proteus* spp sensibles en LB

1. Una vez obtenidas las cepas refrescadas en TS se recolecta con ayuda de un asa estéril de 5-6 colonias aisladas de *Proteus* spp.
2. Se colocan las colonias en el tubo de ensayo con LB teniendo cuidado de no tocar los bordes y homogenizamos la muestra con ayuda del Vortexer.
3. Con ayuda de una micropipeta se debe tomar 1000ul y colocar en una cubeta para espectrofotómetro.
4. Colocar la cubeta en el espectrofotómetro y medir la densidad óptica del mismo, calibrando con anterioridad del equipo a una longitud de onda de 600nm.
5. Se debe manipular la muestra hasta obtener una concentración de 0.500 A.
6. Antes de comenzar con el experimento se debe realizar una prueba inicial con diversas concentraciones de antibiótico, de esta manera se puede determinar las dosis con las que se llevará a cabo la siguiente fase.

2.6.5.3 Dilución de antibióticos en diferentes concentraciones

1. Se debe tener en cuenta las concentraciones registradas por la CLSI

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$)

Antibiótico	Sigla	Resistente	Intermedio	Sensible
Amikacina 30g	AK	≥ 16	8	≤ 4
Gentamicina 10g	CN	≥ 8	4	≤ 2
Ciprofloxacina 5g	CIP	≥ 4	2	≤ 1
Ceftriaxona 30g	CRO	≥ 4	2	≤ 1
Amoxicilina + Ácido Clavulánico 20/10 g.	AMC	$\geq 32/16$	18/8	$\leq 8/4$

Fuente: (Manual CLSI, 2023)

- Se debe partir de la dosis indicada por la CLSI, utilizando siempre dosis por encima y debajo de la dosis propuesta, en total 5 dosis que logren hacer denotar la curva de inhibición que demuestran los fármacos hasta lograr la CMI.

Las baterías de concentraciones que se utilizarán son las siguientes:

Tabla 8. Batería de concentraciones de prueba para CMI.

Antibióticos	Concentraciones (µg/ml)
Gentamicina (CN)	2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml
Ciprofloxacina (CIP)	0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml, 7 µg/ml, 9 µg/ml, 11 µg/ml, 13 µg/ml, 15 µg/ml, 17 µg/ml, 19 µg/ml, 21 µg/ml
Amikacina (AK)	2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml
Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMC)	3 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 13 µg/ml, 16 µg/ml, 19 µg/ml, 22 µg/ml, 25 µg/ml, 28 µg/ml, 30 µg/ml, 33 µg/ml
Ceftriaxona (CRO)	0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml, 7 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml, 22 µg/ml

- Es fundamental trabajar con todas las concentraciones en microlitros y por consiguiente agregarlas a los tubos de LB 8 ml, las fórmulas que se emplea para obtener la concentración son las siguientes:

Tabla 9. Batería de concentraciones determinadas

Antibióticos	Regla de 3	Concentraciones (µl)
Gentamicina (CN)	Concentración: 80 mg-2ml 80.000 µg - 2000µl 16µg (8ml LBx2µg)- X	0.5 µl, 0.8 µl, 1.2 µl, 1.6 µl, 2 µl, 2.4 µl, 2.8 µl, 3.2 µl, 3.6 µl, 4 µl, 4.4 µl.
Amikacina (AK)	Concentración: 200mg-20ml 200.000 µg - 20.000µl 16µg (8ml LBx2µg)- X	1.6µl, 3.2µl, 4.8µl,9,6uL 11.2µl, 12.8µl, 14.4µl, 16uL
Ceftriaxona (CRO)	Concentración: 1g-100ml 1.000.000µg - 100.000µl 4µg (8mlLBx0,5µg)- X	0,5µl, 0,8 µl, 2,4µl, 4 µl,5.6 µl, 6.4 µl, 9.6 µl, 11.2 µl, 12.8 µl, 14.4 µl, 16 µl, 17.6 µl.
Ciprofloxacina (CIP)	Concentración:200mg-20ml 200.000 µg - 20.000µl 4µg (8ml LBx0,5µg)- X	0.5 µl, 0.8 µl, 2.4 µl, 4 µl,5.6 µl,7.2 µl, 8.8 µl, 10.4 µl, 12 µl, 13,6 µl,15.2 µl, 16.8 µl
Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMC)	Concentración:1000mg-20ml 1000000 - 20.000 µl 24µg(8mlLBx3µg) - X	0.5 µl, 1 µl, 1.3 µl, 1.6 µl, 2.08 µl,2.6 µl, 3.04 µl, 3.5 µl,4 µl,4.5 µl,4.8 µl,5.3 µl

4. Una vez obtenidas las concentraciones en µl que se van a utilizar, se debe elaborar una batería agregando los µl de cada concentración de antibiótico en cada tubo de 8 ml de LB y homogenizar en el vortex.
5. Se debe organizar los tubos de ensayo en gradillas y rotular, exponiendo el nombre y código de cepa, número de réplica y la concentración de antibiótico que se evaluará.
6. De la mezcla homogenizada con una pipeta se debe tomar 100µl del antibiótico y colocar el tubo de ensayo respectivo. Homogenizar la muestra con ayuda vortex.
7. A todos los tubos de ensayo se debe agregar 100µl del tubo calibrado a 0.500A con bacteria y homogenizar con ayuda del vortex.

8. En cada prueba de CMI se debe contar con un control de bacteria en el que añadimos 100µl de bacteria al tubo de LB sin ninguna concentración de antibiótico, de igual manera se debe contar con un control de antibiótico en donde se agrega 100µl de antibiótico al tubo con LB sin bacteria.
9. Incubar las muestras por 24h para proceder con la lectura.

2.6.5.4 Lectura de resultados obtenidos

1. La lectura se realiza en el espectrofotómetro anteriormente calibrado a 600nm.
2. Primero se debe establecer el control blanco, para lo cual se debe tomar 1000µl de LB con ayuda de una pipeta y colocarlo en la cubeta, una vez en el espectrofotómetro se debe encerrar la muestra.
3. Se da inicio a la lectura de la forma más organizada posible y anotar los resultados para tabularlos al terminar.
4. Antes de cada lectura se debe homogenizar la muestra con ayuda del vortex y tomar 1000µl con la micropipeta para colocarla en una cubeta y posteriormente medirla en el espectrofotómetro.
5. Medir primero siempre el control bacteria puesto que representa el inicio de la curva.
6. Se debe iniciar por el Control Bacteria y luego seguir con la Original, R1 y R2.

2.6.5.5. Determinación de concentración de dosis definitivas.

1. De las pruebas que se han elaborado, se debe seleccionar 5 concentraciones con las que se pueda evidenciar la curva de inhibición antibiótica.

Tabla 10. Batería de Diluciones para CMI

Antibiótico	Concentraciones
Ceftriaxona (CRO)	1 µg/ml, 5 µg/ml, 14 µg/ml, 18 µg/ml, 22 µg/ml.
Amikacina (AK)	12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml.
Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMC)	6 µg/ml, 10 µg/ml, 22 µg/ml, 28 µg/ml, 33 µg/ml
Gentamicina (CN)	14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml, 22 µg/ml
Ciprofloxacina (CIP)	13 µg/ml, 15 µg/ml, 17 µg/ml, 19 µg/ml, 21 µg/ml

2. Una vez establecidas las concentraciones empleamos el mismo procedimiento detallado anteriormente con cada cepa que haya sido clasificada como sensible.
3. Rotular previamente cada tubo de ensayo con el código y nombre de la cepa para poder distinguir la original de sus repeticiones.
4. Registrar los datos, tabularlos y sacar la media de los mismos.

2.7. Variables respuesta

2.7.1. Cualitativa

- **Resistencia a Antibióticos evaluada mediante método Kirby Bauer**

Se clasifican las cepas de *Proteus* spp como Sensibles (S), Intermedia (I) o Resistente (R), tomando en cuenta el tamaño de los halos (mm) que presenten y comparándolas con directrices expuestas por la CLSI.

2.7.2. Cuantitativa

- **Concentración Mínima Inhibitoria**

La CMI refiere a la dosis más baja del antibiótico expresada en $\mu\text{g/ml}$, la cual es necesaria para inhibir el crecimiento de *Proteus* spp. Dato que se establece midiendo la absorbancia (luz transmitida a través del cultivo) de la muestra mediante una longitud de onda de 600 nanómetros.

2.8. Procesamiento de datos

Los resultados recolectados durante el presente estudio fueron registrados en una base de datos en Microsoft Excel ® 2016.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se llevó a cabo la interpretación de los resultados obtenidos y tabulados. En la primera fase de la investigación que refiere a la medición de los halos de inhibición de los diferentes antibióticos clasificando las cepas como Sensible, Intermedia o Resistente al fármaco, se utilizó el método fenotípico de Kirby Bauer, siguiendo los puntos de corte detallados según la (CLSI, 2023).

3.1 Prueba de sensibilidad a los antibióticos

Al analizar los datos tabulados se determina que de las 18 cepas de *Proteus* spp únicamente 6 de ellas presentan resistencia a diferentes antibióticos, denotando un mínimo porcentaje de (33.33%), perteneciendo la resistencia únicamente a Ciprofloxacina 27.77%, Ceftriaxona 16.66% y Amoxicilina + Ácido Clavulánico 22.22%. Por otro lado, Amikacina y Gentamicina no presentaron resistencia.

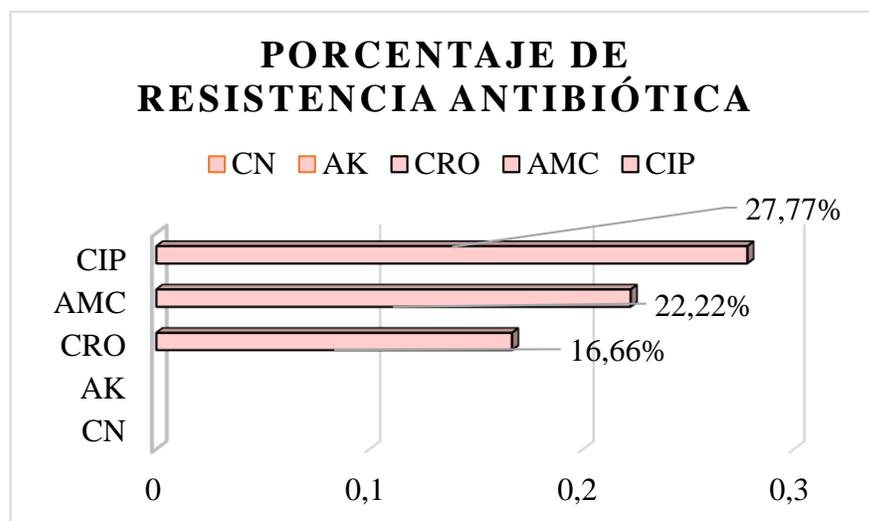


Figura 1. Porcentaje de Resistencia Antibiótica de *Proteus* spp.

