



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**Sensibilidad bacteriana a los antibióticos comerciales
Amoxicilina y Ciprofloxacino.**

**Sensibilidade bacteriana a os antibióticos comerciais
Amoxicilina e Ciprofloxacino.**

**Bacterial sensitivity to commercial antibiotics Amoxicillin and
Ciprofloxacin.**

Isabel Lechuga Varela

Julio, 2018

Director(es) Académico(s): José Enrique Torres Vaamonde

Índice

Índice	2
Resumen	1
Summary:	1
Palabras clave:	1
1. Introducción:.....	2
2. Objetivos:	3
3. Material y métodos:	4
<input type="checkbox"/> <i>Descripción de las cepas utilizadas</i>	4
<input type="checkbox"/> <i>Preparación de las bacterias</i>	5
<input type="checkbox"/> <i>Obtención de la solución stock de los antibióticos.</i>	6
<input type="checkbox"/> <i>Elaboración de experiencias.</i>	7
<input type="checkbox"/> <i>Obtención de datos y cálculo estadístico.</i>	8
4. Resultados:	9
4.1 Amoxicilina:	9
4.1.1 <i>Escherichia coli</i>	9
4.1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
4.1.3 <i>Bacillus</i> sp.....	11
4.1.4 <i>Listeria</i> sp.	12
4.1.5 <i>Salmonella</i> sp.....	13
4.2 Ciprofloxacino	14
4.2.1 <i>Escherichia coli</i>	14
4.2.2 <i>Listeria</i> sp.	15
4.2.3 <i>Salmonella</i> sp.....	16
4.2.4 <i>Bacillus</i> sp.....	17
4.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
5. Discusión:	21
6. Conclusiones:	22
7. Conclusions:	22
8. Bibliografía:	23

Don **José Enrique Torres Vaamonde** profesor contratado doctor de la Universidad de A Coruña en el Departamento de Biología, área de Microbiología,

INFORMA,

Que el Trabajo de Fin de Grado presentado por **Isabel Lechuga Varela** y con título **“Sensibilidad bacteriana a los antibióticos comerciales Amoxicilina y Ciprofloxacino”** ha sido realizado bajo su dirección y, considerándolo finalizado, autoriza su envío y presentación al tribunal calificador correspondiente.

Y para que así conste, expide el presente informe en

A Coruña a 17 de Julio de 2018

Fdo: José Enrique Torres Vaamonde

Resumen

Los fármacos comerciales antibacterianos se emplean para combatir infecciones que son producidas por bacterias. En este trabajo se pudo demostrar que el efecto de dos antibióticos de uso comercial (Amoxicilina y Ciprofloxacino) fue diferente en función de las bacterias ensayadas (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp. y *Staphylococcus aureus*). Estas bacterias mostraron diferente grado de sensibilidad a ambos antibióticos. Para calcular esta sensibilidad se ha empleado la técnica de la Concentración mínima inhibitoria (CMI). Además, se han obtenido los valores de la concentración del antibiótico que inhibe el 50 % del crecimiento bacteriano (IC50). Las especies más sensibles a la Amoxicilina fueron *Bacillus* sp. y *Listeria* sp. ambas con una CMI de 5 µg/mL pero con una IC50 de 2.805 µg/mL y 1.903 µg/mL, respectivamente. Las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. resultaron ser las más resistentes con una CMI de 10 µg/mL, y temiendo una IC50 de 7.047 µg/mL y 5.865 µg/mL, respectivamente. Con respecto al Ciprofloxacino, la especie más sensible fue *Escherichia coli* con una CMI de 0.06 µg/mL y una IC50 de 0.024 µg/mL, mientras que la bacteria *Listeria* sp. resultó ser la más resistente con una CMI de 0.375 µg/mL y una IC50 de 0.172 µg/mL.

Summary:

Commercial antibacterial drugs are used to fight infections that are caused by bacteria. In this work it was possible to demonstrate that the effect of two commercial antibiotics (Amoxicillin and Ciprofloxacin) was different depending on the bacteria tested (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp. And *Staphylococcus aureus*). These bacteria showed a different degree of sensitivity to both antibiotics. To calculate this sensitivity, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique has been used. Moreover, the values of the concentration of the antibiotic that inhibits 50% of bacterial growth (IC50) have been obtained. The species most sensitive to Amoxicillin were *Bacillus* sp. and *Listeria* sp. both with an MIC of 5 µg/mL but with an IC50 of 2.805 µg/mL and 1.903 µg/mL respectively. The bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. they were the most resistant with a MIC of 10 µg/mL, and fearing an IC 50 of 7.047 µg/mL and 5.865 µg/mL respectively. With respect to Ciprofloxacin, the most sensitive species was *Escherichia coli* with an MIC of 0.06 µg/mL and an IC50 of 0.024 µg/mL, while the bacterium *Listeria* sp. It was found to be the most resistant with an MIC of 0.375 µg/mL and an IC50 of 0.172 µg/mL.

Palabras clave:

Amoxicilina, Ciprofloxacino, antibiótico, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Salmonella*, inhibición.

1. Introducción:

En la actualidad existen diversos antibióticos, puesto que en función de su composición serán más efectivos contra determinados grupos de bacterias. El grado del efecto que tiene un antibiótico sobre una especie bacteriana se denomina sensibilidad. Así, en un estudio llevado a cabo por Marasini et al. (2016), se concluyó que las bacterias Gram negativas son más sensibles a los antibióticos que se encuentran dentro del grupo de las fluoroquinolonas que a los que pertenecen al de las penicilinas, mientras que en caso de las bacterias Gram positivas, ambos grupos son menos efectivos que los antibióticos que se encuentran dentro de los grupos de las cefalosporinas y los aminoglucósidos.

Por lo tanto, es conocido que la sensibilidad bacteriana no es constante ya que existen bacterias con la capacidad de adquirir resistencia al efecto de algún antibiótico. La resistencia bacteriana se ha visto incrementada en los últimos años, siendo un problema cada vez mayor en la sociedad actual (Naylor et al., 2018). La principal causa de este aumento de resistencia es el mal uso de los antibióticos en personas y animales (Vasoo et al., 2015). *Escherichia coli* actualmente ha adquirido una resistencia alarmante ya que es una de las bacterias que comúnmente causa infecciones leves en los seres humanos, pero debido al aumento de su resistencia sus efectos pueden verse agravados. Así, se han obtenido resultados de que esta especie ha adquirido resistencia a antibióticos como las fluoroquinolonas y cefalosporinas entre otras (Fair y Tor, 2014). Otra bacteria con una resistencia a antibióticos notable es *Staphylococcus aureus*, el cual en la actualidad causa una gran problemática en los hospitales ya que produce infecciones en pacientes enfermos, y su resistencia adquirida a antibióticos dificulta su erradicación. En la actualidad esta resistencia se combate empleado la secuenciación del genoma completo de la especie, considerando mutaciones y genes de resistencia conocidos, combinado con modelos predictivos de mutaciones (Fowler et al., 2018).

En este trabajo se empleó la técnica de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para determinar la sensibilidad de las especies bacterianas *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp. y *Staphylococcus aureus*. La CMI se define la concentración más baja de un fármaco que inhibirá el crecimiento de un organismo después de la incubación durante 16 h (este período se extiende con organismos como los anaerobios, que requieren una incubación prolongada para su crecimiento (Andrews, 2001). Los antibióticos seleccionados fueron Amoxicilina y Ciprofloxacino en su forma comercial, ya que son de uso frecuente y constan con una actividad de amplio espectro.

La Amoxicilina (Fig.1) es un antibiótico β -lactámico, el cual forma parte del grupo de las penicilinas (en concreto de las amino-penicilinas). Su mecanismo de acción consiste en impedir la unión entre las cadenas de peptidoglucano, de tal forma que evita la correcta formación de las paredes celulares, provocando la muerte bacteriana. En su forma comercial se encuentra complementada con Ácido Clavulánico (Fig.2), aumentando el espectro antibacteriano pues es un inhibidor de la β -Lactamasa (enzima que degrada los antibióticos β -lactámicos), de esta forma los productores de este compuesto son más susceptibles y se evita su resistencia a este antibiótico (Todd

y Benfield, 1990). Estudios realizados indican que la Amoxicilina es efectiva sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas, y posee una cierta cobertura contra las Gram negativas, en comparación con otras penicilinas (Akhavan y Vijhani, 2018).

