



Trabajo Fin de Grado

**DETERMINACIÓN DE SINERGIAS
ANTIBIÓTICAS EN PATÓGENOS DE
INTERÉS SANITARIO**

**DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SYNERGY
AGAINST BACTERIAL PATHOGENS OF MEDICAL
INTEREST**

Autor:

Daniel Jiménez Navarro

Directores:

Santiago Ramón García y José Antonio Ainsa

Grupo de investigación:

Grupo D²AMR (Descubrimiento y Desarrollo de Antimicrobianos y
Mecanismos de Resistencia)

Facultad de Medicina

Curso 2017/2018

ÍNDICE

Resumen/ Abstract.....	1
1- Introducción	2
1.1) <i>Staphylococcus aureus</i>	2
1.2) Tratamientos monoterapia	3
Problema: las resistencias.....	4
1.3) Descubrimiento de nuevos fármacos y reposicionamiento.....	5
1.4) Tratamiento combinado: Las sinergias	6
2- Objetivo.....	7
3- Materiales y métodos.....	7
3.1) Antibióticos utilizados.....	7
3.2) Materiales y medios de cultivo	8
3.3) Cepa de trabajo y preparación del material celular	8
3.4) Cálculo de las CIM líquidas y sólidas.....	8
3.5) Búsqueda del efecto sinérgico	9
3.6) Checker-boards	10
3.7) Cinéticas de muerte	11
4- Resultados.....	12
4.1) Cálculo de la CIM líquida y sólida	12
4.2) Búsqueda de efecto sinérgico	13
4.3) Chekerboards	16
4.4) Crecimiento bacteriano en las cinéticas de muerte	19
5- Discusión	21
6- Conclusiones/ conclusions	23
7- Bibliografía	24
Anexos	

Resumen

La resistencia a antimicrobianos se ha convertido a día de hoy, en uno de los mayores problemas de la salud pública mundial. Los tratamientos mono-terapia con los antibióticos disponibles actualmente no cubren con éxito las infecciones de bacterias resistentes. Dado que el descubrimiento de nuevos compuestos no es lo suficientemente satisfactorio, se plantean otras alternativas como el uso de terapias combinadas. Se han encontrado en diferentes estudios interacciones entre antibióticos que presentan efectos sinérgicos, consiguiendo inhibir el crecimiento de microorganismos con dosis menores que las que se requieren por separado.

En este trabajo, partimos de 16 antibióticos disponibles en la clínica, con los que se ensayaron 128 combinaciones posibles contra una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina. Con un estudio de interacciones basado en la CIM se hallaron 17 interacciones prometedoras entre combinaciones de dos antibióticos. Dichas combinaciones se validaron por estudios de cinéticas de muerte, consiguiendo un total de cinco sinergias y un antagonismo. Entre éstos resultados cabría remarcar como contribución novedosa de este trabajo de TFG el descubrimiento del efecto sinérgico entre bacitracina y linezolid, y efecto antagonístico entre moxifloxacina y linezolid.

Estos estudios deben completarse en un futuro con ensayos *in vivo* en modelos animales, así como estudios *in vitro* frente a cepas resistentes a meticilina (MRSA) con una incidencia relevante en la clínica.

Abstract

Nowadays, antimicrobial resistance has become one of the biggest public health problems in the world. The ordinary mono-therapy antibiotics treatments do not cover successfully the infections caused by resistant bacteria. Due to the fact that the discovery of new compounds is not satisfactory enough, other alternatives are proposed like the use of combination therapies. Interactions between antibiotics that have synergistic effects have been found in different studies, getting inhibited the growth of microorganisms with lower doses than the other doses that are required separately.

In this work, we started with 16 antibiotics available in the clinic, and we tested with these until 128 possible combinations against a strain of sensitive-methicillin *Staphylococcus aureus*. With an interaction study based on the Minimal Inhibitory Concentrations (MIC), 17 interactions were found between combinations of two antibiotics. These combinations were validated by studies of kill-kinetics, achieving a total of five synergies and one antagonism. Among these results we should highlight like a novel contribution of this TFG, the discovery of a synergistic effect between bacitracin and linezolid, and an antagonistic effect between moxifloxacin and linezolid.

In the future, these studies should be completed with *in vivo* tests in animal models, as well as studies *in vitro* against methicillin resistant strains (MRSA), with a relevant clinical incidence.

1- Introducción

1.1) *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus (o estafilococo dorado), es una bacteria anaerobia facultativa, **gran positiva**, catalasa positiva, inmóvil y no esporuladora. Un coco de 0,5-1 μm de diámetro, que se encuentra formando racimos con otros cocos. Posee una característica **pared celular** con un 50% de péptidoglicano, compuesto por N-acetilmuránico y N-acetilglucosamina. ⁽¹⁾ Crece rápidamente en todos los medios bajo condiciones **aerobias o microaerófilas**. Puede diferenciarse por su pigmentación amarilla debida a la estafilocantina, un carotenoide unido a su membrana, que además elimina las especies reactivas de oxígeno protegiendo a la bacteria de ser fagocitada. ⁽²⁾ Otra característica distintiva es su capacidad de coagular sangre gracias a la secreción de coagulasa y una proteína de unión al factor von Willebrand. ⁽³⁾

Podemos encontrarla ampliamente **distribuida por todo el mundo**. Por su forma de vida es capaz de detectar diversas señales y usando complejas redes reguladoras adaptarse a distintos entornos o modular su virulencia. ⁽⁴⁾ Un 20-30% de las personas son **portadores** de *S. aureus*, es decir, están constantemente colonizados (pero no infectados) en piel y fosas nasales. Aunque la colonización no implica enfermedad, aumenta el riesgo de infección ya que el reservorio es suficiente para introducirse en el huésped cuando su sistema inmunitario está comprometido, llegar a tejidos blandos, sistema respiratorio y torrente sanguíneo causando complicaciones. ⁽⁵⁾

Las **infecciones** que puede causar son muy variadas, yendo desde cutáneas, consideradas benignas, hasta otras de riesgo vital (como pueden ser abscesos profundos, sepsis, endocarditis o neumonía). En estos abscesos producen unos exudados purulentos por medio de los que diseminan a nuevos huéspedes. Es por eso que se considera la principal causante de enfermedades **nosocomiales**, contraídas por pacientes ingresados en ambiente intra-hospitalario, donde por medio de heridas quirúrgicas penetra en sangre al contactar con material contaminado, otros pacientes o el propio personal sanitario. ⁽¹⁾ Luego los pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos están más expuestos a tales infecciones. ⁽⁶⁾

Pero dichas infecciones no solo se deben a malas prácticas sanitarias. En los últimos años el espectro de la enfermedad ha cambiado, y ahora están presentes entre la población no hospitalizada debido a factores de virulencia particulares y presiones selectivas que acaban generado resistencias a tratamientos, haciendo las infecciones cada vez más graves y frecuentes. Como *S. aureus* crece rápidamente en múltiples tipos de medio, es una de las principales especies susceptibles a generar resistencia y además trasmisible persona a persona, vamos a centrarnos en ésta bacteria de gran interés en salud pública. ⁽⁷⁾

1.2) Tratamientos monoterapia

La opción óptima para tratar infecciones por *S. aureus* es el uso de **antibióticos**, productos metabólicos naturales que pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos, es decir, tienen actividad antimicrobiana. ⁽⁸⁾ Lo malo de estos tratamientos antimicrobianos es que conforme pasa el tiempo pueden ir perdiendo su eficacia, ya que son capaces de adquirir resistencia. ⁽⁹⁾

En un inicio, el tratamiento de elección contra infecciones de *S. aureus* era la **penicilina** (β -lactámico que inhibía la síntesis de la pared celular). Pero debido a su uso abusivo actualmente el 80% de *S. aureus* es resistente a penicilina. Con cambios químicos en la estructura, se desarrollaron las **penicilinas derivadas** resistentes a penicilinas (oxacilina, naftcilina, dicloxacilina y meticilina), que junto con los **aminoglicósidos** (inhiben la síntesis proteica al bloquear el ribosoma), ⁽¹⁰⁾ fueron los fármacos de elección ante resistencia a penicilinas, y los siguientes en recomendarse.

Actualmente, la **vancomicina** (glicopéptido que inhibe la síntesis del peptidoglicano que compone la pared celular) y la **daptomicina** (lipopéptido cíclico natural que se une a la membrana bacteriana causando su despolarización) son los únicos antibióticos aprobados por la FDA para combatir *S. aureus* resistentes a β -lactámicos, constituyendo las monoterapias de primera línea. ⁽¹¹⁾ Se ha visto que la daptomicina tiene mejores resultados a largo plazo que la vancomicina, aun así la vancomicina muestra mayor eficacia que otros glicopéptidos. Sin embargo, se ha observado que cada vez se necesita más concentración de éstos para inhibir el crecimiento, lo que puede limitar la terapia por la aparición de nuevas resistencias.

Agentes más nuevos como **linezolid** y **ceftarolina** se han utilizado de forma individual para el tratamiento contra *S. aureus*. Linezolid (oxazolidinona que inhibe la síntesis proteica) es una opción efectiva para ciertos tipos de infección, pero debido a sus propiedades bacteriostáticas, no se considera tratamiento de primera línea. ⁽¹²⁾ Mientras que la ceftarolina (cefalosporina semi-sintética que actúa contra la síntesis de la pared celular en bacterias con cierta resistencia a otros tratamientos), ⁽¹³⁾ ya está aprobada para infecciones complicadas de piel y tejidos blandos.

Problema: las resistencias

La resistencia a los antimicrobianos (AMR) se ha convertido en **uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI** que amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de infecciones bacterianas, que ya no son susceptibles a los medicamentos comunes. Frente a esta realidad, la necesidad de actuar para evitar una crisis global es imperativa, por eso, la Organización Mundial de la Salud ha reconocido la necesidad de un esfuerzo coordinado para contener las AMR ya existentes y frenar la aparición de otras nuevas. Para ello es necesario fortalecer los sistemas de salud y vigilancia; mejorar el uso de antimicrobianos; prevenir y controlar las infecciones; desarrollar una intensa labor de búsqueda e identificación de nuevos antimicrobianos e implementar técnicas/protocolos para evaluar la efectividad. ⁽¹⁴⁾

En Europa, el número de muertes debidas a bacterias resistentes a múltiples fármacos se estimó entre 25000 y 400000 ⁽¹⁵⁾. Además, el **impacto económico** de las resistencias es difícil de cuantificar, ya que se deben tener en cuenta el costo de antibióticos (cuando aparecen resistencias a los antimicrobianos de primera línea, el tratamiento debe cambiarse a otros de segunda o tercera línea, que son más caros), equipos especializados, hospitalización prolongada y procedimientos de aislamiento.

Se identifican **cuatro sectores involucrados** en el desarrollo de la resistencia a los antibióticos: la medicina humana en la comunidad y en el hospital, la producción animal (el uso de éstos como promotores del crecimiento), la agricultura, y el

compartimento ambiental (el suelo y agua supone un medio de transporte de muchas resistencias) ⁽¹⁵⁾. Muchos estudios indican falta de conocimiento sobre los antibióticos en la población general, sobre todo de su actividad y sus efectos adversos. Tanto el uso excesivo como inapropiado de antibióticos (elección o dosificación inadecuada) contribuyen al aumento de las resistencias a los antibióticos. ⁽¹⁶⁾

La resistencia a los antibióticos es un **fenómeno natural, constante y evolutivo**, pero que se puede ver acelerado cuando los microorganismos están expuestos a demasiados antibióticos. El desarrollo de resistencias puede ocurrir como un mecanismo de **defensa** (disminuyendo la eficacia del antibiótico) o como mecanismo de **competencia**, cuando la presión selectiva del antibiótico mata a las bacterias susceptibles o inhibe su crecimiento, mientras que las que son resistentes de forma natural o intrínseca tienen una mayor probabilidad de sobrevivir y multiplicarse. ⁽¹⁷⁾

Pero éste problema existe desde hace tiempo. La **penicilina** se aplicó clínicamente a gran escala, y tras varios años de uso apareció el *S. aureus* resistente: **PRSA**. Las cepas PRSA llevan un gen que codifica para la penicilinasa, enzima que hidroliza el anillo β -lactama de la Penicilina para inactivar su actividad. Éstas PRSA se controlaron con la introducción de **meticilina** resistente a β -lactamasas. Pero poco después de su uso rutinario como monoterapia, se informó de la existencia de **MRSA**, un *S. aureus* resistente a meticilina y a otros β -lactámicos, incluidas oxacilina, dicloxacilina, y cefalosporinas. Por resistir múltiples fármacos, MRSA se considera una superbacteria, un patógeno más agresivo, responsable de muchas de las infecciones nombradas anteriormente, pero con peor pronóstico y mayor prevalencia. La **vancomicina** se usó como último recurso en el tratamiento de infecciones por *S. aureus*. Pero del mismo modo que con meticilina, su uso monoterápico generó una cepa resistente: **VISA**. La propagación de las cepas PRSA, MRSA o VISA provocó el desarrollo de nuevos antibióticos. Sin embargo, ya se ha informado de la existencia de cepas resistentes a muchos de los antibióticos recientemente comercializados. ⁽¹⁹⁾

1.3) Descubrimiento de nuevos fármacos y reposicionamiento

Ante las nuevas resistencias emergentes aparecen dos posibles alternativas a los tratamientos monoterapia; la búsqueda de nuevas dianas para antibióticos, o la búsqueda de nuevos compuestos químicos eficaces.

