



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* L. “arándano” y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

Espinoza Sánchez Luis Fernando (ORCID: 0000-0003-3373-6180)

ASESORES:

MJ. Fernández Sosaya José Luis (ORCID: 0000-0002-8232-6367)

Dra. Llaque Sánchez María Rocío del Pilar (ORCID: 0000-0002-6764-4068)

Dra. Yupari Azabache Irma Luz (ORCID: 0000-0002-0030-0172)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

TRUJILLO – PERÚ

2020

DEDICATORIA

A Dios, por haber sido motor de todos los éxitos cosechados a lo largo de toda mi formación.

A mi madre, por su amor, apoyo incondicional y por ser mi más grande motivación.

A mi padre, por compartir conmigo su sabiduría y entendimiento.

A mi hermano, por haber sido aquella amistad infaltable y por siempre inspirarme a dar lo mejor de mí.

A mis docentes, amigos y familia: Este logro es nuestro, y será el primero de muchos por venir.

Espinoza Sánchez, Luis Fernando.

AGRADECIMIENTO

A mis asesores, gracias por haber sido guías y partícipes de esta recta final en el camino de mi formación profesional, por su tiempo, paciencia y dedicación. Sin ustedes, esto no habría sido posible.

A mi alma máter y a todos mis docentes, gracias por estos siete años de aprendizaje, y por haber compartido conmigo la pasión por esta ciencia.

Espinoza Sánchez, Luis Fernando.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Carátula	i
Dedicatoria	ii
Agradecimiento	iii
Índice de contenidos	iv
Índice de tablas	v
Índice de figuras	v
Resumen	vi
Abstract	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
III. METODOLOGÍA	10
3.1 Tipo y diseño de investigación	10
3.2 Variables y operacionalización de variables	10
3.3 Población y muestra	10
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	11
3.5 Procedimientos	12
3.6 Métodos de análisis de datos	12
3.7 Aspectos éticos	13
IV. RESULTADOS	14
V. DISCUSIÓN	17
VI. CONCLUSIONES	20
VII. RECOMENDACIONES	21
REFERENCIAS	22
ANEXOS	29

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Valores estadísticos descriptivos de la media del efecto antibacteriano del extracto acuoso de <i>Vaccinium corymbosum</i> I, la Vancomicina y la combinación de ambos, sobre <i>S. Aureus</i> resistente a la meticilina ATCC 4300.	14
Tabla 2. Análisis de varianza de las medias del efecto antibacteriano del extracto acuoso de <i>Vaccinium corymbosum</i> I, la Vancomicina y la combinación de ambos, sobre <i>S. Aureus</i> resistente a la meticilina ATCC 4300.	14
Tabla 3. Comparación de las medias de los halos de inhibición con la prueba de Tukey entre el extracto acuoso de <i>Vaccinium corymbosum</i> I, la Vancomicina y la combinación de ambos, sobre <i>S. Aureus</i> resistente a la meticilina ATCC 4300.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja de los halos de inhibición por grupos de estudio.	16
---	-----------

RESUMEN

En la investigación se evaluó la sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto del *Vaccinium corymbosum* L. al 100% y vancomicina 30 µg, sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 4300, para ello se tuvieron cuatro grupos de estudio (el extracto del fruto, el antibiótico, la combinación de los dos primeros y un control neutro); la sensibilidad bacteriana se midió con el método de Kirby-Bauer. Los resultados demostraron: que la media de los halos de inhibición del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L fue de 15.7mm (DS: ±1.25167), siendo eficaz según lo establecido por el CLSI (≥ 15 mm), para vancomicina 23.9 mm (DS:±0.8756) y la combinación de ambos agentes 24.2 mm (DS:±1.03280). El análisis ANOVA evidenció que existen diferencias significativas en los promedios de los halos de inhibición en los grupos analizados ($p= 0,000$); el Post ANOVA de Tukey probó que el mejor grupo que tuvo efecto antimicrobiano fue la combinación de los dos productos en estudio. Se concluye que la asociación de estos productos, demostró tener efecto sinérgico, sobre *S. Aureus* resistente a la meticilina, superando moderadamente la acción antibacteriana del agente de primera línea frente al SARM.

Palabras clave: *Vaccinium corymbosum* L, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, vancomicina.

ABSTRACT

This research assessed the antimicrobial synergy between the aqueous fruit extract of *Vaccinium corymbosum* L. at 100% and vancomycin 30 µg, on Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 4300, for this purpose, four study groups were considered (the fruit extract, the antibiotic, the combination of these, and a neutral control); the bacterial sensitivity was measured with Kirby-Bauer method. The results showed that the inhibition zones measure of the aqueous extract of *Vaccinium corymbosum* L. was 15.7 mm (SD: ±1.25167), being considered effective as established by CLSI (≥ 15 mm), for vancomycin 23.9 mm (SD:±0.8756) and the combination of both agents 24.2 mm (SD:±1.03280). The ANOVA test showed that there are significant differences in the averages of the inhibition zones in the groups analyzed ($p= 0.000$); the ANOVA Post Hoc Tukey test proved that the best group that had an antimicrobial effect was the combination of the two products under study. It is concluded that the association of these products was demonstrated to have synergistic effect on *S. Aureus* resistant to methicillin, moderately exceeding the antibacterial action of the first-line agent against MRSA.

Keywords: *Vaccinium corymbosum* L., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin.