CIP= Ciprofloxacina, AMC= Amoxicilina + Ácido Clavulánico, CRO= Ceftriaxona
AK= Amikacina, CN= Gentamicina.

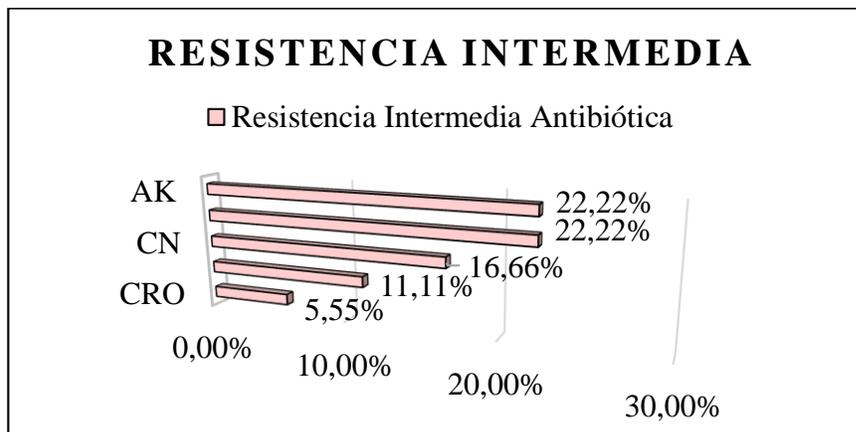


Figura 2. Resistencia intermedia a los antibióticos por *Proteus* spp.

En la figura 2 se consideró importante también presentar los porcentajes de cepas resultantes como resistencia intermedia, debido a que la mayor parte de ellas responden a Amoxicilina + Ácido Clavulánico que presentaba 22,22% de resistencia, sin embargo, los siguientes datos podrían resaltar que el incremento de la dosis en el fármaco podría inhibir el crecimiento de la bacteria.

Para realizar el análisis estadístico de la primera fase de la investigación, se procesaron los datos tabulados haciendo uso del método Kirby Bauer recuperando primero la media de las 3 réplicas de cada cepa en cuanto al tamaño de los halos, guiándonos por los puntos de corte que se exponen en la (CLSI, 2023).

Una vez procesados los datos se procede a organizarlos en una tabla partiendo desde la cepa más sensible hasta la más resistente, las cepas de *Proteus* spp más sensibles marcan medias que se aproximan más al 3 o son igual a 3 mientras que las más resistentes marcan medidas aproximadas al 1.

Según los datos representados en la figura 1 podemos analizar el bajo número de cepas de *Proteus* spp resultantes como multiresistentes, lo que nos indica que en realidad es un género de enterobacterias bastante sensible, mostrando una resistencia nula hacia Amikacina (0%) y Gentamicina (0%) ambos aminoglucósidos. Por otro lado, la resistencia que presenta es considerable para Ceftriaxona, Amoxicilina + Ác. Clavulánico y Ciprofloxacina, una de las razones por las cuales *Proteus* spp presenta resistencia hacia CRO es debido a la producción de β -lactamasas de espectro extendido conocidas también como BLEE, enzimas de clase A conocidas por su capacidad para degradar cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos, generalmente son codificadas por genes plasmídicos y pueden ser inhibidas por acción del ácido clavulánico, es por eso que este mecanismo de resistencia no funciona con AMC. En cuanto a la resistencia marcada para AMC es debido a la presencia de penicilinasas plasmídicas conocida como TEM-1 (Flores, 2022).

Según Díaz (2020), los resultados obtenidos en el presente trabajo investigativo se verían sustentados, ya que la resistencia por parte de *Proteus* spp es marcada principalmente para Ciprofloxacina, en su estudio realizado mediante el procesamiento de varias cepas de *Proteus* spp recuperadas de urocultivos realizados a pacientes ambulatorios, se pudo obtener resultados de resistencia marcada a Ciprofloxacina (57%), Ampicilina (71%), Norfloxacina (71%), Ácido Nalidíxico (71%), se consideró importante también tratar el tema de resistencia para cefalosporinas de 2° y 3° generación que presentaban resistencia de 53% y 57% respectivamente. Durante la investigación se pudo determinar que dichos resultados se debían a la expresión de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

Reforzando además dichos resultados con la investigación llevada a cabo por parte de Lima et al. (2023), que tenían como objetivo evidenciar la resistencia adquirida debido al uso desmedido de fluoroquinolonas en patologías del tracto urinario, por lo que se realiza perfiles de antibiorresistencia en 57 cepas de *Proteus* spp inoculadas y expuestas a ciprofloxacina, obteniendo una resistencia de aproximadamente 57% y 33% para betalactámicos, sin tomar en cuenta las cepas clasificadas en resistencia intermedia,

concluyendo con las consecuencias que trae el hecho de que las fluroquinolonas y los betalactámicos sean una de las primeras alternativas de tratamiento farmacéutico frente a patologías desencadenadas por enterobacterias.

Se consideran a las quinolonas como uno de los fármacos más propensos a la presentación de mecanismos de resistencia por parte de enterobacterias, teniendo en cuenta que originalmente las quinolonas inhiben a la topoisomerasa tipo II también conocida como ADN girasa, la misma que se encarga de proveer el nivel de enrollamiento de ADN necesario para facilitar el movimiento hacia los lugares donde se lleva a cabo la replicación y transcripción (Flores, 2022).

Algunos mecanismos de resistencia molecular son alteraciones en la permeabilidad acompañado de mutaciones que podrían reestructurar la membrana externa de las porinas. Dicha alteración podría provocarse por una mutación que tiende a modificar la estructura de las subunidades reemplazándolas por aminoácidos simples, en los casos que presentan alta resistencia a ciprofloxacina la mutación ocurre a nivel de la subunidad A de manera específica en el gen *gyrA* (Silva, 2022).

Tabla 12. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Proteus* spp aisladas de carne de pollo frente a cinco antibióticos (Amikacina, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Gentamicina, Amoxicilina + Ácido Clavulánico)

Cepas de <i>Proteus</i> spp	Sensibilidad <i>in vitro</i> <i>Rangos promedios</i>	Media de la escala
PM1 16S	174,5 a	3,00
HAMBI 91	174,5 a	3,00
FR207 16S	174,5 a	3,00

MHF ENV 410 16S	174,5 a	3,00
NCTC 11938 16S	174,5 a	3,00
UFV 131 16S	174,5 a	3,00
M17_J16 16S	174,5 a	3,00
BLPS5 16S	151,1b	2,80
PM1 16S	151,1 b	2,80
MP30346	151,1 b	2,60
JCM 1669	127,7 b	2,79
CRE14IB	119,9 b	2,40
AA5 16S	96,5 b	2,20
UFV 105 16S	96,5 b	2,20
MPE4069	88,7 b	2,00
ATCC 29906	88,7 b	2,00
MPE5203	80,9 b	1,80
10B 16S	65,3 b	1,80

Cepas de *Proteus* spp que lleguen a compartir letras en una misma columna quiere señalar que no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis integrada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$.

Podemos interpretar que estadísticamente las cepas se dividen en dos grupos, una que se marca como más resistente y otro como más sensible, sin embargo, no difieren dentro de sí, determinando a las cepas más sensibles como PM1 16S, HAMBI 91, FR207 16S y las más resistentes AA5 16S, MPE5203, 10B 16S.

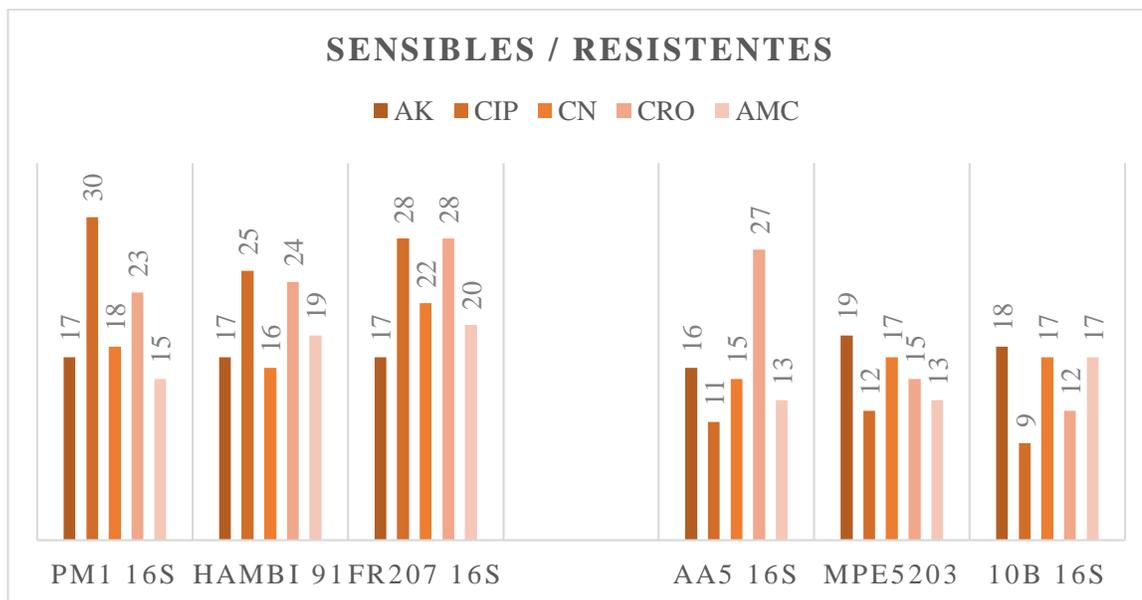


Figura 3. Representación de 3 cepas sensibles y 3 cepas resistentes de *Proteus* spp.

El análisis que se obtuvo de la tabla 12 es la mínima diferencia que encontramos en cuanto a la sensibilidad de las cepas de *Proteus* spp ya que gran parte de ellas se reconocen como altamente sensibles, mientras que un bajo número de las mismas se podrían determinar como multiresistentes. Sin embargo, de las cepas clasificadas se pueden dividir dos grupos 1MP30346 desde la cual se evidencia el incremento de resistencia en las cepas.

En cuanto a la figura 3 se buscaba resaltar la diferencia entre las primeras 3 cepas de *Proteus* spp más resistentes de las 3 cepas de *Proteus* spp más sensibles, de los resultados expuestos podemos resaltar que unas de las cepas más resistentes refieren a AA5 S16 una cepa de *Proteus vulgaris*.