La búsqueda de antibióticos existe desde hace muchos años. Es por eso que tenemos **técnicas clásicas** de búsqueda como la modificación química de productos activos ya caracterizados (penicilinas semisintéticas mejoradas) ⁽¹⁹⁾ o “screenings” de productos naturales a partir del estudio de microorganismos ambientales (como las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos sintetizados por otros microorganismos). ⁽²⁰⁾ También disponemos de nuevos métodos de búsqueda que han aparecido gracias al desarrollo de la biología molecular y la genética, permitiendo encontrar dianas moleculares comunes entre diferentes microorganismos y ausentes en el ser humano, consiguiendo así antibióticos de amplio espectro y selectividad por la diana. Pero estos estudios denominados “target-based approach” (encontrar una diana para inhibirla) ofrecen pocos resultados. ⁽²¹⁾ El mayor inconveniente de éste **diseño racional** de antibióticos es que un buen inhibidor de diana no tiene por qué presentar necesariamente actividad antimicrobiana, de modo que al probar su eficacia frente al

microorganismo entero, este no es capaz de inhibir el crecimiento de la célula, ya que influye todo el entorno celular en la eficacia final. Por eso, se ha regresado a los métodos clásicos como los “**screening**” de **células enteras** (whole-cell) los cuales seleccionan directamente el antimicrobiano entre los candidatos, pero no permiten saber cuál es exactamente la diana del compuesto ni su mecanismo de acción.

Como vemos, encontrar un nuevo antimicrobiano es una tarea difícil, y la **industria farmacéutica** no suele interesarse por tal búsqueda debido a todas sus limitaciones: regulaciones muy estrictas, dificultades técnicas, procesos laboriosos o mucho tiempo de investigación. Solamente se han aprobados unos 40 antibióticos por año en los últimos cinco años, y solo 2 clases nuevas se han comercializado en 30 años. ⁽²²⁾

La tasa de éxito del descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos no aborda como gustaría la necesidad clínica, por eso existen otras alternativas para atender tal necesidad, como la reutilización de compuestos existentes. Este método se denomina **reposición o “repurposing”** ⁽²³⁾, donde medicamentos ya aprobados han ganado un nuevo impulso por la identificación de su efectividad en nuevas terapias para las que en un principio no estaban destinadas. Para dar con estos compuestos se hacen cribados de colecciones de cientos de compuestos que se encuentran en el mercado. En el caso de encontrar uno que inhiba al microorganismo, se le daría una nueva utilidad. La ventaja de estas técnicas es la posibilidad de **acortar los tiempos de búsqueda**, ya que no es necesario repetir ensayos preclínicos ni clínicos de fase I, éstos ya se realizaron en los primeros estudios del compuesto, consiguiendo reducir así 10-17 años a 3-8 años. ⁽²⁴⁾ El inconveniente del reposicionamiento es que muchos compuestos tienen **poca potencia** para la nueva indicación que se les concede; esto limitaría su aplicación, ya que se necesitarían concentraciones demasiado elevadas para conseguir inhibir el crecimiento del microorganismo. ⁽²⁵⁾

1.4) Tratamiento combinado: Las sinergias

Una estrategia alternativa para aumentar la tasa de éxito del reposicionamiento y combatir las resistencias es la combinación de fármacos, de 2 o más compuestos con diferentes mecanismos de acción conocidos, complementarios y compatibles. ⁽²⁶⁾

El propósito de estudiar combinaciones antibióticas es determinar si existe un efecto sinérgico, es decir, que la actividad conjunta de la mezcla binaria sea mayor que la suma de actividades por separado, de modo que en presencia el uno del otro se potencia la acción y se necesite menos dosis total para alcanzar el efecto inhibidor que si se usasen por separado, reduciendo de este modo los potenciales efectos secundarios como problemas de citotoxicidad. Pero el efecto de la combinación también puede ser indiferente o incluso antagonista; cuando la suma de actividades individuales es mayor que la actividad conjunta. ⁽²⁷⁾

Cabe resaltar que las interacciones que se encuentran ocurren *in vitro*, y la significancia clínica puede ser todavía incierta ya que no tienen en cuenta las fluctuaciones de la concentración antibiótica en el organismo (la farmacocinética), ni la actividad del compuesto activo en el lugar de acción (la farmacodinámica). ⁽²⁸⁾ Pero de todas formas, estos estudios son esperanzadores para el tratamiento de enfermedades infecciosas, y de interés en salud pública.

Se ha visto necesario el desarrollo de técnicas de muestreo experimental y de puntuación, que evidencien si ocurre interacción entre compuestos antibióticos y que midan la eficiencia de forma discriminatoria.⁽²⁹⁾ Una de las pruebas más utilizadas y sencillas es la **titulación de tablero de ajedrez (Checkerboard)**, que representa gráficamente el comportamiento conjunto de 2 compuestos.⁽³⁰⁾ En este estudio, se introduce el cultivo bacteriano de interés a una concentración determinada, y se hacen diluciones de dos antibióticos, incluyendo valores mayores y menores de la CIM (concentración inhibitoria mínima capaz de evitar el crecimiento) determinada previamente para cada agente por separado. Una vez hallada las nuevas CIMs del compuesto A en presencia de B y viceversa se determina la FIC (concentración inhibitoria fraccional), una expresión matemática que se usa para determinar el tipo de efecto resultante de la combinación. ⁽³¹⁾

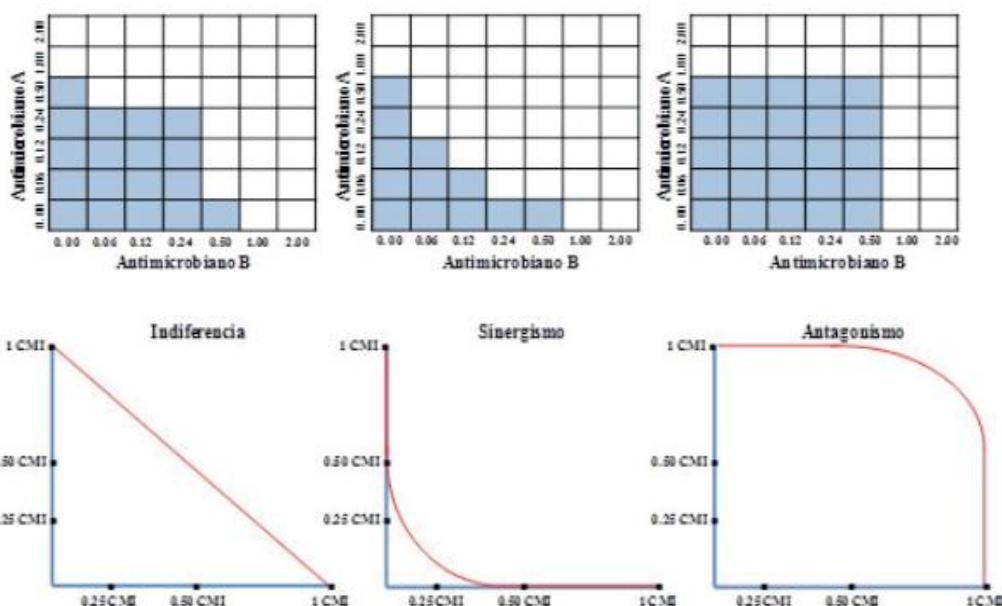


Figura 1(referencia 30 de la bibliografía): Técnica Checkerboard o tablero de ajedrez. Arriba las gráficas de diluciones de los antimicrobianos A y B. Abajo representaciones mediante isobologramas de los 3 tipos de interacción que podemos encontrar; indiferencia (o no interacción), sinergia y antagonismo, según el perfil de la curva.

Con las gráficas de las FIC, podemos ver el perfil de la interacción. Una curva con forma cóncava es característica de sinergia, con forma convexa característica de antagonismo, pero si en lugar de una curva obtenemos una recta de pendiente negativa, se debe a que la combinación de antibióticos no presenta interacción.

Una ventaja de estos estudios es la inclusión de miles de compuestos que ya están clínicamente aprobados así como la reintroducción de compuestos que habían perdido su eficacia. En estos estudios se pueden ensayar hasta 100 combinaciones de dosis diferentes, reduciendo así el tiempo que requiere encontrar un compuesto y su aprobación.

2- Objetivo

Con la aplicación de técnicas que permiten estudiar las posibles interacciones entre diferentes compuestos (*Synergy Screening*) se persiguen los siguientes objetivos:

- 1) Realizar cribados de compuestos aprobados en la clínica en búsqueda de combinaciones sinérgicas contra *S. aureus* sensible a meticilina.
- 2) Caracterizar y verificar *in vitro* las interacciones de interés encontradas en el cribado anterior.

3- Materiales y métodos

El screening o búsqueda de interacciones consta de 4 etapas, a lo largo de las cuales nos quedamos con menos candidatos, hasta dar con aquellos que cumplen las características de sinergia.

1. Calculamos las concentraciones mínimas inhibitorias de cada compuesto por separado para nuestra cepa, las CIM.
2. Realizamos una primera aproximación del cribado sinérgico en la que se ensayan concentraciones concretas de antibiótico
3. Caracterizamos a más detalle las interacciones encontradas, donde se prueba un rango de concentraciones más amplio mediante Checkerboards.
4. Verificamos el efecto sinérgico y determinamos si nuestras combinaciones son bactericidas o bacteriostáticas usando cinéticas de muerte.



Figura 2: Cascada de progresión del estudio de combinaciones usada en este proyecto.

3.1- Antibióticos utilizados

Los antibióticos utilizados en éste trabajo fueron obtenidos de la casa comercial Sigma y pertenecen a la colección de compuestos del Grupo de Genética de Micobacterias. Los compuestos fueron disueltos a una concentración madre o stock de 10 mg/mL en sus respectivos disolventes (DMSO, H₂O o etanol) y guardados a -20°C hasta su utilización.

Los antibióticos (16 en total) fueron seleccionados con el objetivo de obtener la mayor representación posible de familias antibióticas y mecanismos moleculares de acción, para tratar de cubrir el mayor número posible de dianas bacterianas a las que

atacar. Se pueden encontrar más detalles referentes a los compuestos en la [Tabla del Anexo 1](#).

3.2- Materiales y medios de cultivo

Se han empleado medios Mueller Hinton, especialmente líquido, pero también se hizo uso de Mueller Hinton y LB sólidos (con 1,5% de agar). Para la preparación de este MHII se siguieron las instrucciones de la casa comercial FLUKA, y posteriormente se añadieron sales de CaCl_2 a 10g/L y MgSO_4 a 10g/L (550 y 300 μL respectivamente por cada 250 mL de medio) para enriquecerlo y conseguir las características deseadas. Respecto al medio LB, en la [tabla del Anexo 2](#) podemos encontrar la preparación (tanto del líquido como del sólido).

Todo el material utilizado era estéril. Las manipulaciones de las bacterias se realizaron en campana de flujo vertical para evitar cualquier contaminación, y en un nivel de bioseguridad P2. Y la incubación de *S. aureus* se realizó en estufa a 37°C.

3.3- Cepa de trabajo y preparación del material celular.

Partimos de una cepa de *Staphylococcus aureus*. Se trata de la cepa CECT 794 de MSSA (sensible a meticilina), que se encuentra congelada a -20°C con glicerol como agente crioprotector.