I. INTRODUCCIÓN

Las patologías infecciosas, representan en la actualidad, una de las principales problemáticas, en cuanto a morbilidad y mortalidad a escala global, especialmente en el continente sudamericano. Por ende, una terapéutica adecuada de estas enfermedades, ceñirá un impacto positivo en los índices de salud de nuestro país. Actualmente, uno de los mayores problemas con los que lidiamos en el sector salud, es la emergente resistencia, de una gran variedad de patógenos, hacia los antibióticos convencionales.¹

Staphylococcus aureus, principal agente relacionado a infecciones cutáneas y un agente protagonista en demás patologías infecciosas multiorgánicas y cuadros sépticos fulminantes. Sin embargo, no es un patógeno fácil de tratar. En los últimos años, la terapéutica de estas infecciones se ve dificultada, por su cualidad de desarrollar resistencia frente a los antimicrobianos usualmente sensibles al mismo. A inicios del siglo XXI, se reportó en Europa la aparición de una variante resistente a la metilina (MRSA), el cual se extendió por todos los continentes, constituyendo actualmente, un grave problema para la salud pública, dada su alta tasa de presentación en infecciones nosocomiales. Varios estudios en nuestro país, demuestran una alta prevalencia de MRSA, principalmente en el medio hospitalario, definido como uno de los más frecuentes agentes relacionados a infecciones asociadas a la atención en los servicios de salud, de los últimos años. Se evidencia con el estudio multicéntrico desarrollado en 6 hospitales en Lima metropolitana, una prevalencia de 63,3% de cepas de MRSA en infecciones intrahospitalarias de todo tipo.^{2, 3}

Dada la presente problemática, el sector salud, se encuentra obligado a buscar nuevas alternativas para el tratamiento de estos agentes, así como al desarrollo de nuevos fármacos y a la búsqueda de terapias alternativas o complementarias, naturales, que puedan apoyar a vislumbrar una salida a este escenario, aún más en un país como el nuestro, que cuenta con gran y variopinta cantidad de plantas medicinales.³

Se planteó como problema de investigación: ¿Existe sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto del *Vaccinium corymbosum* l al 100% y Vancomicina 30 µg, sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC4300?

La justificación fue la siguiente: La incidencia de enfermedades infecciosas ha tenido un notorio aumento en la última década; hecho por el cual, se han ido implementando nuevos fármacos antimicrobianos y terapias alternativas para combatir las mismas.³ El uso irracional de medicamentos, así como la misma evolución resistente de los agentes, dificultan esta finalidad. La notoria problemática ya establecida de las resistencias bacterianas, obliga a la búsqueda exhaustiva de nuevas soluciones, que podrían hallarse en alternativas naturales que ya han venido siendo estudiadas en la última década. Los arándanos, por ejemplo, y el zumo de estos, ha sido estudiado ampliamente como una de las más vistosas alternativas para hacer frente a múltiples agentes, incluido en *S. aureus*.^{1, 2, 3, 4} Sin embargo, el terreno abordado en cuanto a investigación de su uso en cepas meticilino resistentes, es aún escaso y dado que lo que se busca dar, es una solución plausible a esta problemática tan notoria, nacida de la resistencia bacteriana, surge la necesidad de implementar un estudio que comprenda cepas resistentes del mismo.

El objetivo general fue: Evaluar la sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto del *Vaccinium corymbosum* l. al 100% y vancomicina 30 µg, sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 4300, estudio in vitro.

Los objetivos específicos fueron: Estimar la efectividad del extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* l, a dilución de 100%. Establecer la acción de la vancomicina, sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. Determinar el efecto antibacteriano de la combinación de ambos tratamientos.

Las hipótesis planteadas fueron: H1: Existe sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto del *Vaccinium corymbosum* l. al 100% y vancomicina 30 µg, sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 4300.

H0: No existe sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto del *Vaccinium corymbosum*. al 100% y vancomicina 30 µg, sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente ATCC 4300.

II. MARCO TEÓRICO

Risco⁴ (España, 2010), estudiaron los efectos del *Vaccinium corymbosum*, sobre la *Escherichia coli*, utilizando ratas Wistar. Hallaron en la orina de las ratas que habían ingerido arándano azul, una notoria inhibición del 83% y 52%, del crecimiento y la adherencia de *Escherichia coli*, El arándano azul, usado en las presentaciones de polvillo y comprimidos, mostró inhibición del crecimiento bacteriano a todas las variedades de concentraciones que fueron ensayadas. Se encontró, que en las cantidades de 5 hasta 75 miligramos por mililitro, el crecimiento se redujo en un 25%, 36% y 34%.

Pervin⁵ (Korea, 2013), demostraron la efectividad de la capacidad antimicrobiana del *Vaccinium corymbosum* I, in vitro, sobre la *Salmonella typhimurium*, siendo el resultado, un halo inhibitorio de 23.18 milímetros y sobre *Enterococcus faecalis*, de 14.08 mm, respectivamente. Concluyendo con haber encontrado una importante alternativa en el uso de esta planta, frente a la creciente farmacorresistencia.

Shen⁶ (China, 2014) evaluaron la eficacia bactericida, del extracto del arándano azul, en patógenos como: *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Los resultados del estudio determinaron la dosis inhibitoria mínima. Las concentraciones a 112,5-900 mg/ml evidenciaron una potencia inhibitoria dosis dependiente, del crecimiento de las bacterias mencionadas anteriormente. Se demostró que los compuestos fenólicos de los extractos de *Vaccinium*, le brindaban a este fruto, su capacidad antibacteriana.

Biswas⁷ (Reino unido, 2015), realizaron una investigación acerca de las características antimicrobianas del zumo de arándano azul contra patógenos tales: *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*. Se evidenció que la proliferación de los ya mencionados agentes, se redujo por debajo del nivel de detección (100 cfu / ml) por el jugo de arándanos.

Silva⁸ (Portugal, 2015) evaluaron la capacidad bactericida del arándano azul, sobre *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (MSSA). Para ello, se clasificaron los extractos de esta planta, se midieron las concentraciones inhibitorias y los halos de

inhibición, para denotar el resultado sobre la actividad del patógeno. Los resultados mostraron que la parte de la planta, con mayor potencial antimicrobiana, fue el fruto, que terminó mostrando un efecto bactericida, a una concentración de 50mg/mL, frente a MSSA.

Ángel⁹ (Perú, 2014), demostró que existe mayor inhibición sobre cepas sensibles a metilina de *Staphylococcus aureus*, con extracto de *Vaccinium corymbosum*, alcanzando el mayor nivel inhibitorio con la concentración al 100%.