En los resultados podemos analizar que la cepa de *Proteus vulgaris* muestra una resistencia marcada hacia Amoxicilina + Ác. Clavulánico, un fenómeno poco común en enterobacterias. Sin embargo, Navarro (2021) en su investigación acerca del perfil de resistencia antibiótica en cepas de *Proteus* spp, manejó alrededor de 500 muestras,

encontrando que alrededor de un 20% hacían referencia a *Proteus vulgaris*, de las cuales un 85% presentaban resistencia marcada a varios antibióticos, destacando Amoxicilina + Ác. Clavulánico. Comportamiento poco común considerando que las enterobacterias en su mayoría poseen betalactamasas de tipo cromosómico que se encargan de la hidrolización de cefalosporinas, lo que difiere de nuestros resultados puesto que la cepa AA5 S16 muestra sensibilidad marcada a ceftriaxona, que a su vez podría deberse al mecanismo de acción del fármaco.

De igual manera presenta resistencia hacia Amoxicilina + Ác. Clavulánico, que de todas maneras no coincide con la bibliografía, pero según el estudio de mecanismos de acción por parte de Navarro (2021), a pesar de que las betalactamasas cromosómicas hidrolizan la cefalosporina las mismas podrían ser inhibidas por Ác. Clavulánico lo que indicaría sensibilidad a AMC, aun así, la cepa AA5 S16 se muestra resistente, evento que podría deberse a la hiperproducción de cefalosporinasas CepA que dan lugar al mecanismo de acción de BLEE.

Martín (2020), en su estudio realizado sobre la evolución y mecanismos de resistencia en enterobacterias da a conocer el papel de *Proteus* spp frente a los antibióticos, señalando que pueden producir β -lactamasas ya sea mediadas por plásmidos o de orden cromosómico, que tienden a inactivar a las cefalosporinas de espectro extendido, pero además podrían presentar β -lactamasas de cuatro grupos diferentes siendo las principales y más descritas las del grupo 1 y 2 denominadas cefalosporinasas teniendo como función la hidrolización de las cefalosporinas pudiendo o no ser inhibidas por el Ác. Clavulánico, pero también se pueden presentar β -lactamasas de tipo 3 o 4 que brindan capacidades aún más resistentes ya que no son inhibidas por conocidos inhibidores de β -lactamasas.

Tabla 13. Efectividad de cinco antibióticos (Amikacina, Ciprofloxacina, Ceftriaxona, Gentamicina, Amoxicilina + Ácido Clavulánico) mediante ensayo de sensibilidad *in vitro* de cepas de *Proteus* spp aisladas de carne de pollo.

Antibiótico	Sensibilidad <i>in vitro</i> <i>Rangos promedios</i>	Media de la escala 1-3 Sensible/Resistente
Amikacina	131,17	3,00
Ciprofloxacina	133,33	2,33
Gentamicina	142,00	2,83
Ceftriaxona	135,50	2,78
Amoxicilina + Ácido Clavulánico	135,50	2,61

Antibióticos que en una misma columna compartan letras, no difieren estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis complementada con la prueba U de Mann Whitney para $p < 0,05$.

En la tabla 13 se puede analizar la media de escala para sensibilidad de los antibióticos en *Proteus* spp en la cual se puede evidenciar las cepas muestran un rango de sensibilidad bastante simétrico.

En cuanto a la alta sensibilidad presente el estudio de García (2019), refuerza dichos resultados ya que en su estudio determina el porcentaje de aislamiento y frecuencia de resistencia tipo BLEA y BLEE, dando como resultado que del manejo de 385 cepas de *Proteus* spp el 4,2% presenta BLEA y el 10,4% BLEE que es un porcentaje muy bajo en comparación a otras enterobacterias, BLEA y BLEE son algunas de las betalatasas más utilizadas para la presentación de resistencia ante los antibióticos, puesto que su

exposición es baja para *Proteus* spp se la consideraría como uno de los géneros más sensibles hacia los antibióticos.

En la tabla 13 consta también una resistencia evidente hacia ciprofloxacina, en el estudio bibliográfico de Navarro (2021), se expone que la actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas se caracteriza por inhibir las topoisomerasas, comúnmente la ADN-girasa y la topoisomerasa IV, ambas se conocen como enzimas heterotetraméricas que han sido formadas gracias a dos subunidades A y B las mismas que son codificadas anteriormente con genes *gyrA* y de igual manera *gyrB* en la topoisomerasa específicamente en ADN-girasa.

Entre los mecanismos de resistencia más presentados encontramos las mutaciones de genes pertenecientes al ADN-girasa y de igual manera la topoisomerasa IV, se puede presentar también mutaciones que afecten a lipopolisacárido o porinas, lo que impide notablemente la penetración al interior de la bacteria del fármaco, también puede incrementar la presencia de bombas de eflujo que se encargan de expulsar el antibiótico hacia el exterior de la bacteria (Flores, 2022).

Otro de los mecanismos por los cuales se puede presentar resistencia, aunque sea de bajo nivel es por el incremento de bombeo en el cual se encuentran alteraciones a nivel de membrana y afectando su permeabilidad. Este mecanismo al igual que los otros podría verse relacionado a las mutaciones ocurridas en las topoisomerasas (Sánchez, 2021).

En la tabla 13 se puede determinar también alta sensibilidad a los aminoglucósidos, el antibiótico más resistente es Amikacina marcando 3 en la media de escala, de igual manera Gentamicina también se presenta sensible que a pesar de ser parte de la familia de aminoglucósidos su nivel de sensibilidad está por debajo de Amikacina. Los

aminoglucósidos actúan frente a las enterobacterias mediante cuatro factores, entre ellos encontramos, el transporte activo a través de la membrana interna, difusión pasiva por medio de la membrana externa, presencia de enzimas inactivantes y por afinidad de aminoglucósidos por su diana la cual se conoce como una proteína ribosomal (Sánchez, 2021).

En el estudio bibliográfico de Córdova (2023) se realiza la detección de diferentes fenotipos marcadores de resistencia frente a los aminoglucósidos, brindando una explicación de porqué gentamicina marca menor sensibilidad a *Proteus* perteneciendo incluso a la misma familia de Amikacina que es el antibiótico más sensible, los estudios revelan que podría deberse a la enzima AAC, la cual es una de las enzimas de tipo AmpC realizando mutaciones a nivel de la transcripción de genes impidiendo así la penetración del antibiótico, fenómeno que puede afectar más cuando se presenta una interacción con gentamicina, sin causar resistencia pero si una disminución del halo de la misma comprendido entre 16 y 19 mm.

3.2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La segunda fase del trabajo investigativo conlleva en realizar la Concentración Mínima Inhibitoria de todas las cepas resultantes como sensibles a los diferentes fármacos (Amikacina, Gentamicina, Ceftriaxona, Ciprofloxacina, Amoxicilina + Ácido Clavulánico), los resultados se describen por fármacos, de esta manera se podrá resaltar diferencias entre cepas de ser encontradas y a su vez la dosis mínima a la cual se inhibe el crecimiento de *Proteus* spp y apreciar la curva de expresión bacteriana que se podría presentar. Esta fase se ejecutó mediante diluciones seriadas del antibiótico a diferentes concentraciones teniendo en cuenta la dosis inhibitoria para enterobacterias recomendada en la (CLSI, 2023)

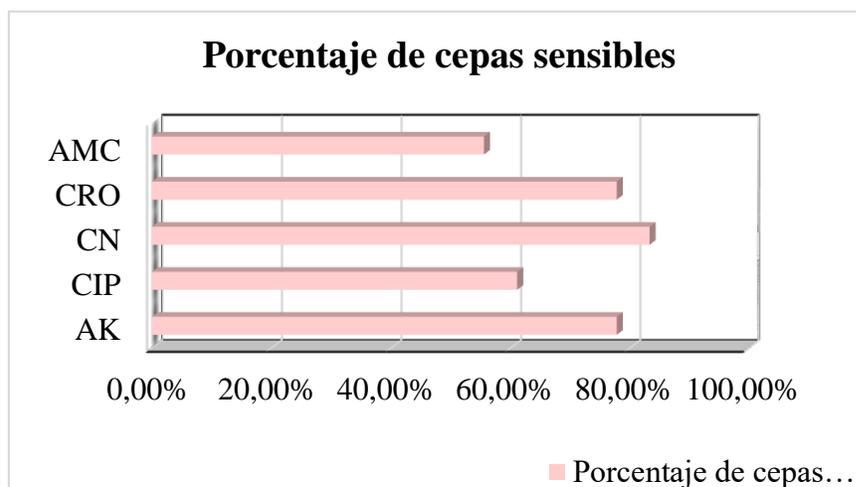


Figura 4. Porcentaje de cepas sensibles a los antibióticos

El número de cepas identificadas como sensibles fueron AK (14), CIP (11), CN (15), CRO (14), AMC (10), la diferencia numérica no es significativa sin embargo en la figura porcentual podemos evidenciar que Gentamicina es uno de los antibióticos con mayor actividad inhibitoria para *Proteus spp*, aun así, podemos definir a *Proteus spp* como un género bastante sensible por la poca diferencia marcada entre antibióticos.

Para llevar a cabo la CMI de los diferentes antibióticos evaluados en las cepas sensibles en primer lugar se debe establecer las dosis a evaluar, tomando en cuenta el punto de corte establecido por la CLSI por consiguiente establecer una batería amplia de concentración del antibiótico dejando la dosis indicada en la mitad de los valores, de esta manera podemos rectificar si en la actualidad la cepa actúa a una dosis menor o mayor, desde que punto de corte se empieza a observar la curva decreciente de expresión bacteriana y escoger una batería más corta de concentraciones a evaluar con el objetivo de encontrar el nuevo punto de inhibición para *Proteus spp* de cada fármaco.

Una vez establecida la batería de concentraciones antibióticas que se evaluará el procedimiento para establecer las curvas de inhibición se lo realiza midiendo los resultados por densidad óptica mediante el espectrofotómetro el misma que estará

configurado a una longitud de onda de 600nm, de esta manera se medirá el nivel de absorbancia de cada muestra y sus respectivas repeticiones para cada antibiótico, también nos podemos ayudar de las características fenotípicas de las muestras y la turbidez decreciente que deben ir presentando, para cumplir con el objetivo se identificará el punto de inhibición en el momento que el resultado maque a 0.000A el cual se denominará como CMI.

3.2.1. CMI de Aminoglucósidos

3.2.1.1 CMI de Amikacina

Según CLSI (2023), la CMI de Amikacina para enterobacterias es 4µg/ml.

- Batería de concentraciones de prueba: 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 16 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml.