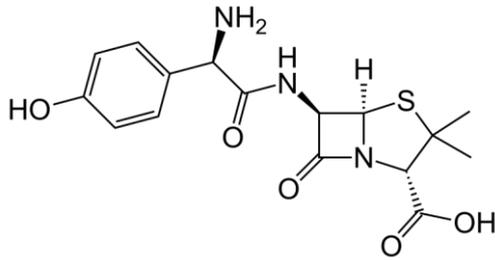


Fig. 1: Estructura química de la Amoxicilina.

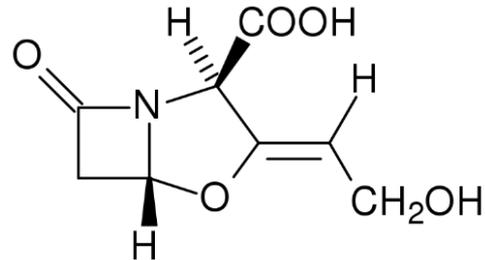


Fig. 2: Estructura química del Ácido Clavulánico

El Ciprofloxacino perteneciente al grupo de antibióticos denominados Quinolonas, en concreto a las Fluoroquinolonas. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la acción de la ADN girasa, evitando así la replicación del ADN bacteriano. Se ha demostrado que tiene una acción aceptable contra bacterias Gram positivas, pero es más efectivo contra las bacterias Gram negativas siendo así uno de los antibióticos más potentes dentro de las Fluoroquinolonas. La resistencia bacteriana a este antibiótico consiste en mutaciones cromosómicas en la enzima ADN girasa o mutaciones que afectan a la permeabilidad del antibiótico (LeBel, 1988).

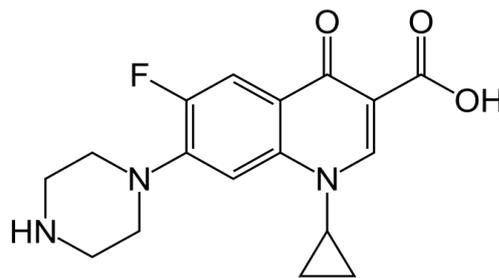


Fig. 3: Estructura química del Ciprofloxacino.

2. Objetivos:

En este trabajo se buscaron los siguientes objetivos:

- Determinar el grado de sensibilidad a los antibióticos comerciales Amoxicilina y Ciprofloxacino de *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Bacillus* sp. y *Staphylococcus aureus*.
- Conocer las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos anteriores sobre las bacterias estudiadas.
- Calcular las IC50.

3. Material y métodos:

- *Descripción de las cepas utilizadas*

Las bacterias seleccionadas para este estudio fueron *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Bacillus* sp. y *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli se trata de un bacilo Gram negativo, perteneciente al grupo de las Enterobacterias. Se caracteriza por localizarse en el colon de los mamíferos (Ingraham y Ingraham, 1998). Esta especie no suele ser patógena, pero existen cepas resistentes que pueden producir enfermedades como gastroenteritis o infecciones intestinales (Croxen y Finlay, 2010).

Salmonella sp. también pertenece al grupo de las Enterobactias, se caracteriza por encontrarse en numerosos animales y transmitirse por la ingestión de agua o alimentos contaminados (Ingraham y Ingraham, 1998). La infección producida por esta bacteria puede dar lugar a patologías como infecciones gastrointestinales, o fiebre tifoidea, pudiendo ser esta última mortal (Hensel, 2004). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) aproximadamente, a nivel mundial, 1900 millones de personas padecen diarrea y de estas, 715000 mueren anualmente. *Salmonella* sp. causa el 9% de estas enfermedades diarreicas (Besser, 2018). Debido a las afecciones que produce y su facilidad de transmisión se trata de un organismo de gran interés.

Staphylococcus aureus pertenece al grupo de cocos Gram positivos. Esta especie bacteriana se localiza en la superficie de la piel, teniendo una alta resistencia a cambios ambientales (Ingraham y Ingraham, 1998). Esta especie en ocasiones también presenta resistencia a penicilinas y a los inhibidores de la β -Lactamasa (Da Costa et al., 2018). *S. aureus* en la actualidad es el patógeno que más infecciones causa a enfermos en hospitales ya que presenta una gran resistencia a antibióticos y tiene la capacidad de causar diversas enfermedades (Archer, 1998). Esta especie también es causante, junto con otras bacterias, de la neumonía. Esta enfermedad a nivel mundial afecta a más de 150 millones de personas y causa más de 2 millones de muertes anuales, principalmente a niños menores de 5 años, siendo así, la principal causa de muerte infantil (Kurman et al., 2018).

Listeria sp. es una bacteria Gram positiva con forma de bacilo. Se puede aislar en lugares como el suelo, animales y portadores humanos asintomáticos. Esta especie causa una mayor problemática cuando está presente en alimentos ya que tiene la capacidad de reproducirse a bajas temperaturas por lo que la refrigeración es inútil (Ingraham y Ingraham, 1998). *Listeria* sp. resulta patógeno normalmente en grupos de riesgo, ocasionando diversas afecciones como abscesos en el hígado o hemorragias en los riñones pudiendo llegar a ser mortales (Ikeh et al., 2010). Una especie patógena para el ser humano es, por ejemplo, *L. monocytogenes*, la cual solo en Estados Unidos se estima que causa 1600 casos de Listeriosis, de los cuales 1400 requieren hospitalización y 250 de ellos provocan la muerte (Skowron et al., 2018)

La última de las bacterias empleada pertenece al género *Bacillus* sp. tiene una morfología de bacilo, se encuentra dentro del grupo de bacterias Gram positivas aerobias. Es formadora de endosporas, por lo que presenta una mayor supervivencia a condiciones adversas, teniendo una mayor resistencia frente a temperaturas elevadas (Ingraham y Ingraham, 1998). Dentro de este grupo existen especies patógenas como es el caso de *Bacillus anthracis* causante del Ántrax, y especies no patógenas, pero en ocasiones estas especies pueden dar lugar a variantes que provocan patologías graves.

- *Preparación de las bacterias.*

Para la realización de la técnica de la CMI (EUCAST y ESCMID, 2003), las bacterias deben estar en fase de crecimiento exponencial, por lo que es necesario previamente haber dispuesto las bacterias en esta fase de crecimiento. En la preparación de las bacterias el objetivo es alcanzar una densidad celular adecuada (estipulada en la técnica) para que cuando transcurra el tiempo de incubación exista una turbidez aceptable para la realización de las medidas en el espectrofotómetro.

Para lograr esto, se realizan los siguientes pasos:

- Las bacterias son cultivadas en tubos de ensayo de 10 mL con medio de cultivo TSB (Tryptic Soya Broth), que se caracteriza por ser un medio genérico. Se cultivan en estufa a 37°C.
- Cada cierto tiempo se toma una alícuota y se mide la absorbancia a una longitud de onda de 625 nm.
- Cuando los cultivos alcanzan una absorbancia entre 0.08 y 0.1 se retiran de la estufa. De esta forma se alcanza el estándar 0.5 McFarland, que consiste en un factor que relaciona la turbidez de la muestra con la densidad celular bacteriana (Wiegand et al., 2008). Según este estándar, cuando se alcanza el valor 0.5 McFarland se considera una concentración bacteriana de aproximadamente 1.5×10^8 ufc/mL.
- Se introduce 1 mL del cultivo bacteriano anterior de concentración conocida en 100 mL del medio TSB concentrado 2.86 veces (se encuentra concentrado ya que en un proceso posterior se va a diluir 2.86 veces) de tal forma que se lograr así una concentración de 1.5×10^6 ufc/mL. De esta dilución es de la que se va a tomar el inóculo para la realización de las experiencias.