Sachún¹⁰ (Perú, 2019), realizó un estudio en el que demostró la eficacia antimicrobiana del arándano azul frente a la mupirocina, sobre *S. aureus*, en un estudio in vitro. El resultado más prominente, lo tuvo la dilución del 100%, con un halo medio de 29.2 mm.

Reyes¹¹ (Perú, 2019), trabajó usando extracto de *Vaccinium corymbosum l.* sobre bacterias como *E. coli* y *S. aureus* metilino sensible, demostrando que dicho extracto poseía efecto antimicrobiano en todas las diluciones salvo en la de 25% y teniendo como resultados, notorios efectos inhibidores frente al *S. aureus*, con un halo inhibitorio de 16.5 mm.

Las teorías relacionadas al tema son las siguientes: *Staphylococcus aureus* es el más importante patógeno de su género, es causante de diversas infecciones, tanto adquiridas en la comunidad, como intrahospitalarias. En la actualidad, el interés científico de este patógeno, recae en su elevada frecuencia y en ser representante, en caso de las cepas del mismo resistentes a la metilina, de una de las más importantes causas de brotes de infecciones intrahospitalarias en nuestro país.¹²

Las cepas metilino resistentes (SARM), se identificaron con celeridad tras la introducción de la metilina en los esquemas terapéuticos. Los primeros casos de infección intrahospitalaria, se describieron en Europa entonces, su prevalencia ha ido creciendo de forma exponencial en casi todas las áreas geográficas. En el Perú, las encuestas sobre aislados SARM muestran cómo los casos han ido incrementando, yendo desde un 1,5% en 1986, hasta 18-23% en la actualidad, transformando a numerosas áreas hospitalarias, como las unidades de cuidados

intensivos, en regiones endémicas para este patógeno. En ciertos estudios que fueron realizados en determinados períodos, estas cifras, llegan a elevarse hasta el 40%.¹³

La notoria respuesta adaptativa del *S. aureus*, su maleabilidad a los cambios del medio y su consecuente adquisición de factores de resistencia antimicrobiana, han hecho de este agente, un patógeno común en el ámbito hospitalario, donde genera diversos problemas de multirresistencia. Aunque según la terminología, la resistencia a la meticilina, acoge también a fármacos betalactámicos, los SARM presentan, además, resistencia a múltiples grupos antibióticos. Por medio de diversos mecanismos moleculares, pueden ser capaces de presentar resistencia a macrólidos, lincosamidas, quinolonas, etcétera, reportándose, últimamente en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. Mostrándose, últimamente, ciertos brotes de SARM, únicamente sensibles a glucopéptidos.¹⁴

Se han descrito en la literatura, algunos mecanismos mediante los cuales, el SARM, puede generar resistencia a los betalactámicos, estos son: la producción de betalactamasas, fenómenos de tolerancia y resistencia intrínseca, mediada por PBP (proteínas fijadoras de penicilina). Los grupos de penicilinas, tales como lo son la familia de las isoxazolilpenicilinas (oxacilina, dicloxacilina), y las cefalosporinas, presentan una estructura que las hace resistentes a la acción de las betalactamasas, pero los SARM, han logrado desarrollar, un grupo de mecanismos más complejos, que los hace también resistentes frente a estas familias de antibióticos usualmente eficaces. Este mecanismo de resistencia a la penicilina, se asocia a la presencia de proteínas fijadoras de penicilina (PBP) con nula o poca afinidad por la meticilina y betalactámicos, llamadas PBP2A.¹⁵

Las bases moleculares genéticas de esta nueva PBP, yacen en el gen Mec. Dicho gen, posee locus diferentes, en los que el gen Mec A, codifica la PBP2A y el gen Mec R, tendría una acción reguladora. Los SARM, poseen los marcadores Mec A, a diferencia de los *S. Aureus* sensible a meticilina (SASM).¹⁶

La hiperproducción de betalactamasa o resistencia borderline, ha sido descrita en muchas literaturas como uno de los principales mecanismos por los cuales el *S. aureus*, fomentaría resistencia a numerosos agentes antibióticos. Esta consiste en una producción anómala de la penicilinasa común, pero mediada por plásmidos. Este tipo de cepas, producen cuantiosas cantidades de esta enzima, lo que permite que las penicilinas, resistentes a penicilinasas, que fueron diseñadas para la finalidad de lidiar con la acción hidrolítica, sean degradadas. Esta resistencia, se halla aún más respaldada, por la ausencia de la PBP 2a en la pared celular del SARM. Se considera además, que la acción de resistencia, no se debe solo a la hiperproducción de betalactamasas, sino también, a la adhesión de una nueva betalactamasa, cuyo gen, aún no se ha podido identificar.¹⁷

Otro factor conocido también, de resistencia, es la modificación de PBP, la cual se correlaciona con una modificación escasa de la composición molecular de la PBP1, PBP2 y PBP4, que cuentan con un similar peso molecular, sin embargo, contienen una menor afinidad por los beta lactámicos.¹⁸

Y finalmente, uno de los factores más preeminentes, es el de la denominada resistencia intrínseca a la meticilina, que se debe a la inclusión del Mec A en el genoma de la bacteria. El Mec A, es un segmento de DNA adicional, que posee dos conjuntos proteicos que lo regulan y que motivan su transcripción. Es además, quien motiva la síntesis de la PBP 2^a, que permite el mantenimiento de la pared celular y la continuidad de la replicación celular, aún cuando las PBP habituales son inhibidas por distintos grupos antimicrobianos.¹⁹

S. aureus es poseedor de una gran gama de factores de patogenicidad, entre ellos, destacan una cápside polisacárida, antígenos de pared, enzimas coagulasas, catalasas, estafiloquinasas, betalactamasas y toxinas, como la toxina epidermolítica y la de Pantón Valentine. Además, interactúa con variedad de receptores celulares del hospedero, por medio de estos factores existentes en su superficie.²⁰