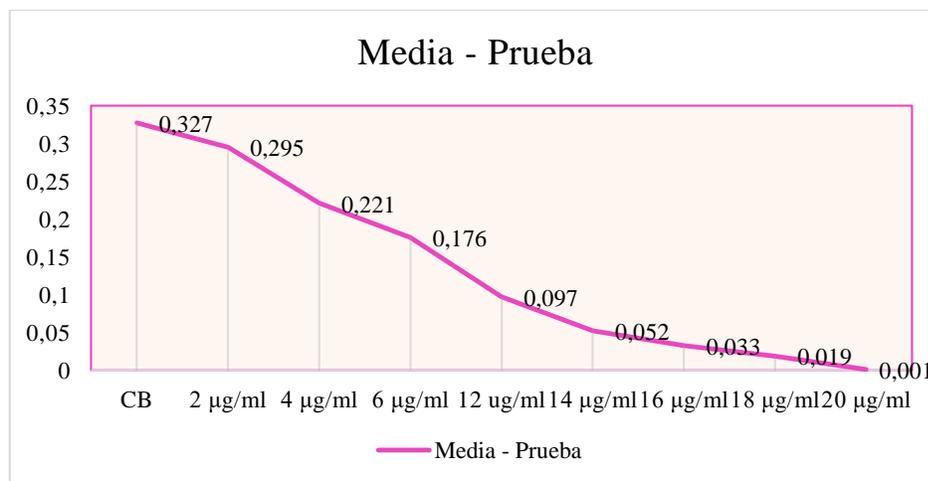


Figura 5. Batería de prueba para CMI - Amikacina

- Al analizar los resultados obtenidos de la prueba realizada con un extenso número de concentración de amikacina, se tomó la decisión de trabajar con: 12 µg/ml, 14

$\mu\text{g/ml}$, 16 $\mu\text{g/ml}$, 18 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, para las 14 cepas de *Proteus* spp identificadas como sensibles al mismo.

En cuanto a los resultados analizados de cada cepa y sus repeticiones no se encontró mayor diferencia entre ellas, se mantenía el punto de curva y el punto de inhibición para todas por lo que se realizó la media de los resultados para poder representarlos.

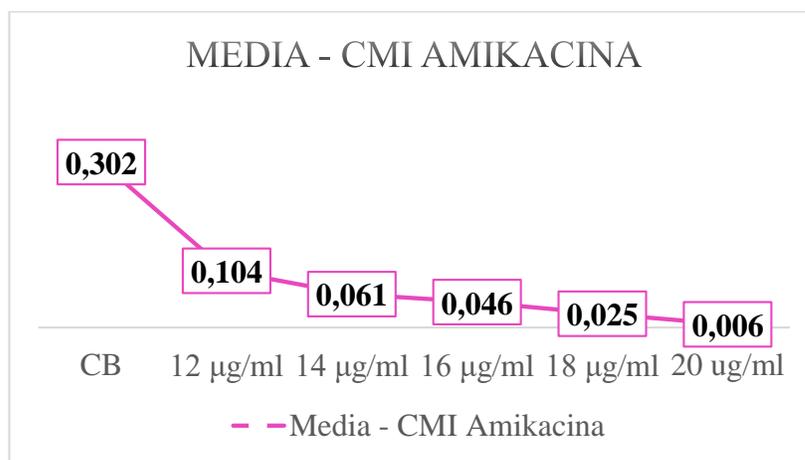


Figura 6. CMI - Amikacina

Según los datos registrados de las 14 cepas sensibles a Amikacina, de las cuales su comportamiento era bastante similar, en la media de los resultados con sus respectivas repeticiones representada en gráficos se evidencia el descenso de la expresión bacteriana al utilizar la dosis 12 $\mu\text{g/ml}$ la cual está indicada por la CLSI para enterobacterias, sin embargo, no llega a ser el punto de inhibición antibiótica, que a pesar de ir disminuyendo a medida que aumenta la concentración del antibiótico, al llegar a 20 $\mu\text{g/ml}$ la expresión de la bacteria se vuelve nula, siendo este el punto de CMI.

3.2.1.2 CMI de Gentamicina (CN)

Según lo establecido en la (CLSI, 2023) la CMI de Gentamicina para enterobacterias es 2µg/ml, debido a pruebas realizadas anteriormente se consideró necesario extender la batería con concentraciones del fármaco.

- Concentraciones probadas: 2µg/ml, 4µg/ml, 6µg/ml, 8µg/ml, 10µg/ml, 12µg/ml, 14µg/ml, 16µg/ml, 18µg/ml, 20µg/ml.

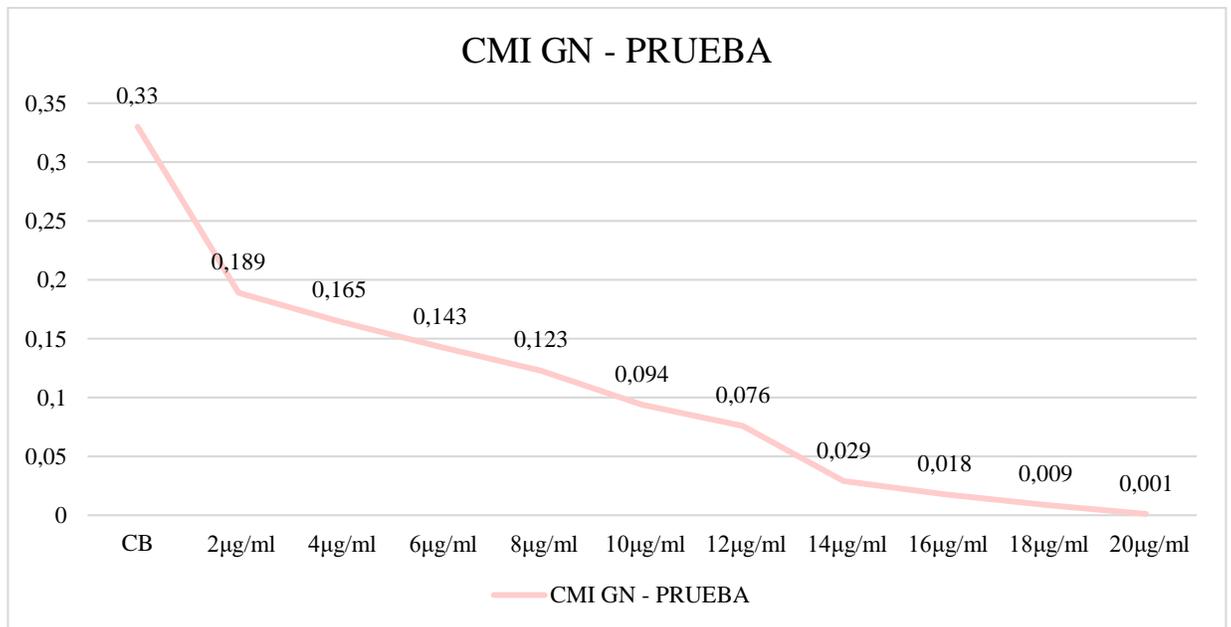


Figura 7. Batería de prueba para CMI – Gentamicina

Una vez realizada la prueba de extensas concentraciones para Gentamicina, se observa un gran descenso de actividad bacteriana en la dosis sugerida por CLSI la cual corresponde a 2 µg/ml, sin embargo, no es el punto de inhibición y en esta ocasión se necesitó una amplia extensión de dosis que a pesar de ir decreciendo y encontrar puntos de alto impacto para la disminución de presencia bacteriana como 14 µg/ml, pero el objetivo se mantiene en determinar el punto de inhibición completa lo cual se presentó a 20 µg/ml.

Debido a que 14 µg/ml fue una de las concentraciones de mayor impacto para la disminución de la expresión bacteriana se sugirió emplear la batería de concentraciones definitivas a partir de dicho punto para las 15 cepas sensibles a Gentamicina, que a propósito fue uno de los fármacos que registró mayor número de cepas sensibles.

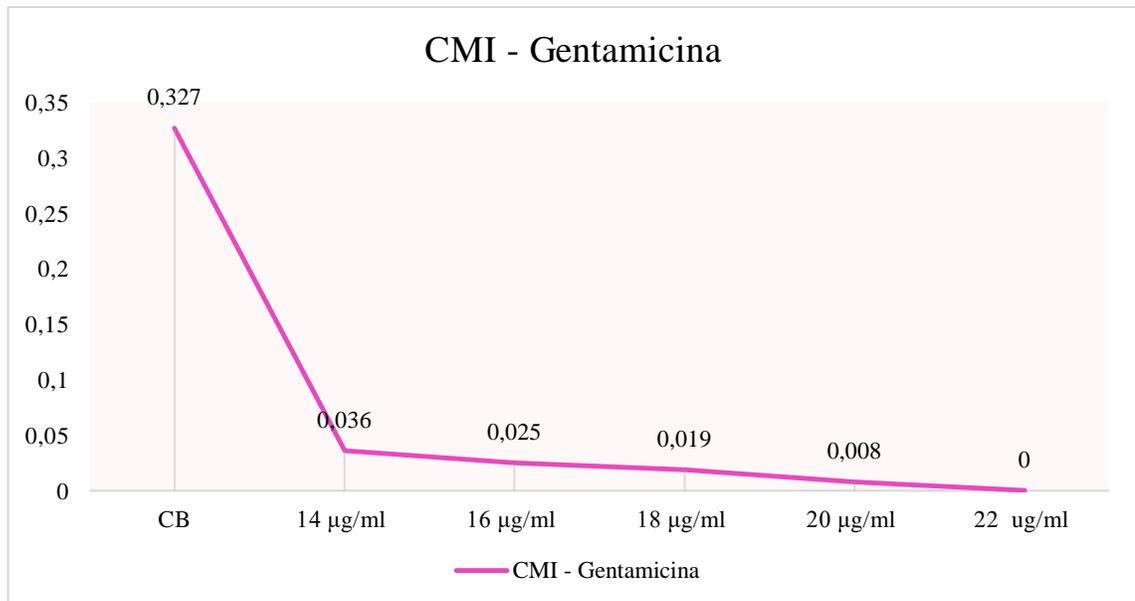


Figura 8. CMI - Gentamicina

Según lo representado en la figura 8 se realizó una media de los datos recolectados durante la CMI para gentamicina puesto que las cepas a evaluar tenían un comportamiento bastante similar, gentamicina denotó una curva bastante pronunciada en cuanto a la inhibición bacteriana pero también un aumento significativo de la concentración antibiótica para lograr la inhibición total. Se define a Gentamicina y Amikacina como los fármacos más sensibles para *Proteus* spp ambos de la familia de aminoglucósidos.