A partir de un eppendorf con dicha cepa, tomamos 100 μl para incubarlos en medio LB a 37°C. Al día siguiente preparamos alícuotas, en los que mezclamos 300 μl del inoculo en LB con 700 μl de glicerol al 50%. Estas alícuotas serán nuestro material celular a lo largo de los experimentos, y lo llamaremos inóculo bacteriano. Es importante usar uno por cada experimento, ya que una vez descongelados no pueden volver al congelador, sino su viabilidad se vería afectada.

Para calcular el número de unidades formadoras de colonias (UFCs) que tenemos por mililitro cogimos una alícuota e hicimos diluciones seriadas 1/10 en PBS (100 μl inóculo + 900 μl PBS) sembrando las distintas concentraciones en placas de Petri con LB-agar, las incubamos a 37°C y al día siguiente contamos las UFCs. La concentración de las cepas que habíamos congelado era de $2'8 \times 10^8$ UFCs/mL Sabiendo el número de células que tenemos de partida es más fácil hacer las preparaciones para futuros experimentos.

3.4- Cálculo de las CIM líquidas y sólidas

A partir de la CIM teórica, calculamos la concentración máxima (Cmax) que vamos a estudiar. Con el stock de cada antibiótico preparamos un Mix en el que teníamos una concentración de 2xCmax. Para cada antibiótico hicimos un replicado del cálculo.

En placas de 96 pocillos colocamos MHII de las columnas 2 a 11, los diferentes mixes en la columna 1, e hicimos diluciones seriadas 1:2. Una vez tuvimos la placa con el gradiente de concentraciones de antibiótico junto al medio, preparamos el inóculo, el cual debía tener una concentración de 2×10^5 células/mL en 10mL de MHII. Inoculadas las placas con 75 μL de la preparación, incubamos a 37°C durante 1 día.

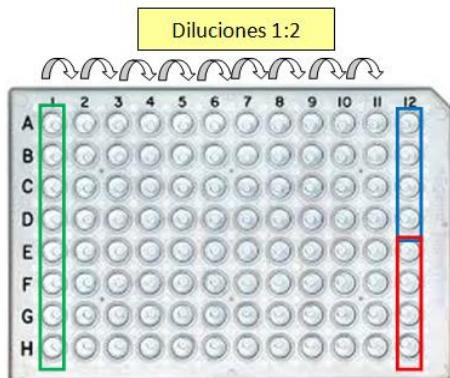


Figura 3.1: Preparación de la placa con diluciones seriadas 1:2 de cada antibiótico. En los pocillos en verde los mixes a concentración $2 \times C_{max}$, en azul el control positivo (medio e inóculo) y en rojo el control negativo solo con medio MHII.

Para valorar si *S. aureus* había crecido, realizamos un ensayo con MTT, una sal de tetrazoleo soluble en agua y de color amarillo que al reducirse pasa a formazano, un compuesto insoluble y de color violeta. Al añadir MTT 5mg/mL con 20% de Tween en cada pocillo

incubamos durante 1 hora para que se metabolice. Una vez apareció color oscuro en aquellos pocillos que presentaban crecimiento microbiano, llevamos las placas al espectofotómetro, para medir la absorbancia a 580nm.

Con las absorbancias, calculamos la absorbancia relativa de cada pocillo respecto al control positivo. Para ello aplicamos la siguiente fórmula:

$$Absorbancia \text{ relativa} = \frac{\text{Absorbancia del pocillo} * 100}{\text{Absorbancia control positivo} - \text{Absorbancia residual del medio}}$$

La absorbancia del medio por sí solo nos la proporcionó el control negativo.

Con las absorbancias relativas se determinó qué pocillo presentaba la CIM, ya que establecimos que por debajo de un 20% de absorbancia, el antibiótico había inhibido el crecimiento. Sabiendo el pocillo sacamos el valor de la CIM ($\mu\text{g/mL}$).

Repetimos el cálculo de CIM pero ahora en medio sólido (con agar) para comprobar si los valores hallados son concisos y reproducibles.

En este caso usamos placas de 24 pocillos, donde añadimos 2mL de MHII-agar por pocillo y dejamos que solidifcase. Preparamos diluciones seriadas de los stocks de antibióticos. Como sabemos la C_{max} de cada antibiótico, calculamos qué volumen del stock coger para en un volumen final de 2mL tener la concentración deseada. Añadimos éstos volúmenes de más concentrado (pocillo 1) a más diluido (pocillo 11). El pocillo 12 será el control positivo sin antibiótico.

En este caso el inóculo tenía 10^3 células/mL, y como partíamos de 2×10^8 células/mL primero hicimos una dilución 1:10, y luego una 1:200 en un volumen final de 1mL. De este mililitro añadimos 10 μL a cada pocillo. Incubamos las placas a 37°C, y al cabo de 3 días comprobamos a simple vista en qué pocillos había aparecido crecimiento.

3.5- Búsqueda de efecto sinérgico

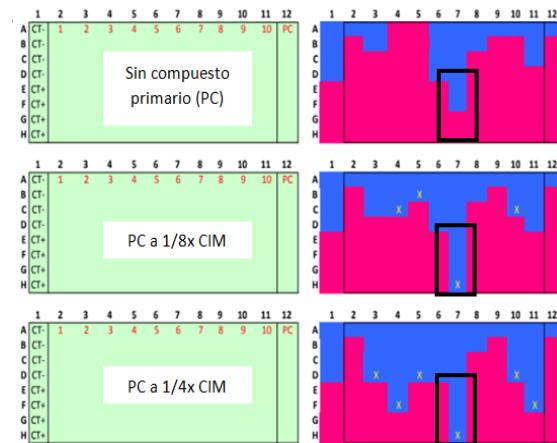
Vamos a calcular la CIM de cada compuesto (B o secundario) pero en este caso en presencia de una concentración fija de otro compuesto (A o primario). Buscamos una reducción en la CIM del compuesto B de hasta 4 unidades en presencia del A.

Preparamos 3 placas de diluciones seriadas para cada antibiótico (compuestos B) en placas de 96. A la primera de éstas únicamente añadimos inóculo bacteriano (el control), a la segunda una concentración 1/4 de la CIM del compuesto A, y a la tercera 1/8 de la CIM. Como tenemos las CIM en medio líquido, pudimos sacar cuanto sería 1/4 y 1/8 de las CIM, y el volumen de stock necesario para alcanzar esas

concentraciones. Respecto al inóculo bacteriano, usamos una concentración de 2×10^5 células/mL en 10mL de MHII, y de ésta preparación añadimos 75 μ L por pocillo.

Figura 3.2 (referencia 36 de la bibliografía): Representación de las 3 placas con diluciones del compuesto secundario, el crecimiento bacteriano en rosa y la inhibición en azul, con una reducción de CIM en la dilución 7 (rodeado en negro). Arriba sin compuesto primario, en medio con 1/8xCIM del PC, y abajo con 1/4xCIM del PC.

Incubamos a 37°C y al día siguiente añadimos MTT con 20% de Tween para leer las placas. A la hora pasamos al espectrofotómetro, donde medimos la absorbancia a 580nm.



Sacamos los valores CIM para cada antibiótico a partir de la absorbancia, y observamos las variaciones de estos valores. Lo que buscamos fue una situación en la que la CIM del compuesto B en presencia del A bajase al menos 4 veces respecto a la CIM del compuesto B solo, lo cual determinaría una interacción con efecto sinérgico. Pero del mismo modo que podía ocurrir reducción, la CIM podía aumentar, lo cual también era interesante. Si el aumento era de más de 4 unidades se consideraría efecto antagónico. Con las siguientes fórmulas hicimos el cálculo para todas las combinaciones antibióticas ensayadas:

$$\text{Sinergia: } \frac{\text{CIM compuesto B sin compuesto A}}{\text{CIM compuesto B con } \frac{1}{4} \text{ o } \frac{1}{8} \text{ del compuesto A}} > 4$$

$$\text{Antagonismo: } \frac{\text{CIM compuesto B sin compuesto A}}{\text{CIM compuesto B con } \frac{1}{4} \text{ o } \frac{1}{8} \text{ del compuesto A}} < 0,25$$

Para tener una representación visual de las interacciones encontradas, representamos el porcentaje de crecimiento bacteriano frente a la concentración (μ g/mL) del compuesto secundario (B) en las 3 situaciones; sin compuesto primario (A), en presencia de una concentración fija 1/4xCIM y 1/8xCIM de A.

3.6- Checkerboards

Con las combinaciones que según el experimento anterior presentaban interacción mas las que decidimos continuar caracterizando (19 en total), hicimos el experimento checkerboard o tablero de ajedrez, en el que ya no enfrentábamos un antibiótico frente a otro de dosis fija, sino que se cruzaban múltiples dosis de ambos antibióticos, en búsqueda de una sinergia más detallada.

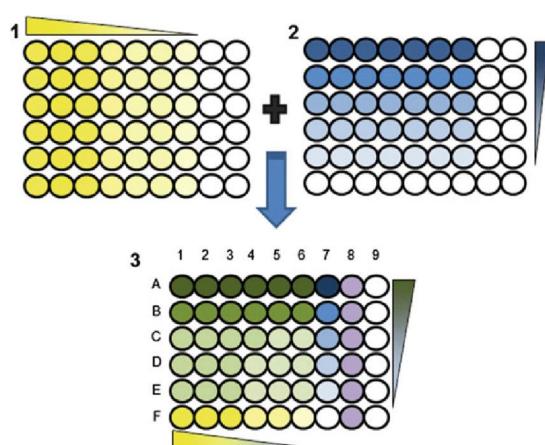


Figura 3.3 (referencia 37 de la bibliografía): Técnica checkerboard, con diluciones seriadas en horizontal del compuesto A (placa 1), en vertical del compuesto B (placa 2) y la combinación de A y B (placa 3).

En este caso los Mixes añadidos en las columna y fila 1 estaban a una concentración 4xCIM, ya que íbamos a hacer 2 diluciones 1:2.

Para juntar los 2 compuestos en la tercera placa tomamos 50 μ L de cada pocillo, y los colocamos manteniendo las mismas posiciones que la placa de origen, reduciendo así la concentración a 2x. El inóculo bacteriano estaba a concentración de 2x10⁵ células/mL, en 10mL de MHII. Al añadir a cada pocillo 100 μ L de la preparación de inóculo, redujimos la concentración del antibiótico a 1xCIM.

Incubamos a 37°C durante un día, y antes leer las palcas con MTT como en los experimentos anteriores, hicimos una réplica en placa para calcular la CBM (concentración bactericida mínima capaz de destruir el 99,9% del inóculo). Para ello cogimos un pequeño volumen de cada pocillo y los pasamos a una placa de LB-agar manteniendo las posiciones. Tras incubar estas replicas sin antibiótico durante un día a 37°C, le añadimos a cada pocillo Resazurina, un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción azul a un color rosáceo debido a la reducción de dicho compuesto. Cuando terminó de metabolizarse el compuesto, analizamos las palcas a simple vista para hallar la CBM.

La CBM nos permitió saber si el antibiótico tenían efecto bacteriostático (solo inhibía el crecimiento) o bactericida (mataba a las bacterias), ya que si el compuesto Resazurina se reducía y ocurría el cambio de color indicaba que las bacterias habían recuperado su crecimiento y que el antibiótico era bacteriostático.

Respecto a las placas que leímos con MTT, calculamos las CIM. Pero para tener un verdadero criterio de exclusión y elegir las combinaciones de antibióticos correctas, utilizamos un método de puntuación basado en la FIC (concentración inhibitoria fraccional) que comparaba la CIM de un compuesto en presencia de otro frente a su CIM cuando se encuentra solo (en el control). Calculamos la FIC del compuesto B, y a estas le sumamos la FIC del compuesto A. Las fórmulas usadas son las siguientes:

$$FIC (B) = \frac{\text{CIM compuesto B en presencia del compuesto A}}{\text{CIM compuesto B solo}}$$

$$FIC (A) = \frac{\text{CIM compuesto A en presencia del compuesto B}}{\text{CIM compuesto A solo}} ; \quad FICI = FIC A + FIC B$$

Al sumar FIC B y FIC A obtuvimos un valor FICI (fracción inhibitoria índice) para cada combinación, y según dicho valor se asignaba directamente el tipo de interacción que ocurría en la combinación por un criterio estandarizado ⁽³⁰⁾.