Los grupos de pacientes mayormente afectados, aumenta en aquellos sometidos a punciones frecuentes, hospitalizados, con diabetes mellitus insulino dependientes, personas que consumen drogas por vía parenteral y pacientes de hemodiálisis. La infección se produce, entonces, a partir de estas vías de entrada, y desde esta matriz endógena, inicia su proliferación local o generalizada. La morbilidad y mortalidad serán variables a razón del lugar de infección y de la efectividad en la elección terapéutica.^{21, 22}

Se han descrito factores que pueden favorecer la infección intrahospitalaria por SARM, entre ellos están: La permanencia en unidades de cuidados intensivos, la manipulación terapéutica (sondaje, cateterismo, intubación), comorbilidades de base, previo tratamiento antibiótico, procedimiento quirúrgico previo, etcétera. Por lo general, las acciones que resultan más eficaces para evitar y controlar las infecciones por SARM, son las barreras que dificultan o limitan su extensión.²²

El arándano americano y el arándano azul, han demostrado un efecto beneficioso sobre el mantenimiento de la homeostasis de las vías urinarias, dada su amplia cantidad de proantocianidinas, que le confiere una actividad inhibitoria de las adhesinas bacterianas, por lo que se ha corroborado también su efecto sobre ciertos grupos patógenos, entre ellos, el *S. aureus*. La evidencia clínica demuestra que su consumo se relaciona con una disminución de la recurrencia de ITU y también con una probable sinergia de sitio de acción con ciertos grupos antibióticos. Esto puede deberse a su amplia cantidad de componentes bactericidas, como lo son las proantocianidinas A, las antocianinas, los flavonoides, y su amplia cantidad de ácidos, cítricos, málicos, fenólicos, entre otros. Además de ello, poseen una gran cantidad de fructosa y otros azúcares.^{23, 24}

El arándano azul, en particular, es conocido por ser rico en compuestos fenólicos, con distintas capacidades antioxidantes, bactericidas y antiproliferativas. De todos estos metabolitos fenólicos, los más representativos, son las antocianinas (que son pigmentos hidrosolubles, estructuralmente compuestos por una unión alfa o beta de

una antocianidina con una molécula de agua). En efecto, los arándanos azules, exhiben una de las más complejas agrupaciones de antocianinas, habiendo sido aisladas en ellos, cerca de 15 grupos diferentes de las mismas. Además, se han aislado cinco diferentes antocianidinas en estas frutas, como la malvidina, cianidina, delfinidina, y la peonidina. Los arándanos azules, presentan menos niveles de antocianinas que el arándano americano, pero, mientras que estos últimos acumulan mayores cantidades de delfidinas y cianidinas, los arándanos azules, acumulan mayores cantidades de malvidinas. Las malvidinas poseen menos grupos hidroxilo, por ello, son más hidrofóbicas y pueden ser transportadas con mayor facilidad a las células y tejidos, lo que se traduce en mayor biodisponibilidad y consecuentemente, mayor bioactividad.^{25, 26, 27, 28}

Se han estudiado las capacidades de inhibición del biofilm y de la adhesión de patógenos como el SARM, la *E. Coli* y el *Acinetobacter baumannii*, siendo la malvidina, la responsable de patentar una acción tanto bactericida, como bacteriostática. Dentro de todo este grupo de patógenos, el más sensible a la actividad del arándano azul, fue el *S. aureus*.²⁹

III. METODOLOGÍA

3.1. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

Tipo de investigación:

Básica.³⁰

Diseño de investigación: Experimental con múltiples repeticiones, post prueba.³¹
(Anexo 01)

3.2. Variables y operacionalización:

Variable independiente: Agente antibacteriano

- Agente antibacteriano no farmacológico: Extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum l.*
- Agente antibacteriano farmacológico: Vancomicina 30 µg/ml.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano

- Eficacia antibacteriana: Halo de inhibición ≥ 15 mm.
- No eficacia antibacteriana: Halo de inhibición < 15 mm.

Operacionalización de variables: (Anexo 02)

3.3. Población, muestra y muestreo:

Población:

Estuvo constituida por todos los cultivos con cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente del laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

Muestra:

Tamaño muestra:

Con la finalidad de hallar la cantidad necesaria de placas que logren validar la investigación, se aplicó la fórmula de diferencia de dos medias, obteniéndose una muestra de 10 repeticiones por cada grupo.³² (Anexo 03)

Unidad de análisis:

Cada uno de los cultivos de cepas de MRSA.

Unidad de muestra:

Las placas petri con unidades formadoras de colonias de MRSA.

Muestreo:

Probabilístico, aleatorio simple.³²

Criterios de selección: Se consideraron los siguientes criterios:

Criterios de inclusión: Todas las placas petri con cultivos viables, habiendo sido cultivadas con un rango de 18 a 24 horas.

Placas de Agar Mueller Hinton con al menos 4 mm de altura.

Criterios de exclusión: Cepas de *S. aureus* que no crecieron en el agar Mueller-Hinton.

Cepas o muestra contaminada.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:**La técnica:**

La técnica fue la observación de campo experimental, que consistió en observar la actividad y crecimiento de las unidades formadoras de colonias, de las cepas cultivadas en las placas.³⁰

Instrumento:

La información fue recolectada en la ficha recolectora de datos, en donde se registraron los números de placas y las mediciones de los halos inhibitorios. **(Anexo 04)**

Validación y confiabilidad del instrumento:

El instrumento o ficha en donde se procedió a recoger los resultados, tuvo la validación de tres profesionales de salud (médicos y microbiólogos), quienes aprobaron el instrumento y a la vez evaluaron, si era adecuado para la realización del presente estudio. **(Anexo 05)**

3.5. Procedimientos: (Anexo 06)

a. Obtención del *Vaccinium corymbosum* L. con certificación del laboratorio de biotecnología vegetal del proyecto especial Chavimochic.

b. Se obtuvo el extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L. usando el método de decocción.^{9, 10, 33}

c. Se usó el medio de cultivo Agar Müller-Hinton para el cultivo de la cepa de *S. Aureus* resistente a la meticilina ATCC 4300, y para la determinación de la sensibilidad, se utilizó el procedimiento de difusión en agar, técnica de Kirby-Bauer.
^{9, 10, 34}