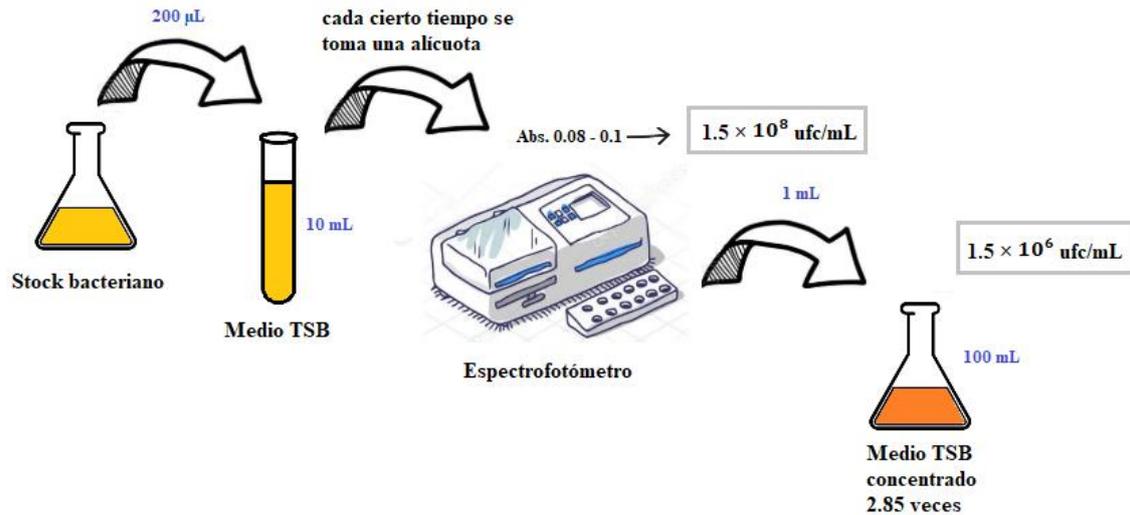


Fig. 4: Esquema preparación de las bacterias.

- *Obtención de la solución stock de los antibióticos.*

Amoxicilina:

Puesto que es un antibiótico comercial, se tomó un sobre que contenía 500 mg y se disolvió en 200 mL de agua destilada estéril. A continuación, esta solución se esterilizó por filtración mediante filtros con un tamaño de poro de 0.22 µm. Esta solución se diluyó con agua destilada estéril y en condiciones asépticas hasta alcanzar una concentración de 250 µg/mL para las experiencias con *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Bacillus* sp., mientras que para el caso de *Listeria* sp. y *Staphylococcus aureus* la concentración final fue de 180 µg/mL.

Ciprofloxacino:

Este antibiótico se presenta con formato de pastilla, se tomó una y previamente se trituró mecánicamente para asegurar una buena disolución posterior. Cada pastilla triturada, que contenía 500 mg, se disolvió en 200 mL de agua destilada estéril. Esta solución se esterilizó por filtración mediante filtros de 0.22 µm de tamaño de poro. Una vez realizada la esterilización, se diluyó con agua destilada estéril y en condiciones asépticas, obteniéndose tres diluciones diferentes para las experiencias con los diferentes microorganismos. De tal forma, se obtuvo para *Escherichia coli* una concentración final de 2.1 µg/mL de antibiótico. Para *Listeria* sp. se obtuvo una concentración de 12.5 µg/mL. Mientras que para el resto de las bacterias (*Salmonella* sp., *Bacillus* sp. y *Staphylococcus aureus*) se obtuvo una concentración de 6.2 µg/mL.

- *Elaboración de experiencias.*

Cada experiencia se realizó por triplicado y consistió en 13 diluciones del antibiótico. Además, en cada serie se incluye un tubo control sin antibiótico para determinar el crecimiento bacteriano en ausencia de antibiótico.

Como se puede observar en la figura 5 cada tubo va a contener una misma cantidad de medio de cultivo TSB (que se diluye 2,86 veces), una misma concentración de bacterias procedentes del cultivo preparado anteriormente de forma que la concentración final fue de 5×10^5 ufc/mL, y una diferente concentración del antibiótico como se puede ver en las tablas 1 y 2.

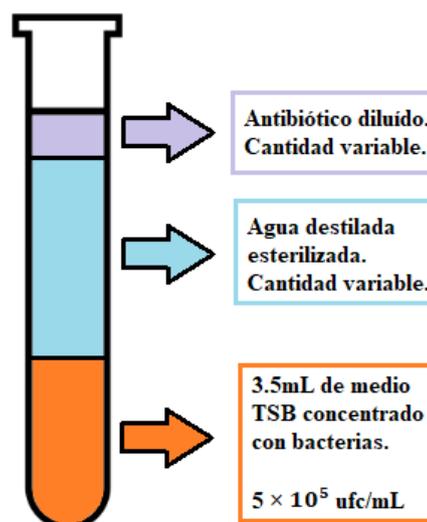


Fig. 5: Representación del contenido de los tubos de las series.

Tabla 1. Concentraciones de Amoxicilina en cada uno de los tubos de la serie para las bacterias *E. coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp. y *S. aureus*.

Tubo	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)			
	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.	<i>S. aureus</i>
1 (control)	-	-	-	-
2	100	100	100	30
3	20	20	30	15
4	17.5	17.5	15	12.5
5	15	15	12.5	10
6	12.5	12.5	10	7.5
7	10	10	7.5	5
8	8	7.5	5	2.5
9	6	5	2.5	2
10	4	2.5	2	1.8
11	2	2	1	0.72
12	0.8	0.5	0.8	0.36
13	0.6	0.125	0.4	0.18
14	0.4	0.1	0.1	0.1

Tabla 2. Concentraciones de Ciprofloxacino en cada uno de los tubos de las series de *E. coli*, *Bacillus sp.*, *Listeria sp.*, *S. aureus* y *Salmonella sp.*

Tubo	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)				
	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Listeria sp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella sp.</i>
1 (control)	-	-	-	-	-
2	0.16	0.5	10	3	1
3	0.14	0.4	1	1	0.5
4	0.12	0.35	0.875	0.5	0.4
5	0.1	0.3	0.75	0.4	0.375
6	0.08	0.25	0.625	0.35	0.3125
7	0.06	0.2	0.5	0.3	0.3
8	0.04	0.18	0.375	0.25	0.15
9	0.02	0.12	0.25	0.2	0.125
10	0.012	0.08	0.125	0.125	0.0625
11	0.004	0.06	0.025	0.0625	0.03
12	0.003	0.03	0.01	0.025	0.008
13	0.002	0.02	0.002	0.02	0.002
14	0.001	0.01	0.001	0.01	0.001

- *Obtención de datos y cálculo estadístico.*

Tras la inoculación se incuban los tubos durante 16 horas. Pasado ese tiempo se mide la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. Los porcentajes de inhibición se calculan a partir de las absorbancias obtenidas tomando como referente el tubo control, donde se considera que hubo un 100% de crecimiento y, por lo tanto, un 0% de inhibición.

Cuando el porcentaje desciende del 100% de inhibición es cuando se considera que se alcanza la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), siendo el último tubo con el 100% de inhibición el que contiene la CMI.

El valor IC50 es la concentración de antibiótico que causa que el crecimiento bacteriano sea la mitad del crecimiento que tendría la bacteria en ausencia del antibiótico. Para obtener este valor se representa gráficamente el logaritmo de las concentraciones de antibiótico utilizadas frente al porcentaje de inhibición obtenido, dando lugar a una gráfica (denominada curva dosis-respuesta) cuyos puntos se ajustan mediante regresión no lineal a una ecuación sigmoideal de cuatro parámetros. A partir de esta ecuación se calcula la concentración de medicamento que permite obtener una inhibición del 50%.

Para determinar si existen diferencias significativas entre el grado de sensibilidad de las bacterias a un determinado antibiótico se realizó un ANOVA y test de Tukey a los datos obtenidos de las IC50. Se considera la significación del test con un valor de $p < 0.05$.

4. Resultados:

4.1 Amoxicilina:

4.1.1 *Escherichia coli*

En la figura 6 se muestra una foto con los crecimientos obtenidos en algunos de los tubos del experimento (tubos más relevantes). Como se puede ver en esta figura, el último tubo donde se produjo la inhibición total fue el número 7 que se corresponde con la concentración de 10 µg/mL. Para complementar estos datos, en la tabla 3 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos para cada uno de esos tubos. En ella se puede comprobar que el último tubo donde se produjo la inhibición total fue el tubo 7.