Tanto FIC A como B van a variar según la dosis del pocillo, luego calculamos las FIC A y B para cada dosis de compuestos A y B, y representamos como varia una respecto a la otra, obteniendo el perfil de interacción.

3.7- Cinéticas de muerte

Una vez acotado el estudio a 6 combinaciones (5 sinergias y 1 antagonismo), pasamos a caracterizar mediante cinéticas de muerte la interacción de las combinaciones a largo plazo frente cultivos bacterianos de *S. aureus*.

En un frasco de cultivo, el Flask madre (control inicial a tiempo cero), pusimos 60mL de MHII y añadimos 0,03mL de inóculo para alcanzar una concentración de 10⁵ células/mL. Con una pequeña muestra del cultivo, hicimos diluciones seriadas 1:10 en PBS. Sembramos estas diluciones en placas Petri con LB-agar y las incubamos a

37°C para contar al día siguiente las UFCs (unidades formadoras de colonias) que tenía el control inicial.

Con el resto del Flask madre preparamos pequeños Flask, y a cada uno le añadimos el volumen de antibiótico correspondiente para alcanzar la concentración deseada (1/5 de la CIM o 1x la CIM). Estos Flask los incubamos durante un día, tomando controles del crecimiento bacteriano a lo largo de diferentes tiempos (t= 1, 3, 6, 24 y 48horas). **En el caso del antagonismo, en lugar de concentraciones 1/5 de la CIM, pusimos concentración 5 veces mayor que la CIM.*

Flash control	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano (control)
Flash 1/5 A	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano + compuesto A a 1/5 de su CIM
Flash 1x A	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano + compuesto A a su concentración CIM
Flash 1/5 B	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano + compuesto B a 1/5 de su CIM
Flash 1x B	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano + compuesto B a su concentración CIM
Flash 1/5A + 1/5B	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano + compuestos A y B a 1/5 de sus CIMs
Flash 1xA + 1xB	5mL MHII y 0,03mL inoculo bacteriano + compuestos A y B a sus concentraciones CIMs

Para los controles se necesitó por cada pareja de antibióticos, una placa de 96 pocillos con PBS y una placa de cultivo rectangular con LB-agar.

Inoculamos en los diferentes pocillos de la columna 1 una muestra de cada Flask, e hicimos diluciones seriadas 1:10 con el PBS que habíamos añadido a la placa. Cogimos un pequeño volumen de cada pocillo para sembrarlo en la placa de LB-agar, manteniendo el orden de los pocillos y con cuidado de que las gotas no se mezclasen (estas placas de siembra en agar carecían de pocillos). Incubamos las placas a 37°C para contar al día siguiente el número de UFCs que había en cada fila de la réplica, y por lo tanto en cada Flask. A las 3 horas de comenzar el experimento, repetimos el proceso con los mismos Flask para tener el número de UFCs a otro tiempo. Y una vez pasadas 6, 24 y 48 horas volvimos a repetir el proceso. De este modo caracterizamos el crecimiento bacteriano ante diferentes combinaciones de antibiótico durante 48 horas de contacto con el cultivo.

Conociendo las UFCs que había a cada tiempo y en cada Flask, calculamos el logaritmo en base 10 de la media de UFCs, y lo representamos frente al tiempo obteniendo así las cinéticas de muerte. Las fórmulas usadas fueron:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{UFC media}}{\text{Volumen plaqueado (\muL)}} \times \frac{1000 \mu\text{L}}{1\text{mL}} \quad \log_{10} \text{UFC/mL} = x \text{ (valor entre 0 y 10)}$$

4- Resultados

4.1- Cálculo de las CIM líquidas y sólidas

Por medio de las absorbancias pudimos saber el pocillo que tenía la CIM. Como conocíamos la dilución de ese pocillo, y la concentración que habíamos puesto hallamos el valor CIM (μg/mL) para cada antibiótico.

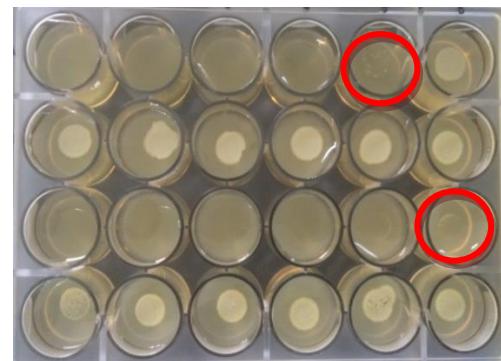
CIM en líquido:

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Moxifloxacina	0,023	Minociclina	1
Bacitracina	16	Amikacina	5
Amoxicilina	0,5	Estreptomicina	50
Cloxacilina	0,31	Rifampicina	0,0062
Econazol	5	Cloranfenicol	2
Trimetoprim	10	Vancomicina	0,31
Linezolid	1,25	Meropenem	0,18
Gentamicina	0,31	Tetraciclina	0,5

Tabla 4.1: Concentraciones inhibitorias mínimas de cada uno de los antibióticos que hemos probado contra nuestra cepa de *S. aureus* en Mueller Hinton II líquido.

Respecto a las CIM sólidas, valoramos en qué pocillo ocurría la inhibición de crecimiento a simple vista. El pocillo anterior al primero en presentar un halo de crecimiento era el que contenía la CIM. Como sabemos la concentración que pusimos en ese pocillo, hallamos la CIM.

Imagen 4.2: Resultado de una placa de CIM en sólido. En rojo los pocillo que contienen la CIM de 2 antibióticos diferentes.



CIM en sólido:

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Antibiótico	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Moxifloxacina	0,0625	Minociclina	0,093
Bacitracina	5	Amikacina	16
Amoxicilina	0,5	Estreptomicina	5
Cloxacilina	0,0062	Rifampicina	0,62
Econazol	2	Cloranfenicol	5
Trimetoprim	1,25	Vancomicina	0,5
Linezolid	0,37	Meropenem	1,25
Gentamicina	0,25	Tetraciclina	2,5

Tabla 4.3: Concentraciones inhibitorias mínimas de cada uno de los antibióticos que hemos probado contra nuestra cepa de *S. aureus* en medio Mueller Hinton II sólido.

Vemos que los valores CIM entre el medio líquido y sólido no han cambiado mucho, indicándonos la reproducibilidad del cálculo de CIMs. Tomamos estos valores como válidos, aunque para futuros experimentos tendremos en cuenta el valor de CIM en líquido ya que se realizaron en dicho medio.

4.2- Búsqueda de efecto sinérgico

A partir de las absorbancias volvemos a sacar el valor CIM como hicimos anteriormente, para cada antibiótico tanto solo como en presencia de otro.

Tuvimos que reajustar los cálculos, ya que pusimos 1/4 y 1/8 de las CIM que habíamos calculado al inicio, pero al hacer un control en éste experimento obtuvimos unas nuevas CIM con algunas desviaciones* (en su mayoría, habían aumentado), por

lo que las concentraciones que habíamos inoculado en algunos casos, en realidad no eran 1/4 y 1/8, sino menores, pudiendo haber perdido alguna interacción sinérgica. Este era el caso de los compuestos meropenem o tetraciclina, de los cuales añadimos 1/8 y 1/16 de la CIM.

**Los stocks de antibiótico pueden perder actividad con el tiempo si realizamos muchos ciclos de congelación y descongelación, necesitando más concentración para alcanzar el mismo efecto; motivo por el que algunas CIM pueden aumentar.*

Comparando el valor de CIM de la placa control con las CIM de cada antibiótico en presencia de otro, buscamos las combinaciones en las que la CIM del compuesto B en presencia del compuesto A baje (o suba) al menos 4 veces su valor.

- Sinergia: CIM combinación/ CIM control > 4
- No interacción: CIM combinación/ CIM control 0,25-4
- Antagonismo: CIM combinación/ CIM control < 0,25

Siguiendo éste criterio, determinamos el tipo de interacción de las 128 combinaciones ensayadas y obtuvimos la siguiente tabla:

		COMPUESTO A							
		MIN	AMK	STR	RIF	CRF	VCM	MER	TET
COMPUESTO B	MIN	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	AMK	Sy	NI						
	STR	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	RIF	Sy	NI						
	CRF	Sy	NI	NI	Sy	NI	NI	NI	NI
	VCM	NI	NI	NI	NI	An	NI	NI	NI
	MER	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	TET	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
	MOX	BCT	AMX	CXL	ECZ	TMT	LNZ	GEN	
	MOX	NI	NI	NI	Sy	NI	NI	An	NI

Tabla 4.4: Caracterización del tipo de interacción que ocurre en cada combinación. En horizontal el compuesto A (añadido a concentración fija) y en vertical el compuesto B. En colores y siglas se indica el tipo de interacción, siendo en verde (Sy) efecto sinérgico, en amarillo (NI) no ocurre interacción, y en rojo (An) efecto antagónico.

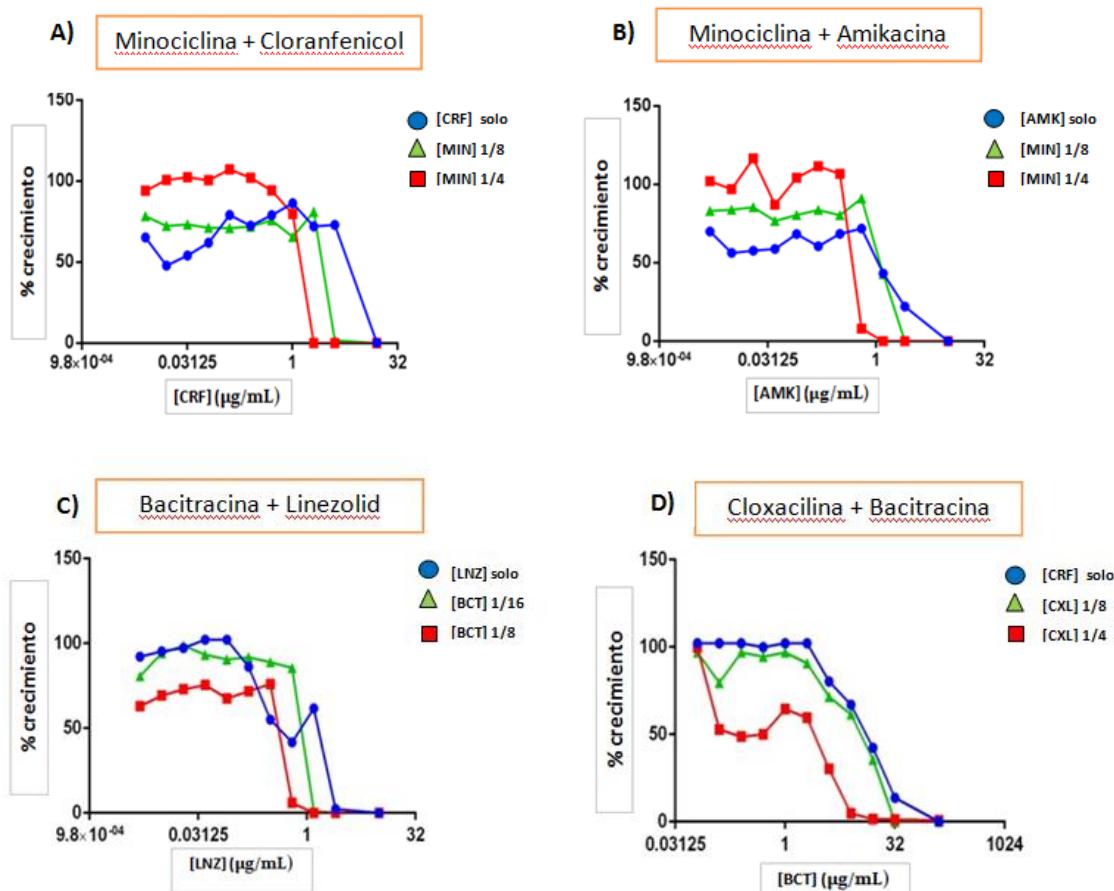
Los valores CIM obtenidos para cada combinación y la comparación de éstos, que nos permitió elaborar la tabla anterior, pueden encontrarse en las [Tablas del Anexo 3](#).