3.6. Métodos de análisis de datos:

Los datos recogidos, fueron evaluados y analizados en la vigésimo sexta versión del programa SPSS, para el sistema operativo Windows. Las pruebas estadísticas que se llevaron a cabo, fueron la de análisis de varianza (ANOVA), usada con la finalidad de evaluar si había o no, diferencias significativas entre los halos de inhibición resultantes del experimento; y la técnica post ANOVA de Tukey, usada con la finalidad de estimar la homogeneidad entre los diferentes grupos estudiados y a la vez, valorar al grupo con mayor eficacia inhibitoria.^{35.}

3.7. Aspectos éticos:

En el presente estudio se tomaron en consideración, las medidas protectoras de bioseguridad dispuestas por el Ministerio de Salud y las medidas acuñadas en la ley N° 26839, correspondiente a la conservación sostenible de la biodiversidad. Además, se consideraron los protocolos del manejo de material potencialmente infeccioso, y se siguieron los reglamentos descritos en el manual de bioseguridad de la organización mundial de la salud. También se respetó el principio de ética nominado en el capítulo seis del código vigente de ética del Colegio Médico del Perú, específicamente, en el artículo 48.^{36, 37, 38, 39.}

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Valores estadísticos descriptivos de la media del efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L, la vancomicina y la combinación de ambos, sobre *S.aureus* resistente a la meticilina ATCC 4300.

TRATAMIENTO	N	Media	Desv. Desviación	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
EAVC	10	15.7000	1.25167	14.8046	16.5954	14.00	18.00
EAVC + VAN	10	24.2000	1.03280	23.4612	24.9388	23.00	26.00
VAN	10	23.9000	0.87560	23.2736	24.5264	23.00	26.00

Fuente: Reporte SPSS versión. 26

Nota : EAVC: Extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L , VAN: Vancomicina.

Tabla 2. Análisis de varianza de las medias del efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L, la vancomicina y la combinación de ambos, sobre *S. aureus* resistente a la meticilina ATCC 4300.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	465.267	2	232.633	205.265	0.000
Dentro de grupos	30.600	27	1.133		
Total	495.867	29			

Fuente: Reporte SPSS versión. 25

Tabla 3. Comparación de las medias de los halos de inhibición con la prueba de Tukey entre el extracto acuoso de *vaccinium corymbosum I*, la Vancomicina y la combinación de ambos, sobre *S. aureus* resistente a la meticilina ATCC 4300.

HSD Tukey ^a			
Agente antibacteriano	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
EAVC	10	15.7000	
VAN	10		23.9000
EAVC + VAN	10		24.2000
Sig.		1.000	0.805

Fuente: Reporte SPSS versión. 25

Nota: EAVC: Extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum I*, VAN: Vancomicina.

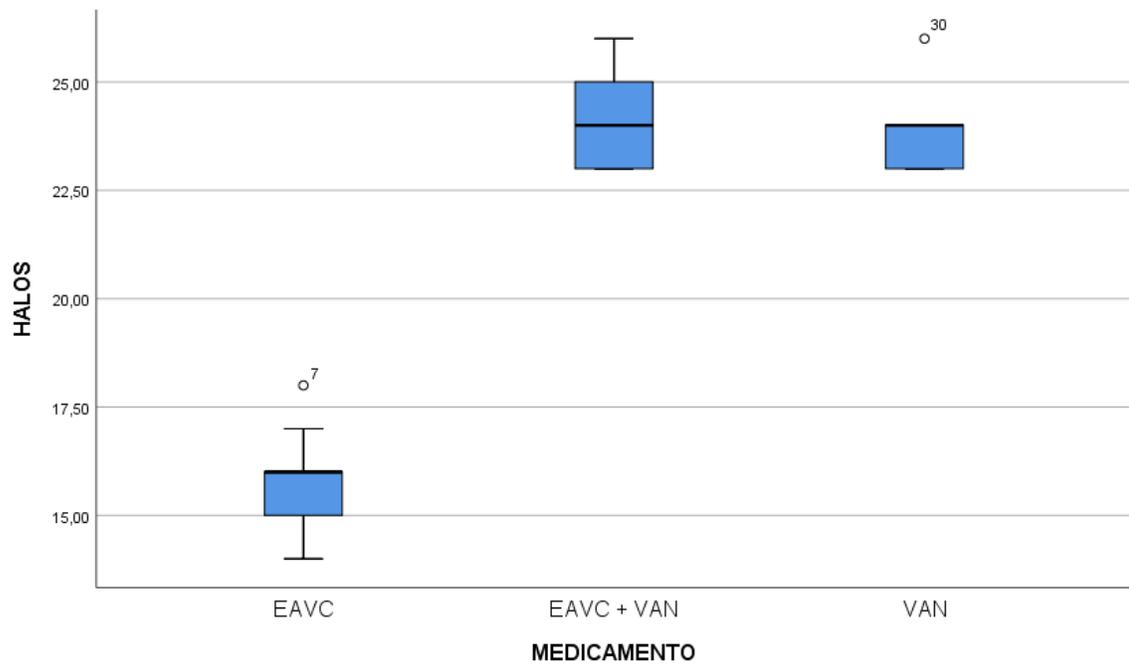


Figura 1. Diagrama de caja de los halos de inhibición por grupos de estudio.

V. DISCUSIÓN

Tras evaluar la sinergia antibacteriana del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* l y la Vancomicina, sobre *S. aureus* resistente a la meticilina ATCC 4300 in vitro, se observaron los siguientes resultados.