Se define a los aminoglucósidos como una de las familias de antibióticos que mayor espectro de acción presenta hacia microorganismos tanto gram positivos como gram negativos que es de nuestro interés, resaltando entre ellas a las enterobacterias, su mecanismo de acción se relaciona directamente con la concentración que se utilice del

fármaco, además de que presentar habilidad de sinergismo antibiótico pronunciado con betalactámicos maximizando se esta manera la eficacia de los mismos (Sánchez, 2021).

Los aminoglucósidos presentan eficacia ante las enterobacterias debido a su habilidad para atravesar la pared bacteriana de forma pasiva y de igual manera la membrana citoplasmática sin embargo esta se presenta como un mecanismo activo. Por consiguiente, fijan la subunidad 30S del ribosoma, causando alteraciones a nivel de la síntesis de proteínas, pueden también accionar sobre otros elementos como la membrana, ARN, ADN o subunidad 50S (Treviño & Molina, 2021).

Es importante resaltar que a pesar de que los aminoglucósidos presentan mecanismos de acción para enterobacterias, su eficacia siempre se encontrará relacionada con la concentración de fármaco que se vaya a utilizar puesto que de esta dependerá la rapidez e intensidad de acción. Generalmente la acción del fármaco se divide en tres fases, el primero es la rápida acción bactericida que se presenta durante la primera hora de inoculación, seguida por la fase de resistencia adaptativa por parte de la bacteria, principalmente el grupo de bacilos gramnegativos empezando el período refractario que se traduce al periodo en el que la acción bactericida se produce lentamente. Y como última fase se presenta el nuevo crecimiento bacteriano en el que la bacteria se destaca por su sensibilidad disminuida y a su vez la baja dosis de aminoglucósido (Treviño & Molina, 2021).

Otro de los aspectos a resaltar de los aminoglucósidos es la eficacia de su acción postantibiótico, ya que su actividad inhibitoria logra persistir incluso bajando la concentración del antibiótico a nivel del manejo terapéutico esto cuenta como una gran ventaja ya que permite el esparcimiento entre dosis sin perder la eficacia del antibiótico (Treviño & Molina, 2021).

En un estudio experimental realizado por Velasteguí (2019), en el cual se evaluaba el cociente inhibitorio para el análisis de antibiogramas de enterobacterias anteriormente aisladas, dicho estudio resalta que algunas de las enterobacterias con mayor expresión en patologías son el género *Proteus* spp (49%), del cual se llevó a cabo un estudio de sensibilidad antibiótica realizando concentración mínima inhibitoria de Amikacina, Gentamicina, Ceftriaxona y Ciprofloxacina, denotando que es susceptible a presentar mayor sensibilidad hacia Amikacina (87.6%) y Gentamicina (81.3%), mostrándose así como una de las alternativas para terapéutica de antibióticos más favorable y marcando una diferencia significativa de (20-23%) con las fluoroquinolonas.

Con la intención de complementar dichos resultados, se expone también el trabajo investigativo de Boussekey (2020), en el que también se expone a los aminoglucósidos como uno de los grupos más sensibles hacia las enterobacterias, contando con varias cepas aisladas de *Proteus* spp (#134) recolectadas por urocultivos de pacientes ambulatorios, contando con una sensibilidad marcada hacia Amikacina (64,3%) pero además se estudió también los mecanismos por los cuales actúan los aminoglucósidos y dichos mecanismos no se ven alterados por el tiempo y la concentración del antibiótico otorgando a los mismos resultados eficaces postantibiótico, y renovando a su vez el punto de corte expuesto por la CLSI para gentamicina (2 µg/ml) ya que según su trabajo experimental la intensidad de los mecanismos de acción del fármaco sólo alcanzarían el umbral incrementando la dosis hasta 8 veces más, puesto que los aminoglucósidos se ven alterados por la concentración del fármaco y crean muy poca dependencia con el espaciamiento de la dosificación (Velasteguí, 2019).

3.2.2 CMI de Betalactámicos

3.2.2.1 CMI de Ceftriaxona (CRO)

Según CLSI (2023) la CMI de Ceftriaxona para enterobacterias es 1 µg/ml

- Batería de prueba: 0,5µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml, 8µg/ml, 12µg/ml, 14µg/ml, 16µg/ml, 18µg/ml, 20µg/ml, 22µg/ml

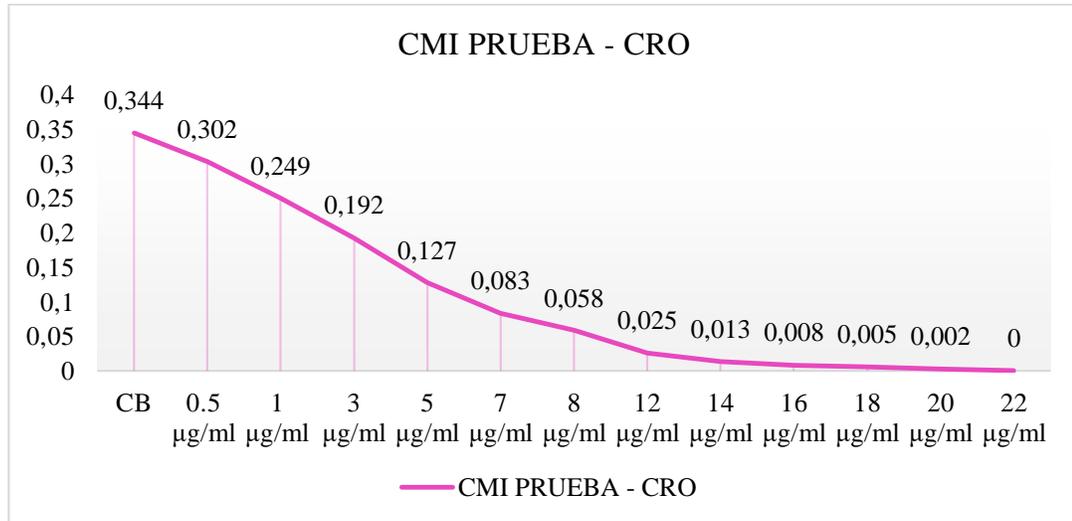


Figura 9. Prueba CMI – Ceftriaxona

Una vez realizada la prueba de extensa variación de concentraciones para las 14 cepas sensibles a ceftriaxona, se decide trabajar con una batería más corta de: 1µg/ml, 5µg/ml, 14µg/ml, 18µg/ml, 22µg/ml, para cada cepa con su respectiva réplica para posteriormente recolectar los datos y obtener la media de los mismos.

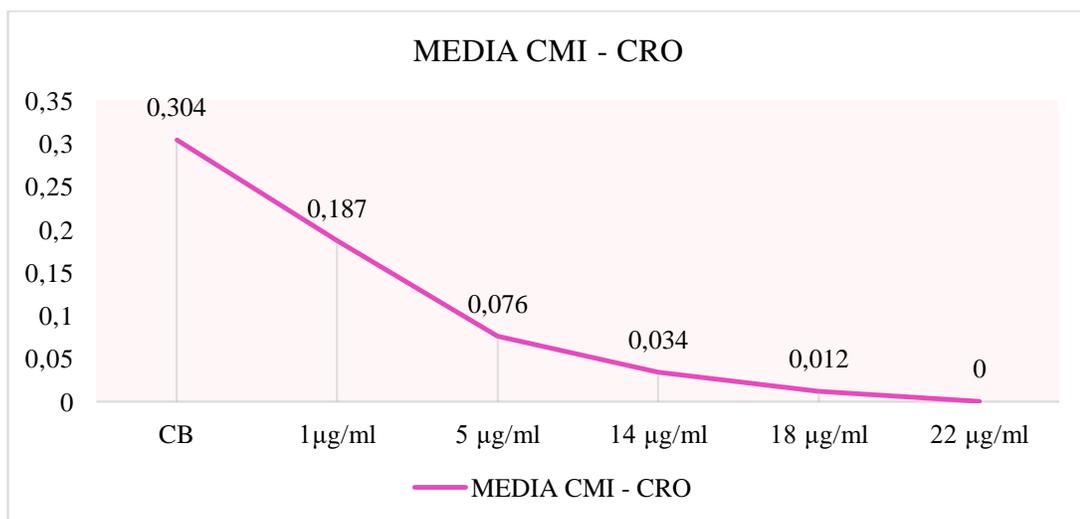


Figura 10. CMI - Ceftriaxona

El análisis de los datos recae en la evidente extensión de concentración que se presentó, ya que la dosis establecida en la CLSI era 1 µg/ml y a pesar de que se evidencia un descenso de la expresión bacteriana no llega a ser el punto de CMI, sino que tiene varias concentraciones de significativa disminución bacteriana, por esta razón las concentraciones se encuentran bastante distanciadas, sin embargo, es importante resaltar que hay a partir de 14 µg/ml la inhibición comienza a presentarse de manera muy notable e importante hasta llegar a su punto de inhibición completa en 22 µg/ml, según los datos recolectados son sus respectivas repeticiones y la media establecida.

3.2.2.2 CMI de Amoxicilina + Ácido Clavulánico (AMC)

Según CLSI (2023) la CMI de Amoxicilina + Ácido Clavulánico para enterobacterias es 8/4 µg/ml.

- Bateria de concentraciones probadas: 3 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml, 13 µg/ml, 16 µg/ml, 19 µg/ml, 22 µg/ml, 25 µg/ml, 28 µg/ml, 30 µg/ml, 33 µg/ml.