Según la tabla 4.4 y el criterio explicado anteriormente para considerar efecto sinérgico, obtuvimos 13 interacciones diferentes, de las cuales 11 presentaban efecto sinérgico y 2 efecto antagónico (descartando no interacciones). Pero además añadimos cuatro combinaciones más con los que teníamos duda y decidimos continuar los experimentos con ellas. En total las 17 combinaciones de la tabla de a continuación pasaron a la siguiente fase:

	Combinación
Sinergia	Moxifloxacina + Econazol, Bacitracina + (Econazol/ Linezolid/ Amoxicilina), Cloxacilina + (Moxifloxacina/ Bacitracina/ Trimetoprim/ Linezolid), Rifampicina + Cloranfenicol, Minociclina + (Amikacina/ Rifampicina/ Cloranfenicol/ Meropenem/ Vancomicina) y Vancomicina + Estreptomicina
Antagonismo	Moxifloxacina + Linezolid y Cloranfenicol + Vancomicina

Tabla 4.5: Interacciones encontradas en una primera aproximación de la búsqueda de efectos sinérgicos.

Para comprobar visualmente el efecto sinérgico encontrado en estas combinaciones, representamos el porcentaje de crecimiento bacteriano obtenido para cada antibiótico en 3 situaciones: solo, en presencia de 1/4 y de 1/8 de la CIM de otro antibiótico. Las siguientes 4 gráficas muestran los resultados más relevantes:



Gráficas 5 A, B, C y D: Representaciones del crecimiento dosis respuesta bacteriano (en tanto por ciento) frente a la concentración ($\mu\text{g/mL}$) del compuesto B en 3 situaciones distintas. En azul, únicamente el compuesto B (indicado en el eje X), en verde el compuesto B más 1/8 de la CIM del segundo antibiótico (compuesto A), y en rojo el compuesto B más 1/4 de la CIM del compuesto A.

La gráfica 5.D (sinergia entre cloxacilina y bacitracina) es la que mejores resultados presenta. Conforme aumentamos la concentración del antibiótico inicial (bacitracina como compuesto B) va disminuyendo el crecimiento bacteriano, pero esta

disminución se alcanza con menos concentración de bacitracina al combinarse con una concentración fija de compuesto A (1/8 de cloxacilina). La inhibición del crecimiento aún es más brusca y rápida con una concentración fija mayor (1/4 de cloxacilina). En el caso de bacitracina y linezolid (gráfica 5.C), al readjustar los cálculos con las CIM del control, vimos que en realidad las concentraciones añadidas de bacitracina eran 1/8 y 1/16 de la CIM, pero a pesar de ello mostraban un buen efecto sinérgico. Respecto a las sinergias entre minociclina y cloranfenicol o minociclina y amikacina (Gráficas 5.A y 5.B respectivamente) el perfil de las curvas no está tan claro, aun así ambas combinaciones muestran que con 1/4 de minociclina, se requiere menor cantidad del compuesto B para alcanzar la inhibición bacteriana.

Analizando las 17 gráficas comprobamos si el efecto sinérgico (o antagonístico) se cumple. A pesar de que en algunas de ellas no se apreciaba perfectamente el efecto sinérgico como en las anteriormente, continuamos los ensayos con las 17 combinaciones, ya que el cálculo nos estaba indicando que sí había sinergia.

4.3- Checkerboard

A partir de las absorbancias volvemos a sacar el valor CIM para cada par de antibióticos. Pero en este caso lo que interesa para poder discriminar el tipo de interacción es la FICI. Según el valor FICI de cada combinación se asigna el tipo de interacción.

Tabla 4.6: Tipo de interacción estandarizado que corresponde al valor de FICI obtenido.

Calculamos las FIC de los compuestos A y B aplicando las fórmulas ya explicadas, y con la suma de éstas hallamos FICI. Un caso concreto sería:

Valor FICI	Tipo de interacción
< 0,5	Sinergia
0,5-4	No interacción
>4	Antagonismo

- Si la CIM de bacitracina fue 64 µg/mL, la de linezolid 2,5 µg/mL, la de bacitracina en presencia de linezolid bajó a 8 µg/mL y la de linezolid en presencia de bacitracina bajó a 0,3125 µg/mL, la FICI sería la siguiente:

$$FIC B (LNZ) = \frac{0,3125}{2,5} = 0,125$$

$$FIC A (BCT) = \frac{8}{64} = 0,125$$

$$FIC A + FIC B = FICI = 0,25$$

Según el criterio estándar establecido, con una FICI menor de 0,5 se trata de sinergia.

- Si la CIM de linezolid es 2,5 µg/mL, la de moxifloxacina 0,04686 µg/mL, la de moxifloxacina en presencia de linezolid subió a 0,1874 µg/mL y la de linezolid en presencia de moxifloxacina fue 1,25 µg/mL, la FICI sería la siguiente:

$$FIC B (LNZ) = \frac{1,25}{2,5} = 0,5$$

$$FIC A (MOX) = \frac{0,1874}{0,04686} = 4$$

$$FIC\ A + FIC\ B = FICI = 4,5$$

Según éste valor de FICI, ésta interacción tiene un efecto antagónico.

Siguiendo este cálculo para las 17 combinaciones, obtuvimos la siguiente tabla:

Compuesto A	Compuesto B	FICI	Tipo de interacción
BCT	LNZ	0,25	Sy
CXL	LNZ	0,37	Sy
CXL	BCT	0,374	Sy
BCT	AMX	0,5	Sy
MIN	CRF	0,56	Sy
CRF	RIF	0,74	Ni
MIN	RIF	0,75	Ni
BCT	ECZ	0,75	Ni
CXL	MOX	0,75	Ni
MIN	AMK	1	Ni
MER	MIN	1	Ni
VCM	CRF	1	Ni
MOX	ECZ	1	Ni
MIN	VCM	1,015	Ni
VCM	STR	1,125	Ni
MOX	LNZ	4,25	An
CXL	TMT	ND	ND

Tabla 4.7: Resultados del checkerboard donde aparece la FIC de cada par de compuestos, la FICI de la combinación, y el tipo de interacción que se le asigna según ese valor FICI. En verde (Sy) efecto sinérgico, en amarillo (Ni) cuando no ocurre interacción, y en rojo (An) efecto antagónico.

La gráfica con las CIM y FIC de cada compuesto por separado pueden encontrarse en la [Tabla del Anexo 4](#).

No se pudo determinar el tipo de interacción que ocurría entre cloxacilina (CXL) y trimetoprim (TMT). Respecto a la interacción minociclina + cloranfenicol se obtuvo una FICI de más de 0,5 (0,56), aun así la aceptamos como sinergia. Únicamente con las 5 sinergias obtenidas y el antagonismo, pasamos al siguiente experimento.

En cuanto a las replicas en LB-agar, tras incubarlas y observarlas vimos lo siguiente:

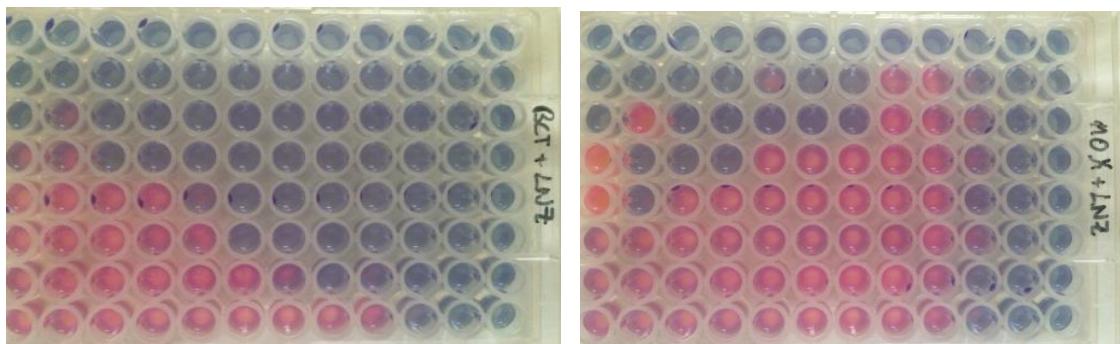


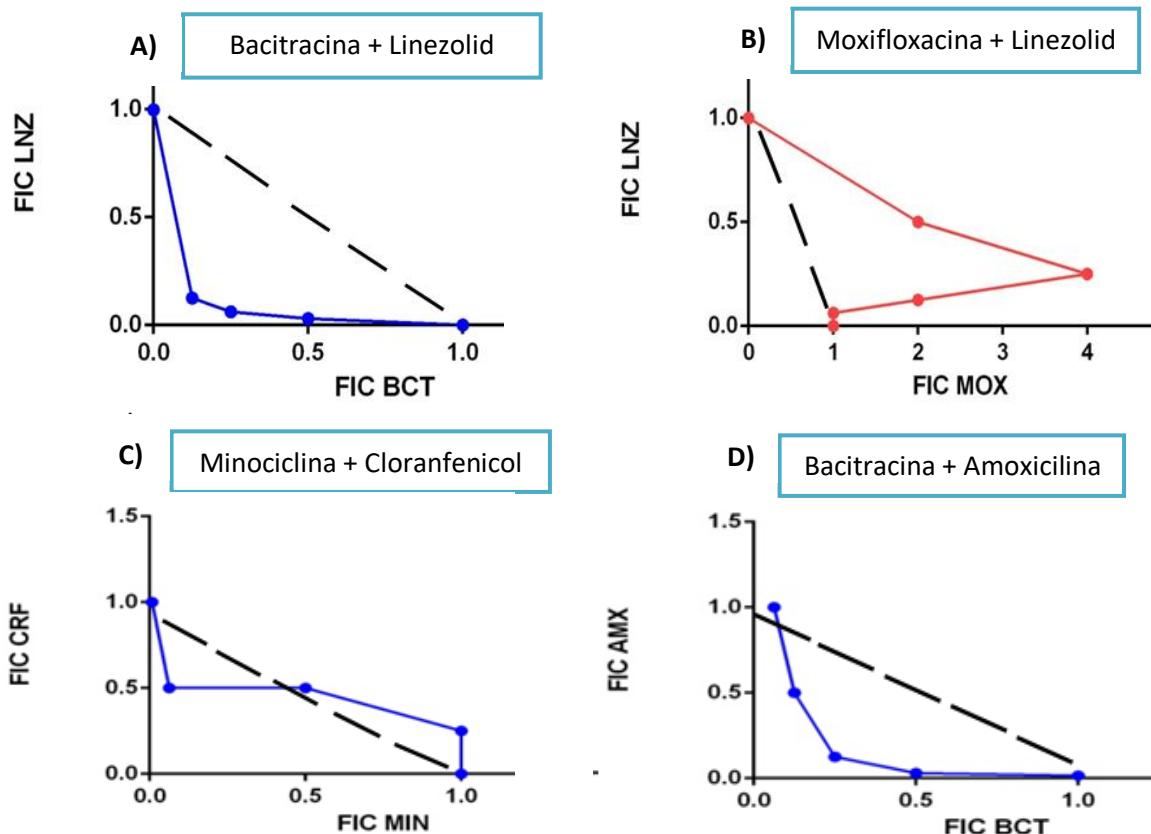
Imagen 4.7: Ejemplos de sinergismo (izquierda, bacitracina con linezolid) y antagonismo (derecha, moxifloxacina con linezolid).

Con éstas replicas estudiamos la CBM, para saber si el antibiótico usado era bacteriostático o bactericida. En el caso de estas dos combinaciones vemos que el efecto es bactericida. El compuesto Resazurina al metabolizarse por las células pasa de un color azul a otro rosáceo, pero en los pocillos donde se inhibió el crecimiento no ha vuelto a crecer microorganismos, manteniéndose el color azul.

Por otro lado, con estas placas podemos ver el perfil que tiene la interacción. En el caso de la sinergia (bacitracina y linezolid) aparece una curva cóncava característica del efecto sinérgico, indicando que donde se juntan ambos compuestos se inhibe el

crecimiento, mientras que en el antagonismo (moxifloxacina y linezolid) aparece una curva convexa indicando que donde se juntan, el microorganismo tiene más crecimiento que donde solo hay un compuesto. Si no hubiese interacción, no aparecería ningún tipo de curva.