Los resultados que se observan en la Tabla 1, muestran la actividad antibacteriana de los tres tipos de productos utilizados, se evidencia que respecto al efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* l; los halos de inhibición tuvieron una media de 15.7mm (DS: ± 1.25167 , IC 95% 14.8046 a 16.5954, Rango: 14 – 18mm), por lo que demostró ser eficaz, según lo establecido por el CLSI (≥ 15 mm) para *S. aureus* resistente a la meticilina. El efecto hallado en este estudio fue menor al de Sachún¹⁰ (29.2 mm) y similar valor reporta Reyes¹¹ (16.5mm). Pero hay un aspecto importante a evaluar en ambas investigaciones, y es que las cepas estudiadas en ellas, corresponden a especies no resistentes de *Staphylococcus aureus*, mientras que en este estudio se enfrentó el mismo extracto, contra la variante resistente a la meticilina, encontrando aún, eficacia antibacteriana del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* l, por sí mismo.³⁴

También encontramos en la Tabla 1, a los halos de inhibición de vancomicina (23.9mm DS: ± 0.8756 , IC 95%: 23.2736 a 24.5264, Rango: 23 - 26mm), que mostraron mayor efectividad que el extracto en solitario; mientras que la combinación de ambos agentes (vancomicina + extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* l), mostró una media de: 24.2mm (DS: ± 1.03280 , IC 95%: 23.4612 a 24.9388, Rango: 23 - 26mm), siendo estos, los halos de inhibición que alcanzaron el mayor diámetro.

La asociación de estos productos, demostró tener efecto sinérgico, sobre *S. aureus* resistente a la meticilina, superando moderadamente la acción antibacteriana del agente de primera línea frente al SARM.³⁴

La razón de este resultado, se remite a las bases moleculares de los mecanismos de acción, de ambos componentes antibacterianos, en el caso de la vancomicina, inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, al detener el nexo de unión de la

transpeptidasa, bloquear la conversión del péptidoglicano al complejo pentapeptídico y en consecuencia, inducir permeabilidad en la membrana celular, y en el caso del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L, al hidrolizar los puentes bacterianos que conforman el biofilm y en consecuencia, reduciendo la capacidad de respuesta, resistencia y adherencia de la colonia bacteriana, mediante la acción de la delfidina, malvidina y cianidina, de esta manera, el extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L, unido con la Vancomicina, actuaron generando una interacción sinérgica positiva por portar diferentes sitios de acción, potenciando el efecto antibacteriano.^{22, 24, 26, 28}

Desde el punto de vista farmacológico, la sinergia demostrada, podría ser aún más potente, teniendo en cuenta el medio interno de un hospedero humano, dado que los diversos fitoquímicos presentes en el fruto del *Vaccinium corymbosum* L, poseen varias cualidades, entre ellas, la posesión de numerosos compuestos fenólicos apolares, fenoles hidrosolubles y antocianidinas, que han demostrado ejercer una inhibición cinética de la adhesión bacteriana, sobre todo en vías urinarias. Lo descrito, en conjunto con la acción de la Vancomicina, motivaría una mayor cobertura de sitios de acción y por lo tanto, un resultado óptimo frente a las infecciones en vías urinarias, causadas por el SARM.^{16, 21, 22, 23, 24}

En la Tabla 2, se evaluó la varianza de las medias mediante la prueba de Levene, demostrando que los grupos estudiados son homogéneos. Así mismo se trabajó el ANOVA que nos indica que existe diferencias significativas en los promedios de los halos de inhibición en los grupos analizados ($p= 0,000$).

Lo que se refuerza con la Tabla 3 y figura 1, es la diferencia de los promedios de los halos de inhibición y cuál de los grupos en estudio evidencian mayor eficacia, que en este caso, sería la combinación entre extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L y la Vancomicina. Es por ello que, los resultados indican que habría que considerar la elección de esta combinación como alternativa terapéutica, en lugar de la de Vancomicina por sí sola.

No se han encontrado muchos estudios donde se evalúe el efecto antibacteriano del *Vaccinium corymbosum L*, sobre el SARM. Sin embargo, trabajos como el de Pervin, también demuestran el efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum L*, pero sobre otras bacterias, como *Salmonella typhimurium* (23.18 mm) y *Enterococcus faecalis* (14.08 mm), así como Ángel, quien usó también el mismo extracto, frente a *Escherichia coli* (11.90).^{5,9}

VI. CONCLUSIONES

- El extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* L, a dilución de 100%, demostró tener efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 4300.
- La Vancomicina en el estudio también evidenció su efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 4300.
- La combinación del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L, vancomicina, mostró tener mayor inhibición sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 4300.

VII. RECOMENDACIONES

- La terapia combinada entre el extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum L.* y la vancomicina, podría ser considerada como una opción en medicina alternativa.
- Se recomienda complementar este estudio, evaluando la actividad individual de cada uno de los componentes fitoquímicos presentes en el extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum L.*, con la finalidad de poder identificar los compuestos y los mecanismos sobre los cuales se ejerce la inhibición de la actividad antibacteriana, puesto que existen escasas investigaciones acerca de ello.
- Realizar estudios para definir la sensibilidad de otros patógenos frente al extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum L.*
- Elaborar investigaciones sobre este efecto sinérgico, en animales de experimentación.

REFERENCIAS

1. Echevarría J, Iglesias o. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered 2003; 14:195-2003. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2003000400008
2. Tamariz J. Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Rev Med Hered 2010; 21(1): 4 – 10. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2010000100002
3. Michel M, Gutmann L. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus and vancomycin-resistant enterococci: therapeutic realities and possibilities. Lancet 1997; 349:1901-1906. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9217771>
4. Risco E, Miguélez C, Sánchez E, Rouseaud A. Efecto del arándano americano (cysticlean®), sobre la adherencia de Escherichia coli a células epiteliales de vejiga. Estudio in vitro y ex vivo. Arch. Esp. Urol. 2010; 63 (6): 422-430. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06142010000600003
5. Pervin M, et al. Antibacterial and antioxidant activities of Vaccinium corymbosum L. leaf extract. A college of biomedical and health science. 2013; Corea. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Antibacterial-and-antioxidant->

[activities-of-L.-leaf-Pervin-
Hasnat/f6e426d8e5dfbbf95b6cbb7afdfd23b069810312](#)