Fig. 6: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *E. coli* en presencia de Amoxicilina transcurridas 16 horas.

Tabla 3. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *E. coli* en presencia de Amoxicilina.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	77 \pm 3.28
9	27 \pm 6.67
10	23 \pm 1.84
11	9 \pm 2.16
12	4 \pm 3.46
13	6 \pm 1.9
14	5 \pm 2.67

Con los porcentajes de inhibición obtenidos se determinó la IC50. La figura 7 representa la curva dosis-respuesta obtenida a partir del ajuste sigmoïdal. El valor de la IC50 obtenido a partir de la ecuación de ajuste fue de $7.047 \pm \mu\text{g/mL}$.

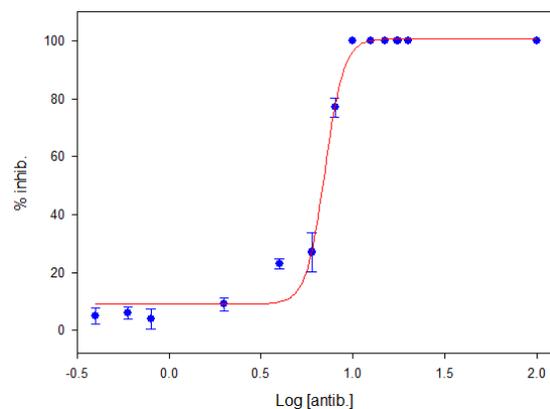


Fig. 7: Curva dosis-respuesta de *E. coli* en presencia de Amoxicilina. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoïdal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.1.2 *Staphylococcus aureus*

Los tubos más significativos de crecimiento del *S. aureus* expuesto a Amoxicilina se pueden observar en la figura 8. El tubo 6, con una concentración de 7.5 µg/mL, se correspondió con la CMI. Sin embargo, no se observa una diferencia de turbidez notable entre este tubo 6 y el tubo 7, debido a que existió crecimiento en este último tubo, siendo el porcentaje de inhibición del 88%, lo cual no es apreciable en la fotografía. En la tabla 4 se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos, donde se puede observar que el crecimiento comenzó a partir del tubo 6.



Fig. 8: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *S. aureus* en presencia de Amoxicilina transcurridas 16 horas.

Tabla 4. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *S. aureus* en presencia de Amoxicilina.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	88 \pm 0.33
8	80 \pm 3.08
9	55 \pm 2.10
10	18 \pm 1.25
11	7 \pm 3.90
12	2 \pm 2.95
13	2 \pm 1.28
14	1 \pm 2.01

Con los porcentajes de inhibición obtenidos para *S. aureus*, se obtuvo la IC50. Para obtenerla, se realizó la curva dosis-respuesta con ajuste sigmoideal que se observa en la figura 9. La IC50 obtenida fue de $2.027 \pm \mu\text{g/mL}$.

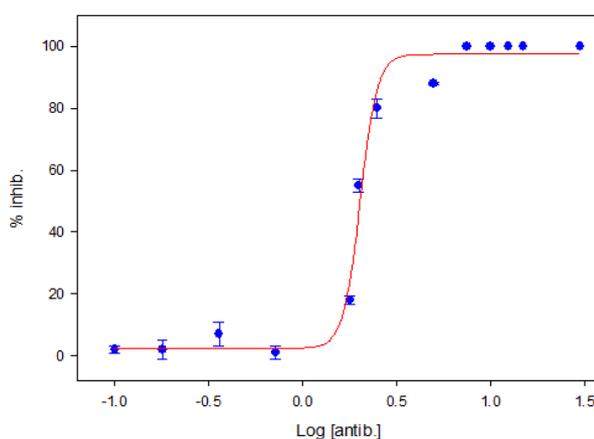


Fig. 9: Curva dosis-respuesta de *S. aureus* en presencia de Amoxicilina. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.1.3 *Bacillus* sp.

Los tubos más significativos de crecimiento del *Bacillus* sp. expuesto a Amoxicilina se pueden observar en la figura 10. En esta fotografía se puede ver un aumento de la turbidez en el tubo 10 respecto al tubo 9, siendo este último tubo, con una concentración de 5 µg/mL, la CMI. Para confirmar estos resultados se comprobó de forma cuantitativa el crecimiento. Así, en la tabla 5, se muestran los porcentajes de inhibición obtenidos en el experimento, donde se puede ver que a partir del tubo 10 es donde se produce crecimiento.



Fig. 10: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *Bacillus* sp. en presencia de Amoxicilina transcurridas 16 horas.

Tabla 5. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *Bacillus* sp. en presencia de Amoxicilina.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	100 \pm 0
9	100 \pm 0
10	33 \pm 1.69
11	28 \pm 3.16
12	2 \pm 2.85
13	3 \pm 3.98
14	1 \pm 4.98

Los porcentajes de inhibición calculados se emplearon para obtener la IC50 mediante la curva dosis-respuesta con ajuste sigmoideal (figura 11). Mediante este ajuste se obtuvo una IC50 de $2.805 \pm$ µg/mL.

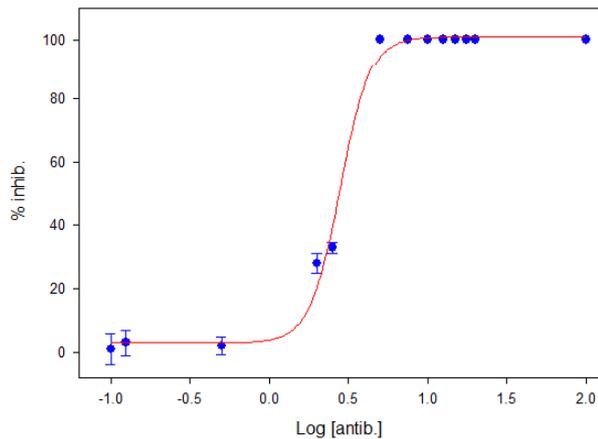


Fig. 11: Curva dosis-respuesta de *Bacillus* sp. en presencia de Amoxicilina. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.1.4 *Listeria sp.*

Los tubos más significativos de crecimiento de *Listeria sp.* expuesta a Amoxicilina se pueden observar en la figura 12. El aumento de la turbidez se produjo a partir del tubo 8, por lo que la concentración de 5 µg/mL fue la considerada como CMI. Para confirmar este resultado se realizó el cálculo de los porcentajes de inhibición. En estos porcentajes, representados en la tabla 6, se puede comprobar que comienza a haber crecimiento a partir del tubo 9.



Fig. 12: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *Listeria sp.* en presencia de Amoxicilina transcurridas 16 horas.

Tabla 6. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *Listeria sp.* en presencia de Amoxicilina.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	100 \pm 0
9	68 \pm 1.85
10	55 \pm 3.16
11	18 \pm 0.95
12	6 \pm 1.79
13	3 \pm 2.87
14	1 \pm 1.50

Con los porcentajes de inhibición obtenidos, se realizó la curva dosis-respuesta con ajuste sigmoïdal, (figura 13), La IC₅₀ que se obtuvo fue 1.903 \pm µg/mL.

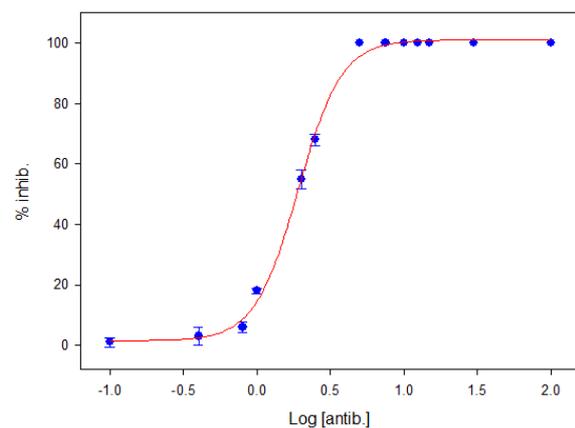


Fig. 13: Curva dosis-respuesta de *Listeria sp.* en presencia de Amoxicilina. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoïdal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.1.5 *Salmonella* sp.