El perfil de interacción también se puede obtener con el cálculo de FIC A y B a cada dosis diferente de compuesto A y B. Representamos como varía FIC A respecto FIC B para las 6 combinaciones exitosas obtenidas con la técnica checkerboard:



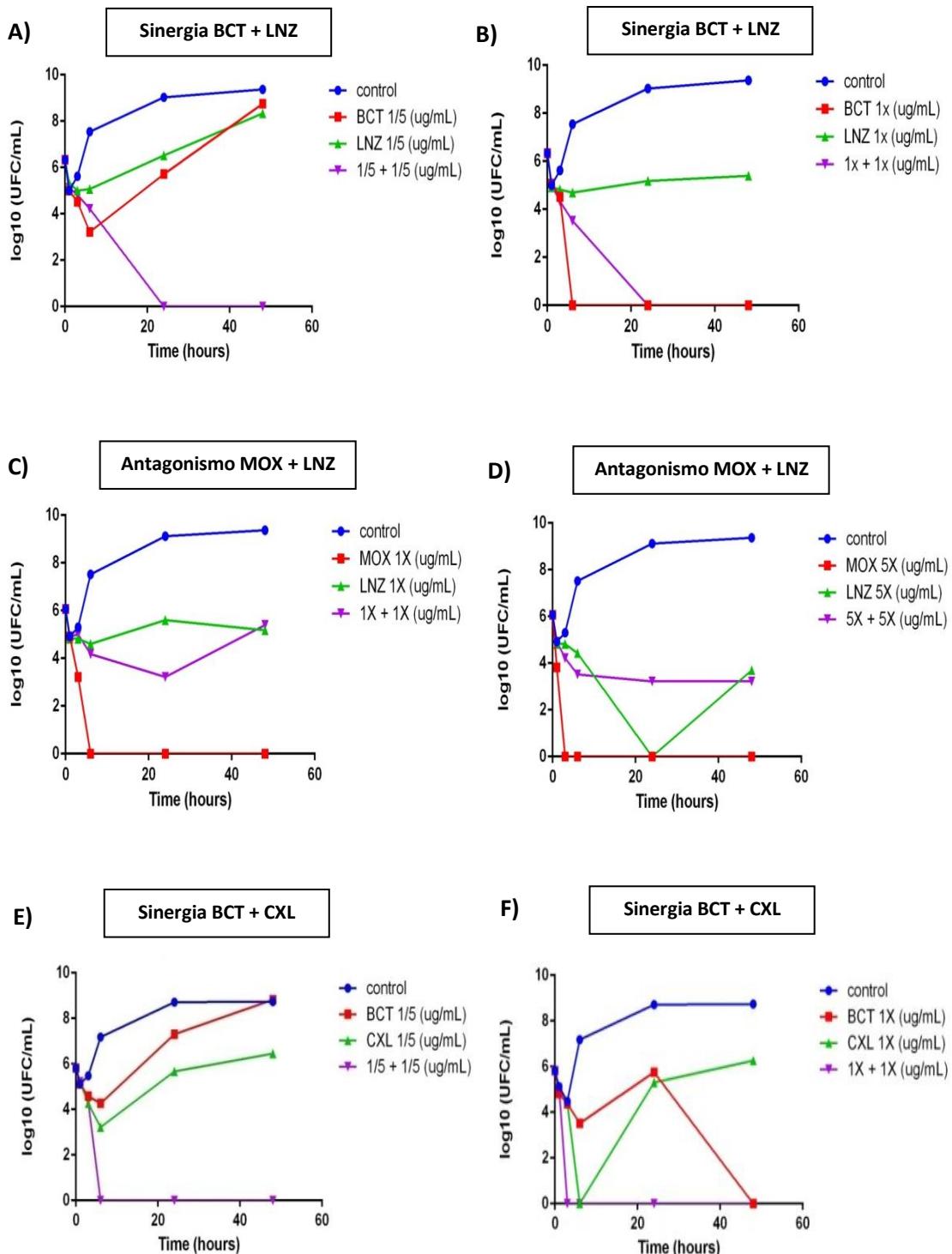
Gráficas 6.A, B, C y D: Representación de los valores FIC del compuesto A (en los ejes X) y del B (en los ejes Y), obtenidos a diferentes dosis. En azul las gráficas de las sinergias (Bacitracina + Linezolid, Minociclina + Cloranfenicol y Bacitracina + Amoxicilina), mientras que en rojo la gráfica del antagonismo (Moxifloxacina + linezolid). Las líneas discontinuas marcan el perfil de no interacción.

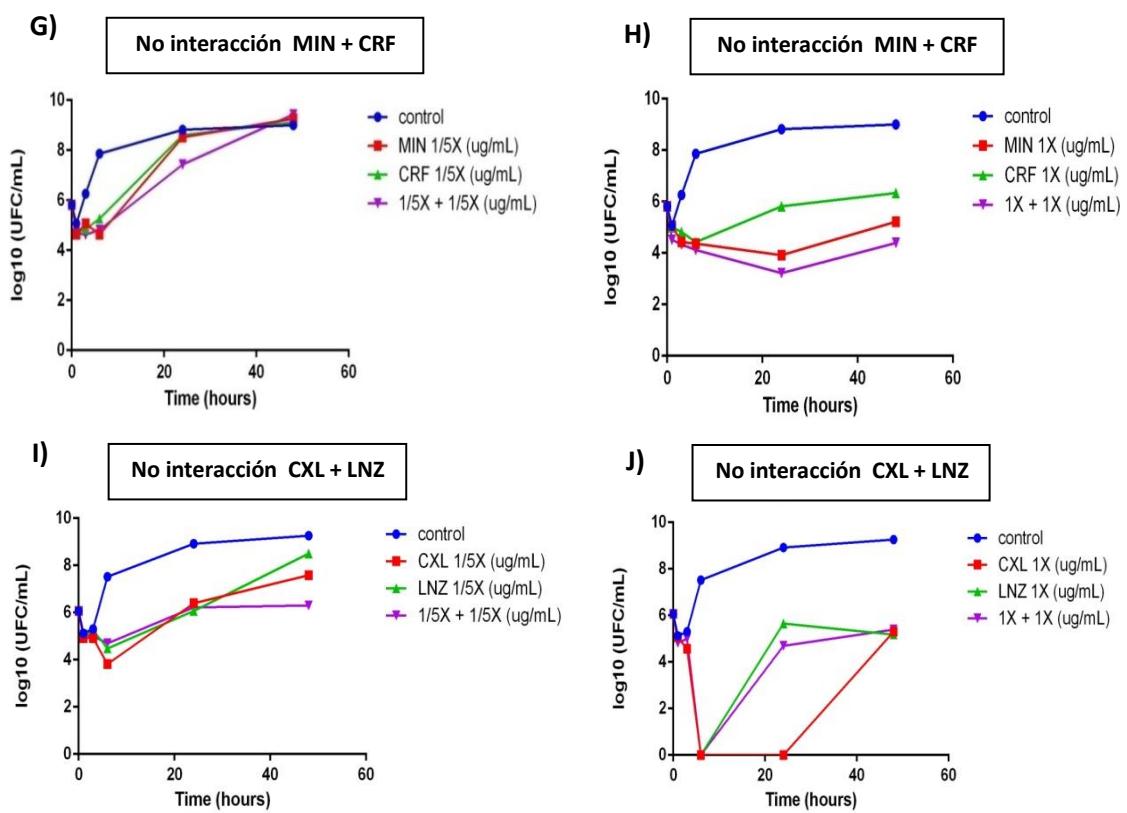
En estas gráficas (junto con las de BCT+CXL y CXL+LNZ), podemos ver el perfil de interacción: en BCT+LNZ (Gráfica 6.A) una clara sinergia donde aparece una curva cóncava muy próxima a los ejes (con poca dosis de ambos compuestos se inhibe el crecimiento). Con BCT+AMX (6.D) obtenemos un perfil sinérgico muy parecido. En cambio, con MIN+CRF (6.C) no es tan fuerte la sinergia, el perfil es casi de “no interacción” con una parte por encima y otra por debajo de la discontinua, aun así continuamos con esta sinergia. Respecto al antagonismo entre MOX+LNZ (6.B) vemos un perfil de curva convexa, sobre pasando la discontinua (con poca dosis de ambos compuestos las bacterias crecen más que con dosis de un solo compuesto), de hecho; por la forma de la curva, sería moxifloxacina quien pierde actividad en presencia de linezolid presentando un gran aumento en su FIC de hasta un valor 4.

4.4- Crecimiento bacteriano en las cinéticas de muerte

Con el \log_{10} de las UFC de cada Flask a diferentes tiempos, construimos las cinéticas de muerte. Para ello representamos el conjunto de valores \log_{10} frente al tiempo, en dos gráficas por cada combinación, una para las concentraciones 1/5 de la CIM (o 5x en el caso del antagonismo) y otra para las concentraciones 1xCIM.

Las siguientes cinéticas de muerte representan el crecimiento bacteriano de nuestra cepa ante 5 de las 6 combinaciones que ensayamos, puesto que bacitracina con amoxicilina tuvo el mismo resultado que bacitracina con cloxacilina:





Gráficas 7.A-J: Representaciones del número de UFC/mL (en logaritmo de base 10) frente al tiempo (en horas) para las combinaciones de antibiótico en concentración 1/5 xCIM (A, C, E, G e I) y 1xCIM (B, D, F, H y J). En azul la curva de crecimiento bacteriano control (sin antibióticos), en verde y rojo las distintas curvas con un solo antibiótico, y en morado la curva de crecimiento ante la combinación de dos antibióticos.

La gráfica para bacitracina con linezolid (8.A) nos verifica la sinergia que habíamos encontrado, ya que juntando 1/5 de sus concentraciones CIM conseguimos inhibir el crecimiento de forma bactericida, mientras que 1/5 por separado no tienen ningún efecto inhibidor. Cuando subimos la concentración a 1xCIM (8.B) la propia bacitracina sola es capaz de inhibir el crecimiento, que sería lo esperado. Por otro lado con la gráfica de moxifloxacina y linezolid (8.D) reafirmamos un efecto antagonismo, donde las concentraciones 5xCIM por separado inhiben el crecimiento pero al juntarlas pierden su actividad. En concreto, linezolid reduce la actividad bactericida de moxifloxacina, haciendo que la combinación tenga efecto bacteriostático. En ésta gráfica linezolid a 5xCIM muestra un rebote de crecimiento, el cual podría deberse a la pérdida del efecto antimicrobiano por su degradación o la expresión de mecanismos de resistencia por la bacteria

Bacitracina con cloxacilina (o amoxicilina; ambos β -lactámicos) también presentan efecto sinérgico (8.E). Ésta combinación ya estaba descrita en la literatura ⁽³²⁾, a pesar de ello, con su estudio hemos podido demostrar experimentalmente que sí ocurre sinergia. Con las otras dos combinaciones; minociclina +cloranfenicol y cloxacilina + linezolid (8.G y 8.I) no se ha podido verificar el efecto sinérgico; con la combinación aparece el mismo crecimiento que si no la hubiese. En MIN+CRF (8.H) incluso subiendo la concentración a 1xCIM sigue sin apreciarse claramente una sinergia. Puede que al pasar el tiempo la minociclina pierda su efecto al tratarse de un antibiótico bacteriostático o la bacteria haya expresado mecanismos de resistencia. Y en CXL+LNZ (8.J) la combinación 1xCIM inhibe el crecimiento, pero esto se debe al propio efecto de LNZ, ya que por sí solo (curva verde) presenta el mismo perfil.

5- Discusión

El uso de mono-terapias antibióticas ha llevado a lo largo de los años a la aparición de múltiples resistencias contra diversos microorganismos, entre ellas la resistencia a meticilina en *S. aureus* (la cepa MRSA). Como la búsqueda de nuevos compuestos antimicrobianos es una tarea larga y costosa, una de las alternativas terapéuticas que se plantea es el uso de terapias de combinación.

Hemos ensayado 16 antibióticos aprobados en la clínica, buscando la existencia de interacciones sinérgicas entre 128 combinaciones posibles contra una cepa de *S. aureus* sensible a meticilina (MSSA). Se realizó primero un cribado que identificó 17 combinaciones prometedoras, de las cuales finalmente se validaron 5 sinergias y un antagonismo mediante ensayos de cinéticas de muerte.

De estas interacciones hallamos tres grupos de interés: Bacitracina + β -lactámicos (cloxacilina y amoxicilina), bacitracina + linezolid y moxifloxacina + linezolid.

La existencia de interacción entre bacitracina y β -lactámicos ya estaba descrita. ⁽³²⁾ Debido a la importancia de los β -lactámicos por su amplio uso en múltiples terapias, encontrar una sinergia supone un gran éxito, ya que los tratamientos convencionales que han perdido eficacia ante las resistencias podrían potenciarse de nuevo introduciendo un 2º compuesto. La simple adición de bacitracina creando una terapia combinada sería una solución simple y sobre todo rápida a infecciones por MRSA.