6. Shen X, Sun X, Xie Q, Liu H, Zhao Y, Pan Y, et al. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*. 2014; 35(1): 159-165. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://naldc.nal.usda.gov/download/58842/PDF>
7. Biswas D, Wideman N, O'bryan C, Muthaiyan A, Lingbeck J, Crandall F, et al. Pasteurized blueberry (*Vaccinium Corymbosum*) juice inhibits growth of bacterial pathogens in milk but allows survival of probiotic bacteria. *Journal of Food Safety*. 2012; 32: 204–209. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1745-4565.2012.00369.x>
8. Silva S, Costa E, Costa R, Pereira M, Pereira J, Soares J, et al. Aqueous extracts of *Vaccinium corymbosum* as inhibitors of *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 2015; 51:314–320. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/270163706_Aqueous_extract_of_Vaccinium_corymbosum_as_inhibitors_of_Staphylococcus_aureus
9. Ángel J. Efecto del extracto de *Vaccinium corymbosum* L. sobre el crecimiento de *E. Coli* y *S. Aureus* en condiciones de laboratorio, 2014. [Tesis de pregrado]. Trujillo: Facultad de ciencias biológicas, Universidad nacional de Trujillo; 2014. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/4531>
10. Sachún J. Efecto antibacteriano del extracto acuoso de *vaccinium corymbosum* “arándano” comparado con mupirocina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [Tesis de pregrado]. Trujillo: Universidad César Vallejo; 2019. (Citado: 04/04/2020) Disponible en:

http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/29794/sachun_sj.pdf?sequence=1&isAllowed=y

11. Reyes G. Efecto antibacteriano in vitro de *Vaccinium corymbosum* L. sobre *E. Coli* y *S. Aureus*. [Tesis de pregrado]. Trujillo: Facultad de medicina, Universidad nacional de Trujillo; 2019. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/11420>
12. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1991; 29:2240-2244. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939577>
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically- Fourth edition; Approved Standard 1997; 17(2)M7-A4. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m07/>
14. Olmos A, Sánchez R, Navarro JC, Camarena JJ, Birlanga MJ, Nogueira JM. Eficacia del antibiotipo en la detección precoz de brote nosocomial de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM). Resumen Sesiones nº 17. VII Reunión de la SEIMC. Madrid. 1997. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>
15. Olmos A, Camarena JJ, Nogueira JM, Navarro JC, Risen J, Sánchez R. Application of an optimized and highly discriminatory method based on arbitrarily primed PCR for epidemiologic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial infections. *J Clin Microbiol* 1998;

36:1128-1134. (Citado: 04/04/2020) Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104705/>

16. Engerlkirk P, Engerlkirk J. Laboratory Diagnosis of infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology. 1º ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
17. Forbes B, Sanm D, Weissfeld A, Trevio E. Diagnóstico microbiológico. 11º ed. Uruguay: Editorial Médica Panamericana; 2004.
18. Donarus A, Farreras P, Rozman C, Cardellach F. Medicina interna. 17º ed. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2012.
19. Robbers J, Tyler V. Las hierbas medicinales de Tyler uso terapéutico de la fitomedicinas. 1º ed. Barcelona: Editorial Acribia S.A; 2006.
20. Longo D, Kasper D, Johnson J, Fauci A, Hauser S, Loscalzo J. Harrison principios de medicina interna. Vol 3. 18º ed. México D.F: Mc Graw Hill; 2008.
21. Silva S, Costa E, Mendes M, Morais R. Antimicrobial, antiadhesive and antibiofilm activity of an ethanolic, anthocyanin-rich blueberry extract purified by solid phase extraction. Journal of Applied Microbiology. 2016; 121(3): 693–703. (Citado: 04/04/2020) Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27349348>
22. Lacombe A, Wu V. The potential of berries to serve as selective inhibitors of pathogens and promoters of beneficial microorganisms. Food Quality and Safety. 2017; 1(1): 3-12. (Citado: 04/04/2020) Disponible en:
<https://academic.oup.com/fqs/article/1/1/3/4791722>

23. Lacombe A, Wu V, Tyler S, Edwards K. Antimicrobial action of the American cranberry constituents; phenolics, anthocyanins, and organic acids, against *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 139: 102–107. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/41427944_Antimicrobial_action_of_the_American_cranberry_constituents_phenolics_anthocyanins_and_organic_acids_against_Escherichia_coli_O157H7
24. Bruneton J. *Farmacognosia: fitoquímica y plantas medicinales*. 2da ed. Madrid: Acribia; 2007.
25. Englekirk P, Engerkirk J. *Burton's Microbiology for the Health Sciences*. 9na ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
26. Englekirk P, Engerkirk J. *Laboratory Diagnosis of infectious Diseases: Essentials of Diagnostic Microbiology*. 1º ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
27. Villar M, Villavicencio O. *Manual de Fitoterapia*. Lima: EsSalud; Organización Panamericana de la Salud; 2001.
28. Pervin, M; Hasnat, A; Ou Lim, B. Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract. *A college of biomedical and health science*. 2013; Corea. (citado: 04/04/2020). Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Antibacterial-and-antioxidant-activities-of-L.-leaf-Pervin-Hasnat/f6e426d8e5dfbbf95b6cbb7afdfd23b069810312>
29. Goldman L, Ausiello D. *Cecil tratado de medicina interna*. Vol 2. 23º edición. Barcelona, España: Elsevier Masson; 2009.