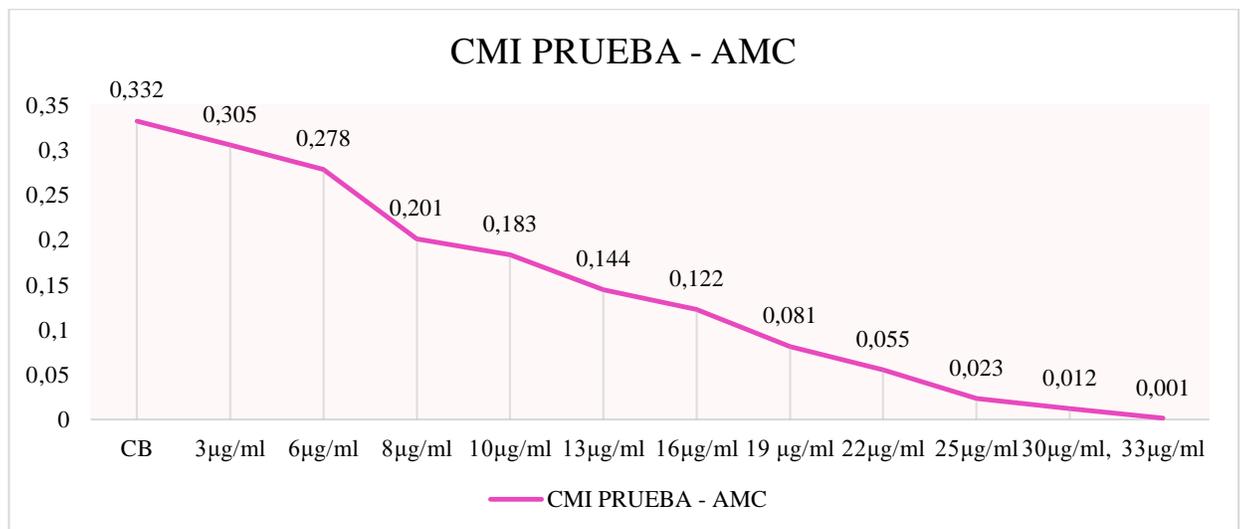


Figura 11. Prueba CMI - AMC

Al recolectar los datos de la prueba realizada con numerosas concentraciones del fármaco se tomó como decisión trabajar con: 6µg/ml, 10µg/ml, 22µg/ml, 28µg/ml, 33µg/ml para utilizar con las 10 cepas identificadas como sensibles al antibiótico.

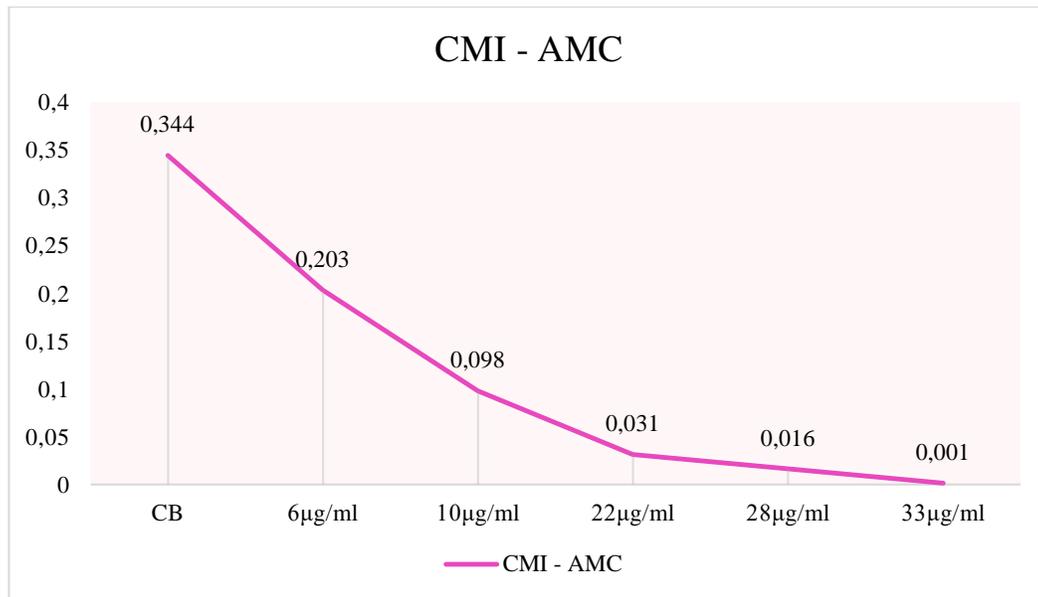


Figura 12. CMI - AMC

Los betalactámicos son antibióticos de amplio espectro que presentan mecanismos de acción tanto para microorganismos gram positivos como gram negativos, aunque es importante destacar que Ceftriaxona presenta un espectro mucho más extenso si se lo compara con la eficacia que presentaría amoxicilina ya que la misma solo logra inhibir el crecimiento bacteriano de microorganismos gram negativos como lo es *Proteus* spp mientras que cuando hace sinergia con Ácido Clavulánico se destaca por inhibir betalactamasas las cuales llegan a presentarse como un mecanismo de resistencia de parte de las enterobacterias hacia los betalactámicos (Silva, 2022).

Este grupo de antibióticos poseen también la habilidad de inhibir la formación de la pared celular presente en *Proteus* spp aunque se describe el mismo mecanismo de acción para la enterobacterias en general, esto se debe a que la pared tiene a ser muy delgada y está conformada por proteínas y lípidos, esto hace que en la mayoría de las ocasiones los

betalactámicos se unen a proteínas fijadores de penicilina o también denominadas PBP, desencadenan también entre los peptidoglucanos un complejo irreversible que imposibilitan la formación de la pared bacteriana lo que provoca la lisis de la misma y por ende alteraciones en su presión oncótica (Silva, 2022).

3.2.3 CMI de Fluoroquinolonas

Según CLSI (2023) en punto de corte para CMI de CIP en enterobacterias es 1 µg/ml

- Batería de prueba: 0,5µg/ml, 1µg/ml, 3µg/ml, 5µg/ml, 7µg/ml, 9µg/ml, 11µg/ml, 13µg/ml, 15µg/ml, 17µg/ml, 19µg/ml, 21µg/ml.

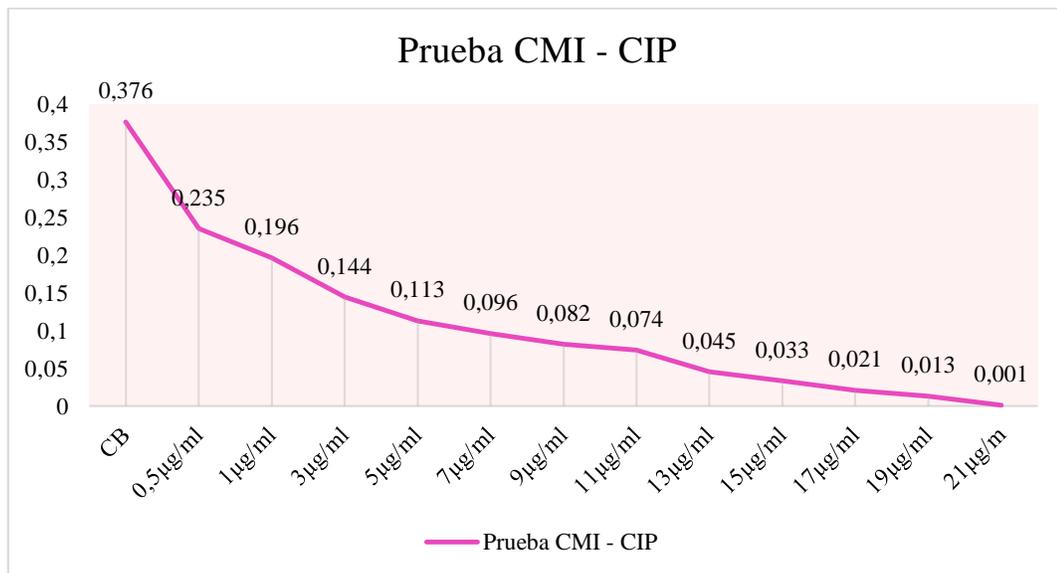


Figura 13. Prueba CMI - CIP

Al momento de realizar la prueba y recolectar los datos obtenidos de la prueba con batería extensa realizada de dicho fármaco se observó que uno de los puntos con mayor declinación bacteriana fue 13µg/ml es una disminución considerable por lo que se tomó la decisión de trabajar con 13µg/ml, 15µg/ml, 17µg/ml, 19µg/ml, 21µg/ml para las 11 cepas resultantes como sensibles a ciprofloxacina, es uno de los antibióticos con menor

número de cepas sensibles debido a la alta resistencia que presenta por los mecanismos de acción ante antibióticos por parte de *Proteus spp.*

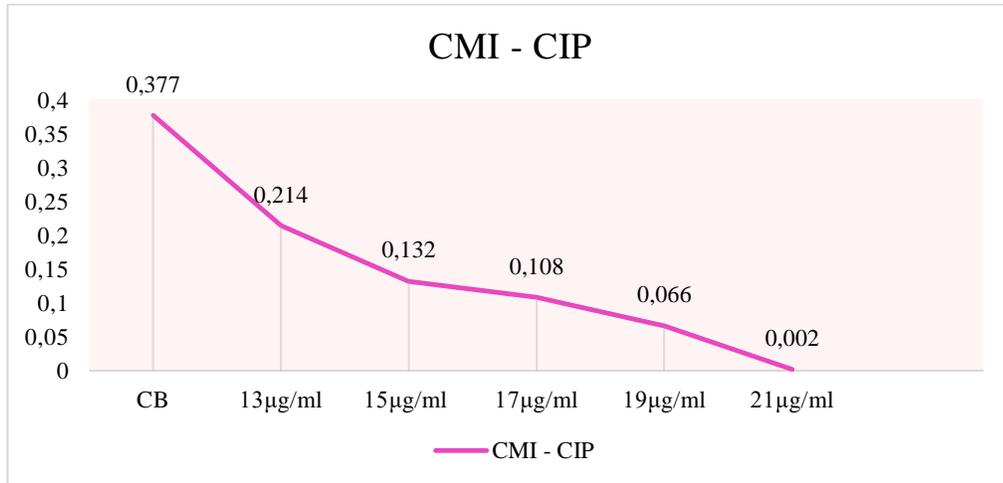


Figura 14. CMI - CIP

Según los datos recogidos se destaca el incremento significativo que debía presentar el antibiótico para resultar sensible a *Proteus spp.*, la curva de inhibición comienza a resaltar a partir de 13 µg/ml y en 21 µg/ml se llega a la inhibición completa.

La Cipprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro por lo que se usa frecuentemente para varias patologías incluyendo infecciones complicadas, es elegido por su eficacia, pero también el uso constante del mismo ha hecho que presente mayor resistencia al mismo, sin embargo, su alta eficacia se debe a los mecanismos de acción que esta fluoroquinolona presenta para *Proteus spp.*, este antibiótico inhibe a la bacteria mediante el bloqueo de enzimas como las Topoisomerasas que son necesarias para la fase de replicación, reparación y transcripción del ADN bacteriano (Sánchez, 2021).

Las enzimas inhibidas son de tipo topoisomerasas entre ellas se encuentra algunas de las más importantes como ADN girasa y topoisomerasa IV que cumplen sus funciones

durante el desenrollamiento del ADN esencial para la división celular y si dicha actividad se imposibilita por el bloqueo de las enzimas entonces la lisis bacteriana no se puede ejecutar (Sánchez, 2021).