Los tubos más significativos de crecimiento de *Salmonella* sp. expuesta a Amoxicilina se pueden observar en la figura 14. Se observa que a partir del tubo 7 comenzó a haber una notoria turbidez debida al crecimiento bacteriano, por lo que se interpretó que la concentración de Amoxicilina de 10 µg/mL, fue la CMI. Para corroborar esta observación, se obtuvieron los resultados de forma cuantitativa, calculando los porcentajes de inhibición. Estos porcentajes, representados en la tabla 7, muestran que hay una completa inhibición del crecimiento hasta el tubo 7.



Fig. 14: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *Salmonella* sp. en presencia de Amoxicilina transcurridas 16 horas.

Tabla 7. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *Salmonella* sp. en presencia de Amoxicilina.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	79 \pm 14.65
9	42 \pm 10.90
10	36 \pm 3.79
11	5 \pm 4.16
12	3 \pm 4.75
13	3 \pm 3.82
14	1 \pm 1.57

Con los porcentajes de inhibición calculados, se obtuvo la curva dosis-respuesta representada en la figura 15, con ajuste sigmoideal. La IC₅₀ obtenida fue de $5.865 \pm \mu\text{g/mL}$.

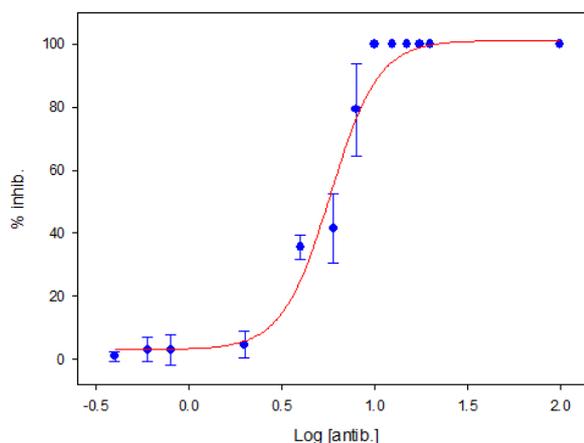


Fig. 15: Curva dosis-respuesta de *Salmonella* sp. en presencia de Amoxicilina. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.2 Ciprofloxacino

4.2.1 *Escherichia coli*

En la figura 16 se representa una fotografía de los tubos más relevantes de la exposición de *E. coli* al Ciprofloxacino. El tubo 7, con una concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, se correspondió con la CMI. Sin embargo, no se observa una diferencia de turbidez notable entre este tubo 7 y el tubo 8, debido a que existió crecimiento en este último tubo, siendo el porcentaje de inhibición del 81%, lo cual no es apreciable en la fotografía. En la tabla 8, se puede ver que hay una inhibición completa del crecimiento hasta el tubo 7 (incluido).



Fig. 16: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *E. coli* en presencia de Ciprofloxacino transcurridas 16 horas.

Tabla 8. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *E. coli* en presencia de Ciprofloxacino.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	81 \pm 0.97
9	39 \pm 0.88
10	16 \pm 1.85
11	4 \pm 0.99
12	1 \pm 1.75
13	1 \pm 2.65
14	1 \pm 1.08

Con los porcentajes de inhibición obtenidos se determinó la IC₅₀. La figura 17 representa la curva dosis-respuesta obtenida a partir de un ajuste de tipo sigmoideal. El valor de la IC₅₀ obtenido fue de 0.024 \pm $\mu\text{g/mL}$.

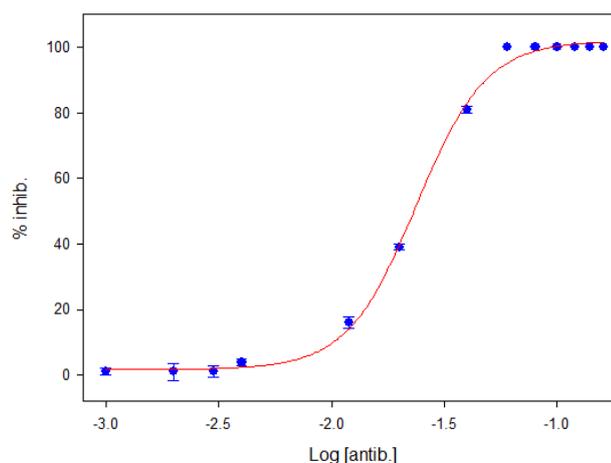


Fig. 17: Curva dosis-respuesta de *E. coli* en presencia de Ciprofloxacino. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.2.2 *Listeria sp.*

En la figura 18 se puede ver el crecimiento de *Listeria sp.* en presencia de Ciprofloxacino. Se observa un aumento de la turbidez a partir del tubo 8, por lo que la concentración de, 0.375µg/mL sería la CMI. Para confirmar esta observación, se realizó el cálculo de los porcentajes de inhibición, representados en la tabla 9. Se puede comprobar que comienza a haber crecimiento a partir del tubo 9.



Fig. 18: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *Listeria sp.* en presencia de Ciprofloxacino transcurridas 16 horas.

Tabla 9. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *Listeria sp.* en presencia de Ciprofloxacino.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	100 \pm 0
9	68 \pm 6.27
10	37 \pm 0.99
11	18 \pm 1.54
12	2 \pm 1.05
13	1 \pm 0.57
14	1 \pm 1.90

La curva dosis-respuesta correspondiente con *Listeria sp.* se encuentra representada en la figura 19. La IC50 que se obtuvo a partir del ajuste sigmoideal fue $0.172 \pm \mu\text{g/mL}$.

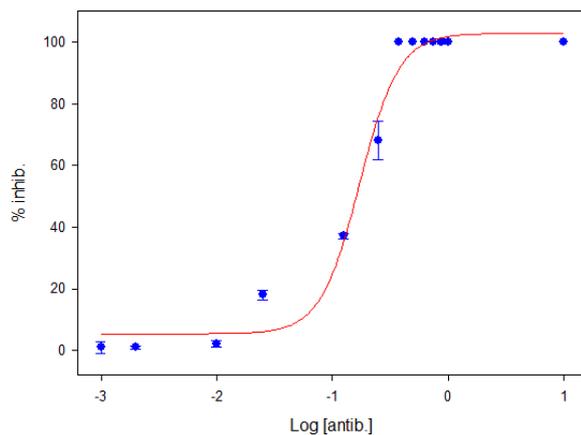


Fig. 19: Curva dosis-respuesta de *Listeria sp.* en presencia de Ciprofloxacino. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.2.3 *Salmonella* sp.

En la figura 20 se pueden ver los resultados cualitativos, donde se observa que a partir del tubo 8 comienza a haber turbidez debida al crecimiento bacteriano, por lo que se interpreta que la concentración de Ciprofloxacino que hay en el tubo 8, 0.15 $\mu\text{g/mL}$, es la CMI. Para corroborar esta observación, se obtuvieron los resultados de forma cuantitativa, calculando los porcentajes de inhibición. Estos porcentajes, representados en la tabla 10, muestran que hay una completa inhibición del crecimiento hasta el tubo 8.

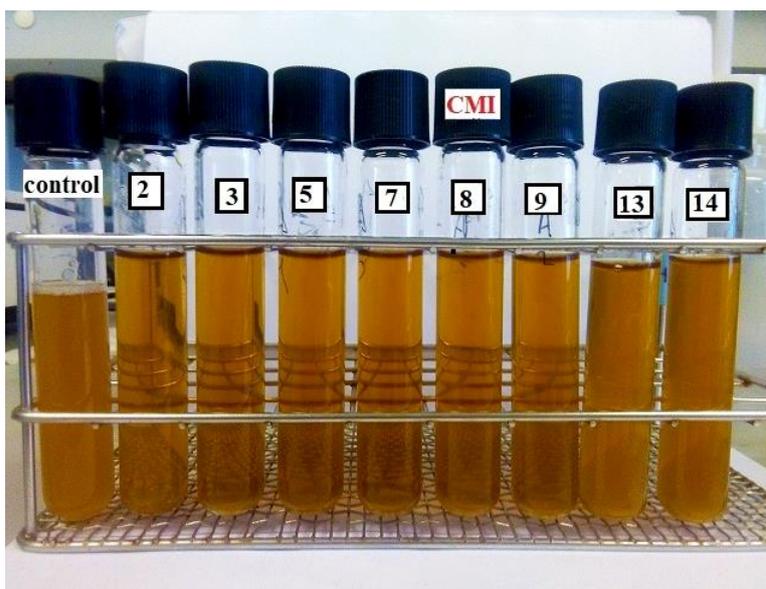


Fig. 20: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *Salmonella* sp. en presencia de Ciprofloxacino transcurridas 16 horas.