La identificación de esta interacción en nuestro estudio nos aportó un control interno de la metodología seguida en todo momento. Al obtener en las cinéticas de muerte un resultado positivo para ambos β -lactámicos usados (cloxacilina y amoxicilina), podemos validar nuestro estudio como correcto.

Sabemos que la adquisición de resistencias puede ocurrir por múltiples razones. Entre los **mecanismos moleculares involucrados** en la resistencia encontramos: Minimizar la concentración antibiótica intra-celular (disminuyendo la permeabilidad de la membrana o aumentando el flujo de salida del antibiótico por medio de bombas de eflujo) ⁽³³⁾, mutar el sitio de unión de la diana para protegerla o inactivar el antibiótico (por medio de hidrólisis enzimática de proteasas como la β -lactamasa, o con la transferencia de grupos químicos inactivantes). ⁽³⁴⁾ También se ha visto que la transferencia horizontal de determinados genes puede proporcionar muchas de las resistencias actualmente conocidas, como la de MRSA, que se debe a la adquisición de un plásmido con el gen *mecA*, el cual codifica para una proteína que disminuye la acción de β -lactámicos, permitiendo la correcta síntesis de la pared celular. ⁽³⁵⁾

Atendiendo a éstos mecanismos de resistencia podemos plantear las posibles razones por las que nuestras interacciones pueden ser más eficaces inhibiendo el crecimiento bacteriano. La bacitracina tiene como mecanismo de acción la lisis celular debido al daño que ejercen sobre la membrana plasmática. Una razón por la que bacitracina muestra varias interacciones con otros compuestos puede ser porque aumentan la permeabilidad celular permitiendo, al dañar la membrana, que otros antibióticos accedan al interior de la bacteria donde ejercen su acción, como es el caso de linezolid, que actúa contra la subunidad 50S del ribosoma. Al presentar

linezolid en monoterapia, éste puede que no consiga inhibir al ribosoma ya que las bacterias lo expulsan por bombas eflujo, o directamente que no permitan su entrada a la célula, pero que al presentarse en terapia combinada, sí consigue llegar hasta el ribosoma debido al incremento de permeabilidad.

Cuando juntamos bacitracina con cloxacilina o amoxilicina (β -lactámicos), según el mecanismo de acción de ambos compuestos, la bacteria se quedaría sin ningún tipo de barrera física. La bacitracina dañará la membrana, y los β -lactámicos impedirán la síntesis de la pared celular, de modo que al combinarlos en terapia las células quedarían desprotegidas del medio externo, causando la muerte prematura.

En cuanto al antagonismo entre moxifloxacina y linezolid no se ha podido llegar a una explicación coherente de dicho efecto. moxifloxacina inhibe la topoisomerasa impidiendo la replicación del DNA, y linezolid impide la iniciación de la traducción proteica. Tales mecanismos no presentan ninguna relación que explique por qué linezolid redujo la actividad bactericida de moxifloxacina en nuestro estudio, luego serían necesarios nuevos ensayos que caractericen a nivel molecular lo que ocurre.

Respecto a la interacción entre minociclina y cloranfenicol, no pudimos validarla como efecto sinérgico según nuestros resultados de cinéticas de muerte, pero si atendemos a sus mecanismos de acción vemos que estos son complementarios. Minociclina inhibe la subunidad 30S del ribosoma, mientras que cloranfenicol la 50S, bloqueando totalmente el ribosoma de las bacterias. Sería conveniente repetir los experimentos con ésta combinación para ver si los resultados obtenidos son reproducibles, ya que las técnicas de cribado utilizadas pueden tener diferentes métodos de interpretación matemática (en nuestro caso la expresión FICI), llegando a discriminar combinaciones que en realidad tenían interacción.

Como perspectivas futuras, para que este estudio tenga una verdadera relevancia clínica, deberían probarse las interacciones encontradas contra cepas MRSA o VISA, ya que es en éstas en las que hay que superar el obstáculo de la resistencia. También sería interesante expandir el ensayo contra un mayor número posible de cepas clínicas además de *S. aureus*. Ésta cepa es un buen modelo de estudio pero existen otras especies de interés clínico en las que se puede usar estas mismas estrategias.

Un aspecto a tener en cuenta es que estos experimentos de búsqueda y validación realizados son todos *in vitro*, por lo que el siguiente paso que debería hacerse es probar una terapia combinada de las sinergias en modelos animales. Es importante que la combinación de antibióticos que administramos llegue hasta el sitio de acción en la cantidad que queremos y al mismo tiempo para que la sinergia sea eficaz, pero sin superar las dosis tóxicas. Por eso deben probarse las interacciones *in vivo*, donde va a influir la farmacodinamia y farmacocinética. ⁽²⁸⁾

Todos estos estudios de combinatoria ayudarían a solucionar los crecientes problemas de resistencias antibióticas actuales. Teniendo en cuenta que los compuestos que hemos usado están disponibles a día de hoy para su uso en clínica, aprobar el tratamiento de una interacción sinérgica sería relativamente fácil y rápido, acortando el tiempo requerido para tratar las infecciones por bacterias resistentes.

6- Conclusiones

1. El efecto sinérgico encontrado entre bacitracina y linezolid fue nuestro descubrimiento principal. Esta interacción tiene efecto bactericida contra *S. aureus* a concentraciones incluso cinco veces menor que la necesaria para inhibir el crecimiento usando mono-terapia de bacitracina.
2. La identificación del efecto sinérgico entre bacitracina y β -lactámicos refuerza la teoría ya descrita para dicha interacción, y además sirve de control interno de la metodología llevada a cabo en el estudio.
3. También se pueden encontrar efectos antagónicos como el de moxifloxacina y linezolid. Al combinarse se pierde el efecto bactericida de moxifloxacina y se adquiere un efecto bacteriostático, permitiendo la supervivencia del cultivo. Esta asociación no sería recomendable para el tratamiento de infecciones.
4. La metodología llevada a cabo en los checkerboards debe ser siempre validada por medio de cinéticas de muerte para verificar las interacciones encontradas.
5. Es necesario probar las sinergias encontradas en cepas resistentes para comprobar si aportan una verdadera relevancia clínica como tratamiento combinado.

6- Conclusions

1. The synergistic effect found between bacitracin and linezolid was our main discovery. This interaction has a bactericidal effect against *S. aureus*, even with five times less concentration than the necessary to inhibit the growth with bacitracin mono-therapy.
2. The identification of synergistic effect between bacitracina and β -lactams reinforces the theory already described for this interaction. Also this synergy is used like an internal control of the methodology carried out in the study.
3. Antagonistic effects such as moxifloxacine and linezolid can also be found. When they are combined, the bactericidal effect of moxifloxacine was lost and a bacteriostatic effect is acquired, allowing the survival of the culture. This association is not recommended for the treatment of infections.
4. The methodology carried out in the checkerboards must be always validated through kill-kinetic tests to verify the interactions that we have found.
5. It is necessary to test the synergies that we have found in resistant strains to verify if a true clinical relevance can be obtained as a combined treatment.

7- Bibliografía

- 1) Lowy, F. (1998). *Staphylococcus aureus* Infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), pp.520-532.
- 2) Thomer, L., Schneewind, O. and Missiakas, D. (2016). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Bloodstream Infections. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 11(1), pp.343-364.
- 3) Alonzo, F. and Torres, V. (2013). *Staphylococcus aureus* and CCR5: unveiling commonalities in host-pathogen interactions and potential treatment strategies. *Future Microbiology*, 8(4), pp.425-428.
- 4) Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsin, B. and Torres, V. (2017). *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments. *Pathogens and Disease*, p.ftx005.
- 5) Richter E. Phosphoproteomic characterization of *Staphylococcus aureus*-induced host signaling. Greifswald; 2016.
- 6) Plata K, E. Rosato A, Węgrzyn G. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. Virginia Commonwealth University, Richmond, USA; 2009.
- 7) Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T. and Fowler, V. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp.603-661.
- 8) Clardy, Jon, et al. "The Natural History of Antibiotics." *Current Biology*, vol. 19, no. 11, 2009.
- 9) Loefflert, A. (1999). Control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in an intensive care unit in Germany. *Weekly releases (1997–2007)*, 3(29).
- 10) Maseda, Emilio. "Guidelines for Antimicrobial Treatment of the Infection by *Staphylococcus Aureus*." *Academia.edu*, J. Mensa, et al. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26 (Suppl.1): 1-84.
- 11) Vancomycin continues to dominate treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections,. (2011). *Pharmaco Economics & Outcomes News*, &NA;(630), p.15.
- 12) Karmi, M. (2013). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in poultry meat in Qena, Egypt. *Veterinary World*, 6(10), pp.711-715.
- 13) Kabra, V, et al. "In Vitro Activity of Ceftaroline against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates." *Indian Journal of Medical Microbiology*, vol.33, no.3, 2015, p.464.
- 14) Ängeby, K., Juréen, P., Kahlmeter, G., Hoffner, S. and Schön, T. (2012). Challenging a dogma: antimicrobial susceptibility testing break points for *Mycobacterium tuberculosis*. *Bulletin of the World Health Organization*, 90(9), pp.693-698.
- 15) Prestinaci, Francesca, et al. "Antimicrobial Resistance: a Global Multifaceted Phenomenon. " *Phatogens ans Global Health*, vol. 109, no. 7,2015, pp. 309-318.
- 16) Davies, J., and D. Davies. "Origins and Evolution of Antibiotic Resistance." *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 74, no. 3, 2010, pp. 417-433.
- 17) Senok A, Botta G, Soge O. Emergence and Spread of Antimicrobial-Resistant Pathogens in an Era of Globalization. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012;2012: 1-3.
- 18) Ghahremani, Maryam, et al. "Emergence of Vancomycin-intermediate and Resistant *Staphylococcus aureus* among Methicillin-Resistant *S.aureus* isolated from Clinical Specimens in the Northwest of Iran." *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, vol. 14, 2018, pp.4-9.

- 19)** Orgensen, James Å H., and Mary Å Jane Ferraro. "Antimicrobial Susceptibility Testing: A review of General Principles and Contemporary Practices." *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 11, 2009, pp. 1749-1755.
- 20)** Perez R, Zendo T, Sonomoto K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(Suppl 1):S3.
- 21)** Merzoug, Amina, et al. "Virtual Screening Approach of Bacterial Peptide Defomylase Inhibitors Results in New Antibiotics." *Molecular Informatics*, vol. 37, no. 3, 2017, p. 1200087.
- 22)** Fda.gov.(2018). *Novel Drug Approvals for 2018*. [online] Available at: <https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/htm> [Accessed 18Jun2018].
- 23)** Willyard, Cassandra. "When Drugs Unintentionally Affect Gut Bugs." *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 17, no. 6, 2018, pp. 383-384.
- 24)** Vuong, C., Yeh, A., Cheung, G. and Otto, M. (2015). Investigational drugs to treat methicillin-resistant *S. aureus*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 25(1), pp.73-93.
- 25)** Bartash, R. and Nori, P. (2017). Beta-lactam combination therapy for the treatment of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species bacteremia: A summary and appraisal of the evidence. *International Journal of Infectious Diseases*, 63, pp.7-12.
- 26)** Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(11):1749-1755.
- 27)** Jenkins S, Schuetz A. Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012;87(3):290-308.
- 28)** Nielsen E, Cars O, Friberg L. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic (PK/PD) Indices of Antibiotics Predicted by a Semimechanistic PKPD Model: a Step toward Model-Based Dose Optimization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(10):4619-4630.
- 29)** Cokol, M., Kuru, N., Bicak, E., Larkins-Ford, J. and Aldridge, B. (2017). Efficient measurement and factorization of high-order drug interactions in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science Advances*, 3(10), p.e1701881.
- 30)** Odds F. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(1):1-1.
- 31)** Leclercq R, Cantón R, Brown D, Giske C, Heisig P, MacGowan A et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(2)
- 32)** Worthington R, Melander C. Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *The Journal of Organic Chemistry*. 2013;78(9):4207-4213.
- 33)** Tran, Q., Williams, S., Farid, R., Erdemli, G. and Pearlstein, R. (2012). The translocation kinetics of antibiotics through porin OmpC: Insights from structure-based solvation mapping using WaterMap. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 81(2), pp.291-299.
- 34)** Voulgari E, Poulou A, Koumaki V, Tsakris A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back?. *Future Microbiology*. 2013;8(1):27-39.
- 35)** Fishovitz, J., Hermoso, J., Chang, M. and Mabashery, S. (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*, 66(8), pp.572-577.
- 36)** Ramón-García S, González del Río R, Villarejo A, Sweet G, Barros D et al. Repurposing clinically approved cephalosporins for tuberculosis therapy. *Scientific Reports*. 2016;1-6.
- 37)** Haynes M, Garcia M, Peters R, Waller A, Ursu O et al. High-Throughput Flow Cytometry Screening of Multidrug Efflux Systems. *Methods in Molecular Biology*. 2017;:293-318