La ciprofloxacina posee también la habilidad para traspasar la membrana de la bacteria mediante difusión simple y porinas, además de que esta fluoroquinolona generalmente presenta una fuerte acción sobre topoisomerasa IV, además de que logran desactivar a la bacteria por la inhibición del ADN girasa dicha enzima es específica para enterobacterias, mientras que cuando se inhiben otras enzimas como la topoisomerasa IV se provoca inhibición de microorganismos gram positivos (Flores, 2022).

En cuanto a la frecuente disposición para el incremento de dosis que presente ciprofloxacina se debe a que la misma tiende a inhibir de manera primordial a la topoisomerasa IV hasta lograr obtener su total inhibición, el presente trabajo investigativo señala que la concentración que permite la inhibición completa de la bacteria es 21 µg/ml, sin embargo dichos resultados no coinciden con lo expuesto en CLSI (2023), en donde se describe que la CMI 1 µg/ml, dicho aumento de concentración podría deberse a que el antibiótico presente es usado de manera empírica frecuentemente lo que ha llevado en aumento la resistencia de las mismas por lo que se considera necesario incrementar la dosis indicada para obtener la inhibición bacteriana.

3.3. Mecanismos moleculares de resistencia de *Proteus* spp a AK, CIP, CN, CRO, AMC.

3.3.1 Mecanismos de resistencia de *Proteus* spp a Betalactámicas.

La resistencia que *Proteus* spp presenta hacia los betalactámicos podría presentarse debido a varios factores entre ellos encontramos. Producción de penicilinasas, el agente patógeno

posee la habilidad de adquirir betalactamasas de tipo plasmídico clase A13 las mismas que podrían ser denominadas betalactamasas clásicas o de amplio espectro, dentro de ellas también podemos encontrar a TEM-1 y 2 y SHV-1, todas ellas se responsabilizan de la resistencia presentada a carboxipenicilinas y animopenicilinas, de igual manera podrían influir en la presentación de sensibilidad intermedia hacia la ureidopenicilinas. Por otro lado, es importante aclarar que las cepas que sintetizan estas enzimas mantienen aún su sensibilidad por las cefalosporinas, carbapenemas y monobactamas (Treviño y Molina, 2021).

Pero también se presentan ocasiones en las que la sobre producción de estas enzimas podrían llevar a la cepa a presentar cierta resistencia a C1G, C2G destacando también su sensibilidad, aunque muy leve hacia las sinergias con amoxicilina y ácido clavulánico. En el caso de aquellas cepas que presentan una sobreproducción de SHV-1 también se puede apreciar cierta resistencia, aunque muy baja a ceftazidima y es precisamente en este caso en el que se puede apreciar mediante una técnica de difusión la ligera sinergia que este fármaco podría presentar con ácido clavulánico lo que podría deberse a la presencia de una betalactamasa de espectro extendido (Treviño y Molina, 2021).

Producción de betalactamasa de espectro extendido, también se las puede reconocer por su sigla (BLEE), la mayor parte de las enzimas pertenecientes a BLEE refieren a betalactamasas entre las cuales encontramos a TEM-1, TEM-2 y SHV-1. Las BLEE también son reconocidas por su capacidad para inactivar totalmente la acción de las cefalosporinas, pero si mantienen sensibilidad a los inhibidores que podrían presentarse y de igual manera a las carbapenemas. Se debe tener en cuenta que detectar las BLEE no es sencillo, pero algunas de las señales podrían ser la identificación de una leve disminución de sensibilidad a C3G que podría traducirse a un incremento en la concentración mínima inhibitoria o a su vez una disminución del halo de inhibición o con bordes irregulares, sinergismo con ácido clavulánico y en otras ocasiones se detectan también resistencias asociadas sobre todo hacia aminoglucósidos (Castell et al., 2021).

Registro de hiperproducción de betalactamasa cromosómica de clase A también es otro de los mecanismos responsables de la presencia de resistencia de parte de *Proteus* spp, que además se registra como un mecanismo de resistencia muy parecido al que presentan las BLEE. Se reconoce la diferencia de estas con la hiperproducción de betalactamasa cromosómica K1 por la sensibilidad que se da en ceftazidima y resistencia para aztronam (Castell et al., 2021).

En un estudio realizado por Miranda et al. (2019), se describen algunos de los principales mecanismos de resistencia presentados por enterobacterias en uropatógenos aislados en una clínica privada en Lima, entre ellos se pudo destacar la sensibilidad de varias enterobacterias entre ellas *Proteus mirabilis* la cual presentaba un porcentaje relativamente alto 80% de sensibilidad hacia amikacina y carbapenems, pero también se evaluó la expresión de betalactamasas de espectro extendido teniendo una tendencia de 50% en *Proteus* spp. Otro de los mecanismos responsables de resistencia hacia los aminoglucósidos que se estudió en el trabajo investigativo fue la producción de enzimas modificadoras presentándose en *Proteus* spp con un porcentaje de 84,6% es importante porque la inactivación enzimática de aminoglucósidos es considerado uno de los mecanismos responsables de resistencia más frecuentes.

3.3.2 Mecanismos de resistencia de *Proteus* spp a Aminoglucósidos

El mecanismo más significativo mediante el cual *Proteus* spp presenta resistencia los aminoglucósidos es la inactivación enzimática. Actualmente existen tres tipos diferentes de enzimas responsables de resistencia antibiótica como, por ejemplo, la fosfotransferasas (APH) que como su nombre indica se encargan de fosforilar un grupo hidroxilo, la acetiltransferasas (ACC) actúan sobre el grupo amino presente en el fármaco y por último las nucleotidiltransferasas (ANT) modifican un grupo hidroxilo del antibiótico. Cada una de estas enzimas tiene la habilidad de reconocer a un determinado número de antibióticos de la familia aminoglucósidos, por lo que este mecanismo de resistencia llegaría a ser exclusivamente para esta familia de antibióticos (Pascual et al., 2022).

La resistencia que proviene de la presentación de dichas enzimas a los aminoglucósidos es significativa y la producción de las mismas podría darse de manera individual o acompañada por otras enzimas. Cuando la producción de enzimas se presenta acompañada por otras es difícil identificar el fenotipo exacto, pero podría ser un evento predecible debido al efecto aditivo que se da en dos patrones diferentes. Además, este no es el único mecanismo de resistencia puesto que también se encuentran las alteraciones a nivel de la permeabilidad que impiden la acción farmacológica (Treviño y Molina, 2021).

Las enterobacterias tienen la habilidad también de inhibir la acción de estos fármacos por provocar alteraciones a nivel del transporte de los mismos al punto diana, fenómeno que se presenta debido a una expresión exagerada de transportadores producido por mutaciones ocasionadas en los genes reguladores provocando a su vez concentraciones altas del antibiótico, otro de los mecanismos, aunque menos frecuente es la modificación general a nivel de los ribosomas, provocando que el antibiótico no pueda encontrar el sitio de acción y volviendo ineficiente su trabajo Mouiche et al., (2019).

En el trabajo investigativo de Sánchez (2021) acerca de los mecanismos de resistencia antibiótica hacia aminoglucósidos por parte de enterobacterias sustentando el presente trabajo investigativo al describir las bombas de expulsión MexXY-OprM las cuales generan mutaciones a nivel de los canales del microorganismo dificultando e impidiendo la entrada del antibiótico incluso pudiendo expulsarlo al momento de llegar al sitio de acción. Además de que el mismo autor refuerza lo descrito en la investigación presenta, al establecer que una de los mecanismos con mayor influencia y más frecuente en enterobacterias es la producción de enzimas, destacando entre las más importantes ANT (nucleotidiltransferasa) y ACC (N-acetiltransferasas), siendo ANT una de las más identificadas en estudios relaciones con los mecanismos de resistencia a gentamicina, por otro lado se marcó una presentación del 68% en *Proteus* spp en cuanto a ACC que se presume actúa de manera selectiva en Amikacina

Sustentamos la información mediante un trabajo experimental realizado por Soriano & Carvajal (2019), en el cual se buscaba evaluar la presencia porcentual de enterobacterias capaces de producir BLEE y su influencia en la resistencia antibiótica a los aminoglucósidos, de 120 aislados de urocultivos al menos el 34% fue correspondiente a *Proteus* spp definieron a dicho género como un presentador significativo de genes de betalactamasas entre ellas BLEE o carbapenemasas, presentando una resistencia ácido clavulánico de (37,5%) que a pesar de ser baja su presentación se considera significativa en los perfiles de resistencia.

3.3.3 Mecanismos de resistencia de *Proteus* spp a fluoroquinolonas.

Las fluoroquinolonas fueron uno de los grupos antibióticos que más resistencia presentó de parte de *Proteus* spp algunos de los mecanismos de resistencia que se presentan con mayor frecuencia son las mutaciones que alteran el lipopolisacárido o las porinas y por ende imposibilitan la entrada del antibiótico al interior de la bacteria, la resistencia podría ser consecuencia también de mutaciones presentadas a nivel de la topoisomerasa IV y ADN-girasa. Otros mecanismos que tienden a presentarse también es el incremento de bombeo que al igual que las alteraciones en la permeabilidad pueden ofrecer resistencia, pero a un nivel más bajo, estos dos fenómenos podrían verse asociados a mutaciones en las topoisomerasas lo que ayudaría a incrementar la intensidad de resistencia (Pascual et al., 2022).

Se reconoce también la presentación de un plásmido que se caracteriza por presentar resistencia a las quinolonas aunque no es muy conocida y se le otorga muy poco interés. En cuanto a las alteraciones a nivel de la diana esta es frecuente en enterobacterias y una de las primeras dianas para quinolonas es ADN girasa. Este tipo de mecanismo de resistencia suele centrarse en la región enzimática que la conocen como QRDR (quinolone resistance-determining region). Las alteraciones presentes en esta sección ya se de las dos topoisomerasa IV o de ADN-girasa se ven directamente relaciones al incremento de concentraciones en CMI de las quinolonas (Treviño y Molina, 2021).

Existen diversos mecanismos lo que explica el alto porcentaje de resistencia, generalmente la cepa presenta una primera mutación a nivel de QRDR que por lo general afecta primero a GyrA y aunque se mantenga la sensibilidad a fluoroquinolonas podría presentar resistencia hacia el ácido clavulánico o salicílico lo que significaría un ligero incremento a nivel de CMI, para la segunda mutación que presente la misma cepa de igual manera en QRDR esta vez ya se producirá resistencia hacia las fluoroquinolonas. Estos mecanismos descritos podrían verse asociados también a las bombas de achique, otro mecanismo de resistencia conocido para fluoroquinolonas (Castell et al., 2021).