Tabla 10. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *Salmonella* sp. en presencia de Ciprofloxacino.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	100 \pm 0
9	79 \pm 2.60
10	56 \pm 1.25
11	18 \pm 2.12
12	2 \pm 2.88
13	1 \pm 1.01
14	1 \pm 2.54

Con los porcentajes de inhibición calculados, se procede a realizar la curva dosis-respuesta con ajuste sigmoideal, como aparece en la figura 21. La IC_{50} obtenida fue de $0.061 \pm \mu\text{g/mL}$.

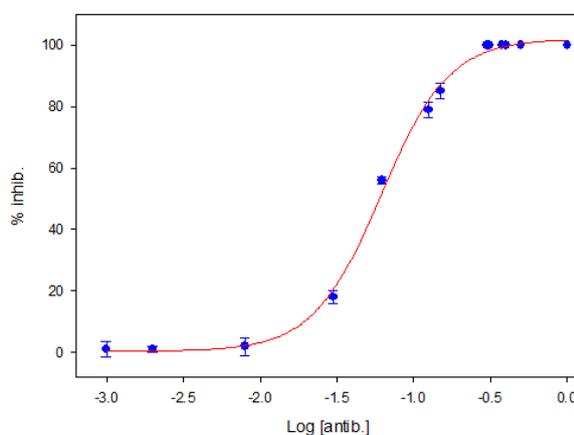


Fig. 21: Curva dosis-respuesta de *Salmonella* sp. en presencia de Ciprofloxacino. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.2.4 *Bacillus* sp.

En la figura 22 se pueden ver los resultados cualitativos, a partir del tubo 8 hay un aumento en la turbidez, siendo este tubo, con una concentración de 0.18 $\mu\text{g/mL}$, la CMI. En la tabla 11, donde se exponen los porcentajes de inhibición, se observa que a partir del tubo 8 es cuando se produce crecimiento bacteriano.



Fig. 22: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *Bacillus* sp. en presencia de Ciprofloxacino transcurridas 16 horas.

Tabla 11. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *Bacillus* sp. en presencia de Ciprofloxacino.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	100 \pm 0
9	67 \pm 2.49
10	29 \pm 1.36
11	15 \pm 2.75
12	5 \pm 1.59
13	1 \pm 2.95
14	1 \pm 0.99

La figura 23 muestra la curva dosis-respuesta que fue empleada para obtener la IC50 mediante la ecuación obtenida en al realizar el ajuste sigmoidal la CMI fue de $0.101 \pm \mu\text{g/mL}$

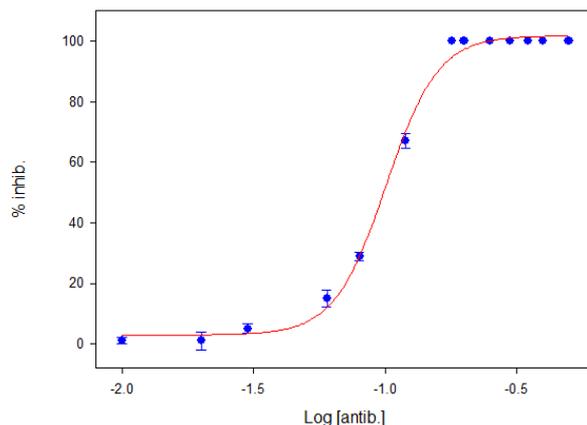


Fig. 23: Curva dosis-respuesta de *Bacillus* sp. en presencia de Ciprofloxacino. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoidal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

4.2.5 *Staphylococcus aureus*

En la figura 24 se pueden ver los resultados cualitativos. El tubo 8, con una concentración de 0.25 µg/mL, es el que contiene la CMI. A partir de este tubo se produce un aumento de la turbidez. En la tabla 12 se muestran los porcentajes de inhibición correspondientes, y se comprueba de que se produce una inhibición total hasta el tubo 8.



Fig. 24: Tubos más significativos, tubo control y tubo correspondiente a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la serie de crecimiento de *S. aureus* en presencia de Amoxicilina transcurridas 16 horas.

Tabla 12. Porcentajes medios \pm desviación ($n=3$) de inhibición de *S. aureus* en presencia de Ciprofloxacino.

Tubo	% inhib.
control	0
2	100 \pm 0
3	100 \pm 0
4	100 \pm 0
5	100 \pm 0
6	100 \pm 0
7	100 \pm 0
8	100 \pm 0
9	66 \pm 2.01
10	20 \pm 2.15
11	14 \pm 0.89
12	5 \pm 2.77
13	9 \pm 1.98
14	7 \pm 3.56

Con los porcentajes calculados de *S. aureus*, se obtiene la IC₅₀. Para obtenerla, se realizó la curva dosis-respuesta con ajuste sigmoideal que se observa en la figura 25. La IC₅₀ obtenida fue de 0.184 \pm µg/mL

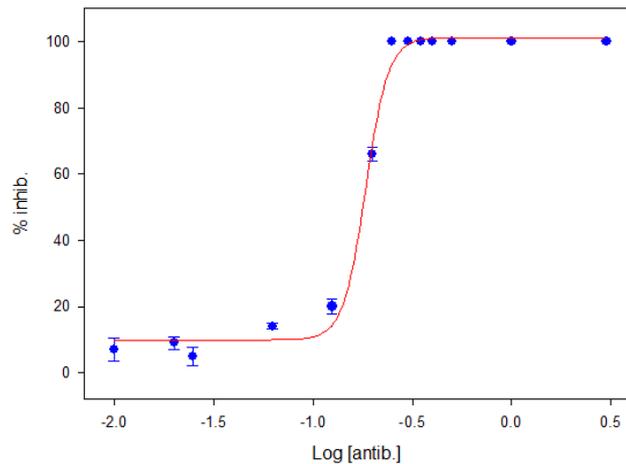


Fig. 25: Curva dosis-respuesta de *S. aureus* en presencia de Ciprofloxacino. La línea representa el ajuste de los puntos a una función sigmoideal de cuatro parámetros. Los puntos representan la media de tres réplicas y las barras la desviación estándar.

Los resultados obtenidos de CMI e IC50 para las bacterias *E. coli*, *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Listeria* sp. y *S. aureus* con los antibióticos Amoxicilina y Ciprofloxacino se resumen en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Datos correspondientes a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las IC50 (junto con las desviaciones de las 3 réplicas) de las bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus* sp., *Listeria* sp. y *Salmonella* sp. en presencia de Amoxicilina.

Bacteria	CMI (µg/mL)	IC50 (µg/mL)
<i>E. coli</i>	10	7.047 ± 0.013
<i>S. aureus</i>	7.5	2.027 ± 0.01
<i>Bacillus</i> sp.	5	2.805 ± 0.019
<i>Listeria</i> sp.	5	1.903 ± 0.013
<i>Salmonella</i> sp.	10	5.865 ± 0.031

Tabla 14. Datos correspondientes a las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y las IC50 (junto con las desviaciones de las 3 réplicas) de las bacterias *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus* sp., *Listeria* sp. y *Salmonella* sp. en presencia de Ciprofloxacino.

Bacteria	CMI (µg/mL)	IC50 (µg/mL)
<i>E. coli</i>	0.06	0.024 ± 0.013
<i>S. aureus</i>	0.25	0.184 ± 0.014
<i>Bacillus</i> sp.	0.18	0.101 ± 0.011
<i>Listeria</i> sp.	0.375	0.172 ± 0.042
<i>Salmonella</i> sp.	0.15	0.061 ± 0.018

Empleando los valores obtenidos de las IC50 se realizan el ANOVA y el test de Tukey para saber si existieron diferencias significativas en la respuesta de las bacterias. El valor obtenido en el test ANOVA para el antibiótico Ciprofloxacino fue $F_{4,10}=218.9$; $P<0.0001$ y para el antibiótico Amoxicilina $F_{4,10}=359.1$; $P<0.0001$. Este análisis nos indica que existieron diferencias significativas en la sensibilidad de cada especie bacteriana en presencia de cada uno de los antibióticos.