ANEXOS

Anexo I

ABX	Nombre	Familia	Disolvente	Mecanismo de acción molecular
MIN	Minociclina	Tetraciclina	DMSO	Impide la síntesis proteica al inhibir la subunidad 30S del ribosoma
AMK	Amikacina	Aminoglicósido	H2O	Impide la síntesis proteica al inhibir las dos subunidades 30S y 50S del ribosoma
STR	Estreptomicina	Aminoglicósido	H2O	Impide la síntesis proteica al inhibir la subunidad 30S del ribosoma
RIF	Rifampicina	Rifamicina	DMSO	Inhibe la síntesis del RNAm uniéndose a la subunidad beta del RNAPol
CRF	Cloranfenicol	Fenicol	Etanol	Impide la síntesis proteica al inhibir la subunidad 50S del ribosoma
VCM	Vancomicina	Glicopéptido	DMSO	Inhibe la síntesis del peptido glicano de la pared celular (elongación)
MER	Meropenem	Beta-lactámico	DMSO	Inhibe la síntesis del peptido glicano de la pared celular
TET	Tetraciclina	Tetraciclina	H2O	Impide la síntesis proteica al inhibir la subunidad 30S del ribosoma
MOX	Moxifloxacina	Quinolonas	DMSO	Inhibe la replicación del DNA, ataca a la topoisomerasa
BCT	Bacitracina	Péptido de síntesis no ribosomal	Etanol	Contra la membrana plasmática
AMX	Amoxicilina	Beta-lactámico	H2O	Inhibe la síntesis del peptido glicano de la pared celular
CXL	Cloxacilina	Beta-lactámico	H2O	Inhibe la síntesis del peptido glicano de la pared celular
ECZ	Econazol	Azoles	DMSO	Contra el citocromo P450
TMT	Trimetoprim	Diaminopirimidina	DMSO	Contra el ácido fólico
LNZ	Linezolid	Oxazolidinona	DMSO	Impide la síntesis proteica al inhibir la subunidad 50S del ribosoma
GEN	Gentamicina	Aminoglicósido	H2O	Impide la síntesis proteica al inhibir la subunidad 30S del ribosoma

Tabla 1: Listado de los 16 antibióticos usados en la búsqueda de sinergias antibióticas en el que se especifica las abreviaturas usadas en los marcas, así como el nombre, familia y mecanismo de acción de cada uno de ellos.

Anexo II

Componente	Concentración por cada litro de LB preparado
Triptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
Agar (en caso de LB sólido)	17 g/L

Tabla 2: Componentes y sus concentraciones para la preparación llevada a cabo de 1 litro de medio LB.

Anexo III

Compuesto B	CIM (µg/mL) sin Minociclina	CIM (µg/mL) con 1/8 de Minociclina	CIM (µg/mL) con 1/4 de Minociclina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	0,5	0,5	2	2
AMK	2,5	2,5	0,5625	1	4,4
STR	50	50	25	1	2
RIF	0,0062	0,0031	0,00078	2	8
CRF	16	4	2	4	8
VCM	1,25	5	1,25	0,25	1
MER	0,748	0,374	0,374	2	2
TET	4	4	2	1	2

Compuesto B	CIM (µg/mL) sin Estreptomic.	CIM (µg/mL) con 1/8 de Estreptomic.	CIM (µg/mL) con 1/4 de Estreptomic.	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	1	1	1	1
AMK	2,5	2,5	1,25	1	2
STR	50	50	25	1	2
RIF	0,00625	0,00625	0,00312	1	2
CRF	16	16	16	1	1
VCM	1,25	1,25	1,25	1	1
MER	0,3744	0,3722	1	1	1
TET	2	2	1	1	1

Compuesto B	CIM (µg/mL) sin Amikacina	CIM (µg/mL) con 1/8 de Amikacina	CIM (µg/mL) con 1/4 de Amikacina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	1	1	1	1
AMK	2,5	1,25	2,5	2	1
STR	50	50	50	1	1
RIF	0,00625	0,00625	0,00625	1	1
CRF	16	16	16	1	1
VCM	1,25	1,25	1,25	1	1
MER	0,374	0,374	0,374	1	1
TET	2	2	2	1	1

Compuesto B	CIM (µg/mL) sin Rifampicina	CIM (µg/mL) con 1/8 de Rifampicina	CIM (µg/mL) con 1/4 de Rifampicina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	1	1	1	1
AMK	2,5	2,5	2,5	1	1
STR	50	50	25	1	2
RIF	0,00625	0,00625	0,00312	1	2
CRF	16	16	4	1	4
VCM	1,25	1,25	1,25	1	1
MER	0,374	0,372	0,372	1	1
TET	2	2	2	1	1

Compuesto B	CIM (µg/mL) sin Vancomicina	CIM (µg/mL) con 1/8 de Vancomicina	CIM (µg/mL) con 1/4 de Vancomicina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	0,5	0,5	2	2
AMK	2,5	1,25	2,5	2	1
STR	50	50	50	1	1
RIF	0,00625	0,00625	0,00625	1	1
CRF	16	16	16	1	1
VCM	1,25	5	1,25	0,25	1
MER	0,374	0,372	0,372	1	1
TET	2	2	2	1	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Meropenem	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Meropenem	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Meropenem	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	1	0,5	1	2
AMK	2,5	2,5	2,5	1	1
STR	50	50	50	1	1
RIF	0,00625	0,0125	0,00625	0,5	1
CRF	16	16	16	1	1
VCM	1,25	1,25	1,25	1	1
MER	0,374	0,372	0,372	1	1
TET	2	2	2	1	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Tetraciclina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Tetraciclina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Tetraciclina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MIN	1	1	0,5	1	2
AMK	2,5	2,5	2,5	1	1
STR	50	50	50	1	1
RIF	0,00625	0,00625	0,00625	1	1
CRF	16	16	16	1	1
VCM	1,25	1,25	1,25	1	1
MER	0,374	0,372	0,372	1	1
TET	2	2	2	1	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Moxiflo.	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Moxiflo.	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Moxiflo.	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,046	0,023	0,023	2	2
BCT	32	32	32	1	1
AMX	1	1	1	1	1
CXL	0,1562	0,0781	0,0781	2	2
ECZ	5	2,5	2,5	2	2
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	2,5	2,5	1	1
GEN	0,625	0,625	0,3125	1	2

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Bacitracina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Bacitracina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Bacitracina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,046	0,046	0,023	1	2
BCT	32	32	32	1	1
AMX	1	0,5	0,25	2	4
CXL	0,1562	0,1562	0,0781	1	2
ECZ	5	2,5	1,25	2	4
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	1,25	0,625	2	4
GEN	0,625	0,625	0,3125	1	2

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Amoxicilina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Amoxicilina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Amoxicilina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,046	0,046	0,023	1	2
BCT	32	32	16	1	2
AMX	1	1	1	1	1
CXL	0,1562	0,1562	0,1562	1	1
ECZ	5	2,5	2,5	2	2
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	1,25	0,625	2	2
GEN	0,625	0,3125	0,3125	2	2

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Cloxacilina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Cloxacilina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Cloxacilina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,046	0,046	0,0058	1	8
BCT	32	16	8	2	4
AMX	1	1	0,5	1	2
CXL	0,1562	0,0781	0,0781	2	2
ECZ	5	2,5	2,5	2	2
TMT	80	80	5	1	16
LNZ	2,5	1,25	0,625	2	4
GEN	0,625	0,312	0,625	2	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Econazol	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Econazol	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Econazol	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,0468	0,0468	0,0468	1	1
BCT	32	32	16	1	2
AMX	1	0,5	0,25	1	2
CXL	0,1562	0,1562	0,3124	1	0,5
ECZ	5	2,5	1	2	2
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	2,5	2,5	1	1
GEN	0,625	0,625	0,625	1	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Trimetoprim	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Trimetoprim	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Trimetoprim	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,0468	0,0468	0,0468	1	1
BCT	32	32	32	1	1
AMX	1	1	1	1	1
CXL	0,1562	0,1562	0,1562	1	1
ECZ	5	5	5	1	1
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	2,5	2,5	1	1
GEN	0,625	0,625	0,625	1	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Linezolid	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Linezolid	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Linezolid	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,0468	0,0468	0,1875	1	0,25
BCT	32	16	16	2	2
AMX	1	1	1	1	1
CXL	0,1562	0,3124	0,1562	0,5	1
ECZ	5	5	1	1	1
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	1,25	0,625	2	2
GEN	0,625	0,625	0,625	1	1

Compuesto B	CIM ($\mu\text{g/mL}$) sin Gentamicina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/8 de Gentamicina	CIM ($\mu\text{g/mL}$) con 1/4 de Gentamicina	Diferencia con 1/8	Diferencia con 1/4
MOX	0,0468	0,0468	0,0234	1	2
BCT	32	32	16	1	2
AMX	1	1	0,5	1	2
CXL	0,1562	0,0781	0,1562	2	1
ECZ	5	5	5	1	1
TMT	80	80	80	1	1
LNZ	2,5	2,5	2,5	1	1
GEN	0,625	0,625	0,625	1	1

Tabla 3: Valores de las CIM obtenidas para todas las combinaciones ensayadas. Se compara la CIM obtenida cuando el compuesto B está solo frente a la obtenida al añadir concentraciones 1/4 y 1/8 de la CIM de compuesto A. En amarillo aparecen subrayadas las variaciones (reducción o aumento) de CIM de más de 4 unidades. En verde las 4 combinaciones que a pesar de no reducir 4 veces la CIM, nos pareció interesante seguir estudiándolas.

Anexo IV

Compuesto A	Compuesto B	CIM A	CIM B	CIM A / B	CIM B / A	FIC A	FIC B	FICI	Tipo de interacción
BCT	LNZ	64	2,5	8	0,3125	0,125	0,125	0,25	Sy
CXL	LNZ	0,312	2,5	0,0781	0,312	0,25	0,124	0,374	Sy
CXL	BCT	0,156	64	0,039	8	0,25	0,125	0,375	Sy
BCT	AMX	64	0,5	16	0,125	0,25	0,25	0,5	Sy
MIN	CRF	1	16	0,062	8	0,062	0,5	0,562	Sy
CRF	RIF	8	0,0031	4	0,00078	0,5	0,248	0,748	Ni
MIN	RIF	2	0,012	1	0,0031	0,5	0,25	0,75	Ni
BCT	ECZ	64	5	32	1,25	0,5	0,25	0,75	Ni
CXL	MOX	0,156	0,011	0,0781	0,0029	0,5	0,263	0,763	Ni
MIN	AMK	2	2,5	1	1,25	0,5	0,5	1	Ni
MER	MIN	0,375	2	0,187	1	0,5	0,5	1	Ni
VCM	CRF	1,25	8	0,625	4	0,5	0,5	1	Ni
MOX	ECZ	0,468	5	0,234	2,5	0,5	0,5	1	Ni
MIN	VCM	2	2,5	0,03125	2,5	0,031	1	1,031	Ni
VCM	STR	1,25	50	0,1562	50	0,125	1	1,125	Ni
MOX	LNZ	0,0468	2,5	0,1874	0,625	4	0,25	4,25	An
CXL	TMT	0,625	ND	0,3125	1280	0,5	ND	ND	ND

Tabla 4: Cálculo de la CIM y FIC para cada combinación de compuestos, así como el valor FICI y el tipo de interacción asignado por el criterio establecido. Las combinaciones, ordenadas por su valor FICI, pueden tener efecto sinérgico (Sy, en verde), efecto antagónico (An, en rojo) o no presentar interacción (Ni, en amarillo).