Livermore et al. (2019) en su estudio bibliográfico acerca de la resistencia presente en fluoroquinolonas refuerzan la información anteriormente expuesta ya que reafirma que aquellas cepas que presentaban resistencia a fluoroquinolonas y que además mantenían un CIM elevado ya sea para el ácido clavulánico o nalidíxico generalmente van a presentar una mutación situada en el ADN-girada lo que se traduciría a una resistencia primera, por ende solo sería necesario la presentación de un segundo mecanismo de resistencia como las mutaciones para que la misma cepa logre crear una resistencia muy eficaz hacia ciprofloxacina. Lo que recomienda el autor es hacer un estudio exhaustivo de aquellas cepas que se marcan con sensibilidad intermedia hacia algún antibiótico porque probablemente este creando su resistencia adquirida hacia las fluoroquinolonas en general.

3.4 Verificación de Hipótesis

Basándonos en los resultados obtenidos y analizados mediante el presente trabajo investigativo se puede confirmar la hipótesis expuesta anteriormente que mantenía que las cepas de *Proteus* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato, Provincia de Tungurahua mostraban resistencia a los antibióticos utilizados en la investigación.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Las cepas de *Proteus* spp aisladas en carne de pollo en la ciudad de Ambato provincia de Tungurahua, presentaron resistencia significativa a las fluoroquinolonas por encima de los betalactámicos y muy baja proporción a los aminoglucósidos por lo que se los consideraría como los antibióticos con mayor eficacia para inhibir *Proteus* spp.
- Debido a los mecanismos de resistencia presentados por parte de las cepas de *Proteus* spp evaluadas se concluye que los puntos de inhibición completa propuestos por la CLSI (The Clinical & Laboratory Standards Institute, 2023) no muestran el efecto deseado, sino que se necesita incrementar la dosis para encontrar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los mismos debido a la resistencia adquirida.
- *Proteus* spp es un género perteneciente a enterobacterias bastante sensible hacia los aminoglucósidos y betalactámicos, sin embargo, por resultados estadísticos se identificó una resistencia importante hacia las fluoroquinolonas debido a los diversos mecanismos moleculares de resistencia que se adquirieron con el tiempo debido a la constante exposición terapéutica de la ciprofloxacina.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda investigar de manera experimental los genes de resistencia que pueden llegar a presentar las cepas de *Proteus* spp evaluadas en el presente trabajo y diferenciar entre especies, *P. mirabilis* y *P. vulgaris* ya que existen diferencias significativas en cuanto a sus mecanismos de defensa.
- Se recomienda realizar una investigación exhaustiva en la ciudad de Ambato con el objetivo de encontrar el punto exacto de contaminación y poner en prácticas más programas de control de higiene y crear conciencia en los productores.
- No promover ni practicar el uso imprudente de antibióticos entendiendo el alto impacto que ha tenido en los últimos años sobre la antibiorresistencia de microorganismos de alta importancia en salud pública.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bello, S. (2023). Mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias. Tratamientos alternativos. In Repositorio de la Universidad de Coruña.

Britanialab. (2021). Guía de Medios Britanialab. *Britanialab.Com*.

Boussekey, N. y Alfandari, S. (2007). Aminoglucósidos. Elsevier. Mouliom, M., Moffo, F., Kihla, J., Okah, N., Mapiefou, N., Ndze, Valantine., Wade, A., Djuikwo, F., Tseuko, D., Zambou, H., Kameni, J., LeBreton, M. y Awah, J. (2019). Resistencia a los antimicrobianos desde la perspectiva de una sola salud en Camerún: una revisión sistemática y un metanálisis. *BMC Salud Pública*

Carolina, M. (2022). Prevalencia de microorganismos resistentes al ciprofloxacino aislados en infecciones del tracto urinario en el Hospital Universitario de Recife/PE. *Investigación, Sociedad y Desarrollo*, [S. l.], v. 11, n. 8.

CLSI. (2023). CLSI VET01S ED6:2023 — Normas de rendimiento para pruebas de susceptibilidad de dilución y disco antimicrobiano para bacterias aisladas de animales, 6.a edición. *Clsivet.Org*.

Cordova, R. y Alejandro, M. (2023). Frecuencia de bacterias aerobias y sensibilidad antibiótica halladas en infecciones de pie diabético en hospitales de Lambayeque enero–abril 2021. *Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo*

Diaz, C. y Mishell, J. (2020). Perfil microbiológico y resistencia antibiótica de los urocultivos en pacientes ambulatorios de emergencia del Hospital Carlos Alberto Seguin Escobedo, de junio a diciembre del 2019. *Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa*

GAD-CEVALLOS. (2022). Datos generales del cantón. Gobierno Autónomo

Descentralizado Municipal del Cantón Cevallos.

García, C. (2014). Resistencia antibiótica de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus sp.*, en el Hospital Regional de Occidente de Quetzaltenango. *UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA*

Girlich, D., Bonnin, R., Dortet, L., y Naas, T. (2020). Genética de genes de resistencia a antibióticos adquiridos en *Proteus spp.* *Revista Científica Frontiers*, 11:256.

Lorente, J., Placer, J., Salvadó, M., Segura, C. y Gelabert, A. (2005). Evolución de la resistencia antibiótica en las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad. Elsevier

Martin, G. (2002). Resistencia Bacteriana b-lactámicos. Evolución y Mecanismos. Cátedra de Farmacología, Escuela de Medicina J.M. Vargas, *Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela.*

Miranda, J., Pinto, J., Faustino, M., Sánchez, B. y Ramirez, F. (2019). Resistencia antimicrobiana de uropatógenos en adultos mayores de una clínica privada de Lima, Perú. *Scielo.*

Moreno, S., Yareta, J., Rojas, Ana., Fajardo, A., León, D., Castillo, I., Laura, M., Hilario, M., Galarza, M. y Marcos, P. (2021). Efluentes hospitalarios como reservorio de enterobacterias productoras de betalactamasas y carbapenemasas. *Scielo.*

Musa, Hassan A., Osman, Mayada A.M., Abdelaziz, Yasir H., Mohamed, Salma, & Ibrahim-Saeed, Mohammed. (2019). Distribution of extended-spectrum beta-lactamase TEM and CTX-M resistance genes among *Proteus* species Isolated in Sudan. *Vaccimonitor*, 28(2), 80-84.

Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F. y Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. *Elsevier*

NIH. 2023. *National Library of Medicine*. Intramural Research Program.

Pacsi, E. (2021). Identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae en pollos de engorde suplementados con diferentes aditivos comerciales. *Repositorio Académica Universidad Científica*.

Pascual, P., Parra, C. y Concha, M. (2022). Tratamiento antibiótico. *Elsevier*.

Percino, F. y Diana. (2022). Determinación de genes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos y análisis de entornos genéticos en cepas de Klebsiella sp. Benemérita. *Universidad Autónoma de Puebla*.

Rentería, S. y Midory. (2021). Determinación de genes de resistencia a aminoglucósidos y quinolonas y bombas de expulsión en Pseudomonas aeruginosa. *Buap*.

TMMEDIA. (2022). Agares-Indicaciones. *Tmmedia.In*.

Verástegui, K. (2015). Utilidad del cociente inhibitorio en la interpretación del antibiograma para enterobacterias aisladas de urocultivos en pacientes ambulatorios, hospital nacional docente madre niño (honadomani) “san bartolome”. *Universidad nacional mayor de San Marcos*. Febrero - diciembre 2014 Lima-Perú.

Wang, C., Xungao, Lv, L., Cai, Z., Yang, J., Liu, J. (2021). Nuevo grupo de genes deresistenciaatigeciclina tnfxB3 - tmexCD3toprJ1b en Proteus spp. y Pseudomonas aeruginosa, coexistiendo con tet (X6) en un elemento integrativo y conjugativo SXT/R391. *Revista de quimioterapia antimicrobiana*, volumen 76, número 12, diciembre de 2021, páginas 3159–3167.

ANEXOS

Anexo 1. Tabulación de resultados obtenidos en la primera fase.

					MEDICIÓN HALOS #1	
CEPA	DISCO	RIGINAL m	R1 mm	R2 mm	MEDIA mm	RESULTADOS
N4	AK	20	20	20	20	S
	CIP	29	27	26	27	S
	CN	22	22	20	21	S
	CRO	35	33	33	34	S
	AMC	17	15	15	16	I
N26	AK	18	16	17	17	S
	CIP	23	32	34	30	S
	CN	19	18	18	18	S
	CRO	13	27	28	23	S
	AMC	14	15	16	15	I
N41	AK	18	17	18	18	S
	CIP	6	6	6	6	R
	CN	20	20	19	20	S
	CRO	25	20	20	22	I
	AMC	15	13	14	14	I

Anexo 2. Resultados del cálculo estadístico en la primera fase.

Cepa	Antibiótico	Réplicas	Sensibilidad			
N14	1	1	3			
	1	2	3			
	1	3	3			
	2	1	3			
	2	2	3			
	2	3	3			
	3	1	3			
	3	2	3			
	3	3	3			
	4	1	3			
	4	2	3			
	4	3	3			
N13	5	1	3			
	5	2	3			
	5	3	3			
	1	1	2			
	1	2	2			
	1	3	2			
	2	1	3			

Sensibilidad	
Resistente	1
Intermedio	2
Sensible	3

Antibióticos	
AK	1
CIP	2
CN	3
CRO	4
AMC	5

Anexo 3. Actividades realizadas durante la metodología de la fase 1.



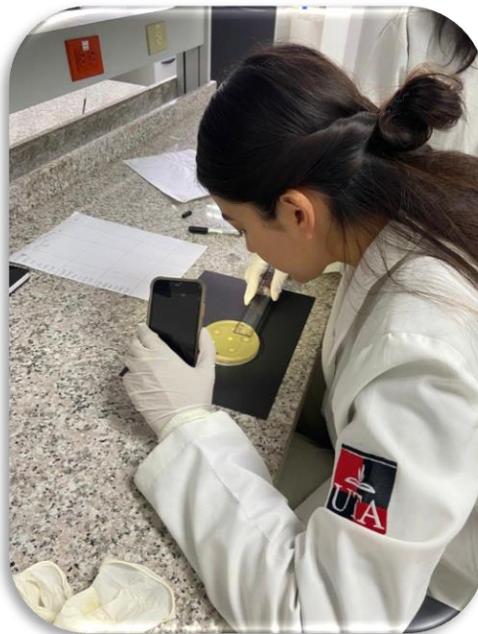
Refrescación cepas de *Proteus* spp



Estriado en Agar Tripticasa de Soya



Ubicación de discos de antibióticos



Medición de halos de inhibición

Anexo 4. Actividades realizadas dentro de la metodología de la fase 2.



Colocación de bacteria en Luria Bertani



Colocación de anitbiótico en Luria Bertani



Ubicación de cubetas en espectrofotómetro para medición



Lectura de curvas de inhibición