Para conocer qué especies presentaron diferente sensibilidad se realizó el test de Tukey, el cual indicó que para Amoxicilina no existieron diferencias en la respuesta de *Staphylococcus aureus* y *Listeria* sp., mientras que el resto de las bacterias sí que presentaron diferencias significativas. En el caso del antibiótico Ciprofloxacino, ocurre una situación similar, no existieron diferencias significativas de sensibilidad entre *Staphylococcus aureus* y *Listeria* sp., pero sí entre el resto de bacterias.

Por lo tanto, como se muestra en la figura 26, según este análisis estadístico la sensibilidad obtenida para la Amoxicilina fue:

Listeria sp. = *S. aureus* > *Bacillus sp.* > *Salmonella sp.* > *E. coli*

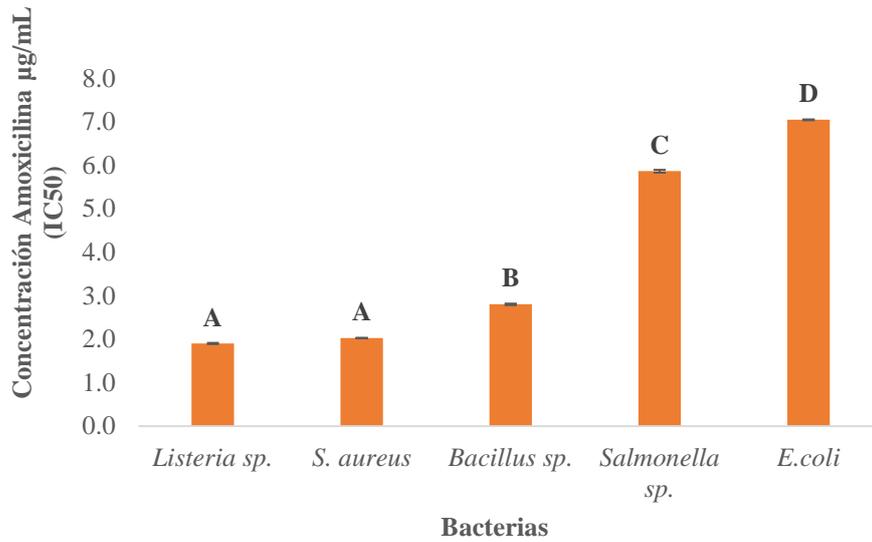


Fig. 26: Representación del grado de sensibilidad de las bacterias a la Amoxicilina. Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

En el caso del Ciprofloxacino, la sensibilidad obtenida, como se muestra en la figura 27, fue:

E. coli > *Salmonella sp.* > *Bacillus sp.* > *Listeria sp.* = *S. aureus*

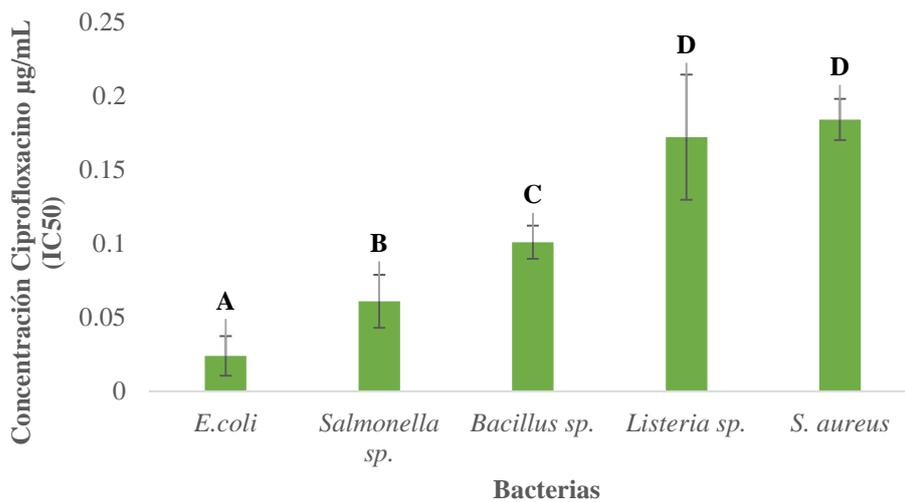


Fig.27: Representación del grado de sensibilidad de las bacterias a la Amoxicilina. Diferentes letras indican diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

5. Discusión:

Los valores obtenidos de las CMI fueron en algunos casos diferentes con respecto a las IC50 obtenidas. Esto se debe a que la CMI se obtiene directamente a partir de las concentraciones ensayas, correspondiendo su valor al de alguna de ellas; mientras que la IC50 es un valor obtenido a partir del ajuste de los datos a una ecuación, por lo que es un valor más preciso. Por eso se puede concluir que la IC50 es un valor más adecuado en el que basarse para la interpretación de los resultados y por esa misma razón es el valor que fue empleado para realizar el análisis estadístico.

Dentro del tratamiento con Amoxicilina, *E. coli* fue la especie bacteriana que menos sensibilidad presentó. Cabe esperar que las bacterias *E. coli* y *Salmonella* sp. tuvieran una sensibilidad similar porque se clasifican dentro del mismo grupo bacteriano (Enterobacterias), pero los valores de las IC50 obtenidos, aun siendo valores muy próximos, fueron significativamente diferentes (Fig. 26), siendo *E. coli* la más resistente al antibiótico. Esta diferencia puede deberse a que en la actualidad es conocido que *E. coli* presenta una alta resistencia a los antibióticos pertenecientes al grupo de las Amino-penicilinas (Tuem et al., 2018). Entre los años 2013 y 2016 a nivel europeo la resistencia de esta especie bacteriana se ha visto incrementada, de tal forma que de los aislados de *E.coli* muestreadas en el estudio de EARS-Net, 2016, el 57.4% mostraron resistencia a antibióticos que se encuentran dentro del grupo de las amino-penicilinas. Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan este hecho, lo cual constituye un problema actual para el tratamiento de infecciones causadas por esta bacteria.

Si se continúan analizando las IC50 del resto de especies ensayadas, las que mostraron una mayor sensibilidad a este antibiótico fueron, en orden ascendente en sensibilidad, *Bacillus* sp., *S. aureus* y *Listeria* sp. Este resultado puede explicarse por el hecho de que al tratarse de especies bacterianas Gram positivas son consideradas más susceptibles que *E. coli* y *Salmonella* sp. (Gram negativas) al efecto de la Amoxicilina (Akhavan y Vijhani, 2018).

Aunque, *Listeria* sp. fue la especie que más sensibilidad presentó a la Amoxicilina, sin embargo fue todo lo contrario al Ciprofloxacino, *Listeria* sp. fue la especie que más resistencia mostró, lo cual coincide con los resultados que obtuvieron Bertrand et al., 2018. Es decir, este antibiótico sería inadecuado para el tratamiento de la listeriosis ya que es común que *Listeria* sp. presente formas de resistencia al Ciprofloxacino (Legendre et al., 2017)

Los resultados obtenidos indicaron que la especie que mostró más sensibilidad a la presencia de Ciprofloxacino fue *E. coli*, seguida a corta distancia por *Salmonella* sp. (Fig.27). Al igual que se comentó anteriormente, una posible explicación de esta proximidad es la misma clasificación de ambas bacterias, y por tanto podría esperarse una sensibilidad similar a este antibiótico. Este resultado es muy interesante porque a diferencia de la Amoxicilina, un tratamiento más adecuado para infecciones causadas por estas bacterias sería el Ciprofloxacino. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Meesters et al.,2018, donde el tratamiento con Ciprofloxacino fue más eficaz con bacterias pertenecientes al grupo de las Enterobacterias que con especies como *S. aureus*.

De hecho, se conoce que las bacterias Gram negativas son más susceptibles a este antibiótico (LeBel, 1988)

Hooton et al., 2005, realizaron un experimento centrado en cistitis de mujer, en concreto con la bacteria *E. coli*, tratada con Amoxicilina (con Ácido Clavulánico) y Ciprofloxacino, obtuvieron que *E. coli* presentó una mayor sensibilidad al Ciprofloxacino. Este estudio coincide con los resultados obtenidos, pues esta especie resultó ser la que mostró más sensibilidad al Ciprofloxacino, mientras que fue la más resistente a la Amoxicilina. Esta sensibilidad al Ciprofloxacino de *E. coli* también coincide con los resultados de Mortensen et al. 2013, donde se indica que es precisamente el antibiótico Ciprofloxacino el más comúnmente empleado para combatir las infecciones provocadas por esta especie bacteriana.

Listeria sp. y *S. aureus* no presentaron diferencias significativas en la respuesta ante la presencia de ambos antibióticos, siendo las más sensibles en el tratamiento con Amoxicilina y las más resistentes en el de Ciprofloxacino. Una posible explicación de este resultado es a que ambas bacterias comparten características fisiológicas comunes, ambas son Gram positivas, anaerobias facultativas y constan de resistencia al grupo de las penicilinas (Chambers y DeLeo, 2009; Skowron et al., 2018).

Finalmente, en el tratamiento con Ciprofloxacino que *S. aureus* sea una de las bacterias más resistentes coincide con los datos obtenidos por EARS-Net, 2016, donde se expone que en esta especie es común la resistencia a los antibióticos del grupo de las fluoroquinolonas. Al presentar esta resistencia al Ciprofloxacino, se demuestra que el uso este antibiótico no es recomendable para tratar la especie *S. aureus*. Este resultado coincide con el experimento llevado a cabo por Meesters et al., 2018, donde solo el 3% de los tratamientos con Ciprofloxacino a esta especie tuvo éxito.

6. Conclusiones:

Las conclusiones que se pueden obtener con estos resultados son:

- Las bacterias ensayadas presentaron diferente grado de sensibilidad a ambos antibióticos.
- Las bacterias ensayadas fueron más sensibles al antibiótico Ciprofloxacino que a la Amoxicilina.
- La especie bacteriana *Escherichia coli* fue la más resistente en el tratamiento con Amoxicilina, y la más sensible en el tratamiento de Ciprofloxacino.
- *Listeria* sp. fue la más sensible en el tratamiento con Amoxicilina pero la más resistente en el de Ciprofloxacino.

7. Conclusions:

They are the conclusions that can be obtained with these results:

- The results obtained in this study reflect that the tested bacteria are more sensitive to the antibiotic Ciprofloxacin than to Amoxicillin.
- The bacterial species *Escherichia coli* was the most resistant in the treatment with Amoxicillin, and the most sensitive in the treatment of Ciprofloxacin.
- *Listeria sp.* it was the most sensitive in the treatment with Amoxicillin but the more resistant in the Ciprofloxacin.
- The results of the IC50 are more accurate than those obtained from the MIC.

8. Bibliografía:

- Akhavan, B.J.; Vijhani, P. (2018) *Amoxicillin*. StatPearls Publishing LLC.(In press).
- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(S1), 5-16.
- Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) (2016). Antimicrobial resistance in Europe 2013–2016 *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe* (pp. 7-58) . European Centre for Disease Prevention and Control.
- Bertrand, S.; Ceysens, P. J.; Yde, M.; Dierick, K.; Boyen, F.; Vanderpas, J.; Mattheus, W. (2016). Diversity of *Listeria monocytogenes* strains of clinical and food chain origins in Belgium between 1985 and 2014. *PloS one*, 11(10), e0164283. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27723768>, consultada el 13 de Julio del 2018.
- Besser, J. M. (2018). Salmonella epidemiology: A whirlwind of change. *Food microbiology*, 71, 55- 59.
- Chambers, H. F.; DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629– 641.
- Croxen, M. A.; Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38.
- Cunha, B. A. (2009). *Antibiotic essentials*. (pp. 466-467). Subbury, Massachusetts: Physicians'press a División of Jones and Bertlett Publishers.
- Da Costa, T. M.; de Oliveira, C. R.; Chambers, H. F.; Chatterjee, S. S. (2018). *PBP4: A New Perspective on Staphylococcus aureus β -Lactam Resistance*. *Microorganisms*, 6(3), 57.

- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), 1-7.
- Fair, R. J.; Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in medicinal chemistry*, 6, 25-64.
- Fowler, P. W.; Cole, K.; Gordon, N. C.; Kearns, A. M.; Llewelyn, M. J.; Peto, T. E.; Walker, A. S. (2018). Robust prediction of resistance to trimethoprim in *Staphylococcus aureus*. *Cell chemical biology*, 25(3), 339-349.
- Hensel, M. (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 294(2-3), 95-102.
- Hooton, T. M.; Scholes, D.; Gupta, K.; Stapleton, A. E.; Roberts, P. L.; Stamm, W. E. (2005). Amoxicillin-clavulanate vs ciprofloxacin for the treatment of uncomplicated cystitis in women: a randomized trial. *Jama*, 293(8), 949-955.
- Ikeh, M. A. C.; Obi, S. K. C.; Ezeasor, D. N.; Ezeonu, I. M.; Moneke, A. N. (2010). Incidence and pathogenicity profile of *Listeria* sp. isolated from food and environmental samples in Nsukka, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 9(30), 4776-4782.
- Ingraham, J.L.; Ingraham, C.A. (1998). Las Bacterias, *Introducción a la Microbiología* (pp. 247- 272). Barcelona: Editorial Reverté.
- Kumar, S.R.; Paudel, S.; Ghimire, L.; Bergeron, S.; Cai, S.; Zemans, R. L.; Jeyaseelan, S. (2018). Emerging Roles of Inflammasomes in Acute Pneumonia. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 197(2), 160-171.
- Legendre, C.; Hanneltel, H.; Ranc, A. G.; Bezza, W.; Pages, L.; Vandenesch, F.; Doleans-Jordheim, A. (2017). *Listeria monocytogenes* and ocular abscess: an atypical but yet potential association. *International ophthalmology*, 1-8.
- Marasini, S.; Swift, S.; Dean, S. J.; Ormonde, S. E.; Craig, J. P. (2016). Spectrum and sensitivity of bacterial keratitis isolates in Auckland. *Journal of ophthalmology*, 10.1155/2016/3769341.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Spectrum+and+sensitivity+of+bacterial+keratitis+isolates+in+Auckland> Consultada el 20 de Junio del 2018.
- Meesters, K.; Michelet, R.; Mauel, R.; Raes, A.; Van Bocxlaer, J.; Walle, J. V.; Vermeulen, A. (2018). Pharmacokinetics of ciprofloxacin in children with

complicated urinary tract infection: results of a multicenter population pharmacokinetic study. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-00517. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29987142> Consultada el 17 de julio de 2018.

- Naylor, N. R.; Atun, R.; Zhu, N.; Kulasabanathan, K.; Silva, S.; Chatterjee, A.; Robotham, J. V. (2018). Estimating the burden of antimicrobial resistance: a systematic literature review. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 58.
- Salton, M.R.L.; Kim, K. (1992) Chapter 2: Structure. Baron S.(eds).*Medical Microbiology*. Galveston (TX).
- Skowron, K.; Kwiecińska-Piróg, J.; Grudlewska, K.; Świeca, A.; Paluszak, Z.; Bauza-Kaszewska, J.; Gospodarek-Komkowska, E. (2018). The occurrence, transmission, virulence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in fish processing plant. *International journal of food microbiology*. 282, 71-83.
- Taheri-Araghi, S.; Bradde, S.; Sauls, J. T.; Hill, N. S.; Levin, P. A.; Paulsson, J., Jun, S. (2015). Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Current Biology*, 25(3), 385-391.
- Todd, P.A.; Benfield, P. (1990) Amoxicillin/Clavulanic Acid. *Drugs*, 39 (2), 264-307.
- Tuem, K. B.; Gebre, A. K.; Atey, T. M.; Bitew, H.; Yimer, E. M.; Berhe, D. F. (2018). Drug Resistance Patterns of *Escherichia coli* in Ethiopia: A meta-analysis. *BioMed research international*, 2018, 1-13.
- Vance-Bryan, K.; Guay, D. R.; Rotschafer, J. C. (1990). Clinical pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Clinical pharmacokinetics*, 19(6), 434-461.
- Vasoo, S., Barreto, J. N., Tosh, P. K. (2015). Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clinic Proceedings*. 90 (3), 395-403.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163- 175