30. Hernández R, Fernández C y Baptista P. Metodología de la Investigación. México: McGraw-Hill Interamericana; 2010.
31. Tresierra A. Proyecto e informe de Tesis y Redacción científica. 1ra ed. Trujillo: Industria gráfica ABC; 2013.
32. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Rev. Investigación en Educación Médica [en línea]. 2015; 2: 217-224 (Citado: 04/04/2020). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2007505713727157>
33. Olaya J. Guía de plantas y productos medicinales. 1ra ed. Bogotá: Convenio Andrés Bello; 2003.
34. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2018-M100-S28-unlocked.pdf>
35. Wayne D. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta Ed. México: Limusa; 2006
36. Sistema de Gestión de la Calidad del Pronahebas, Ministerio de Salud (MINSA). Manual de Bioseguridad. 2004. Perú. (Citado: 04/04/2020). Disponible en: <http://www.minsa.gob.pe/dgsp/observatorio/documentos/infecciones/manual%20de%20bioseguridad.pdf>

37. Ley N° 26839 - Ley sobre la Conservación y el Aprovechamiento Sostenible de la Diversidad Biológica. Lima: Ministerio del ambiente; 1997. (Citado: 04/04/2020). Disponible en: <https://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-conservacion-aprovechamiento-sostenible-diversidad-biologica#:~:text=Ley%20N%C2%B0%2026839%20.,Sostenible%20de%20la%20Diversidad%20Biol%C3%B3gica.&text=La%20presente%20ley%20norma%20la,la%20Constituci%C3%B3n%20Pol%C3%ADtica%20del%20Per%C3%BA.>
38. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. (Citado: 04/04/2020). Disponible en: http://www.cmp.org.pe/wpcontent/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf
39. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
40. Katzung G. Bases y Clínica farmacológica. 12ª edición. Barcelona: Mc-Graw Hill; 2013.
41. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard–Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. (Citado: 04/04/2020) Disponible en: <https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>

ANEXOS

Anexo 01

Diseño de investigación:

Experimental con múltiples repeticiones, post prueba. ²⁹

RG1 X1 O1

RG2 X2 O2

RG3 X3 O3

RG4 X4 O4

Dónde:

RG: Cepas de *S. aureus* meticilino resistentes.

X1: Extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* I al 100%

X2: Control positivo: Vancomicina 30 µg.

X3: Extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* I al 100% en conjunto con Vancomicina 30 µg.

X4: Control negativo: Dimetil sulfóxido (DMSO)

O: Observaciones de la actividad bacteriana (halo de inhibición).

Anexo 02

Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Sustancia producida mediante síntesis química, que cuenta con la capacidad de impedir el crecimiento o destruir microorganismos. ⁴⁰	Se trabajará con cuatro grupos: A) El extracto acuoso del fruto de <i>Vaccinium corymbosum</i> l. al 100% B) Vancomicina a la concentración de 30µg C) A + B D) Dimetil sulfóxido	RG1 RG2 RG3 RG4	Cualitativa nominal
V. D: Efecto antibacteriano	Capacidad mediante la cual, una sustancia inhibe el crecimiento de bacterias o induce su eliminación. ⁴⁰	Se considera según el estándar del CLSI: Sensible: ≥15 mm Resistente: <15 mm ⁴¹	Si efecto antibacteriano : ≥ 15 mm No efecto antibacteriano : < 15 mm	Cualitativa nominal

Anexo 03

Tamaño de muestra

Se utilizó la fórmula para comparación de dos medias.²⁹

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2S^2}{(X1 - X2)^2}$$

Dónde:

$z_{\alpha/2} = 1.96$ Nivel de confianza al 95%

$Z/b = 0.84$ Potencia estadística de 80%

$X1 = 12 \text{ mm}$ ¹³

$X2 = 15 \text{ mm}$ ^{13, 34}

S: 1.976 ¹³

$n = 7$ número mínimo de repeticiones por cada concentración

Por motivos académicos, para el presente estudio, se realizarán 10 repeticiones por cada grupo.

Anexo 04

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Ficha de recolección de datos

Cepa de estudio: Staphylococcus Aureus resistente a meticilina ATCC 4300

Tratamientos antimicrobianos:

- Dimetil sulfóxido
- Vancomicina a 30µg/ml
- Extracto acuoso de *Vaccinium Corymbosum I* al 100%.
- Extracto acuoso del fruto de *Vaccinium Corymbosum I* al 100% junto a Vancomicina a 30µg/ml.

Hora de aplicación del disco:

Fecha de inicio:

Fecha de término:

Número de placa	Antibacterianos			
	Halos de inhibición (mm)			
	Extracto acuoso del fruto de <i>Vaccinium Corymbosum I</i> al 100% junto a Vancomicina a 30µg/ml.	Extracto acuoso del fruto de <i>Vaccinium Corymbosum I</i> al 100%.	Vancomicina a 30µg/ml.	Dimetil sulfóxido.
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

Anexo 05

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems de la ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

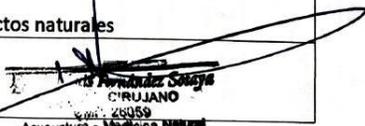
Recomendaciones:

.....

.....

.....

Gracias, por su generosa colaboración.

Apellidos y nombres	FERNANDEZ SOSAYA, José Luis
Grado Académico	Maestría en Farmacia y CC Bioquímicas
Mención	Productos naturales
Firma	 José Luis Fernández Sosaya CIRUJANO N.º 28959 Acupuntura - Medicina Natural

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems del cuestionario/ guía de observación o ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....
.....

Gracias, por su generosa
colaboración

Apellidos y nombres	Jaime Abelardo Polo Gamboa
Grado Académico	Magíster en Microbiología
Mención	Docencia universitaria
Firma	 Jaime A. Polo Gamboa MICROBIOLOGO CBP 6551

VALIDEZ DE TEST: JUICIO DE EXPERTOS

INSTRUCTIVO PARA LOS JUECES

Indicación: Señor especialista se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems de la ficha de recolección de datos, el mismo que le mostramos a continuación, indique de acuerdo a su criterio y su experiencia profesional el puntaje de acuerdo a si la pregunta permite capturar las variables de investigación del trabajo.

En la evaluación de cada ítem, utilice la siguiente escala:

RANGO	SIGNIFICADO
1	Descriptor no adecuado y debe ser eliminado
2	Descriptor adecuado pero debe ser modificado
3	Descriptor adecuado

Los rangos de la escala propuesta deben ser utilizados teniendo en consideración los siguientes criterios:

- ⊕ Vocabulario adecuado al nivel académico de los entrevistados.
- ⊕ Claridad en la redacción.
- ⊕ Consistencia Lógica y Metodológica.

Recomendaciones:

.....
.....
.....

Gracias, por su generosa colaboración.

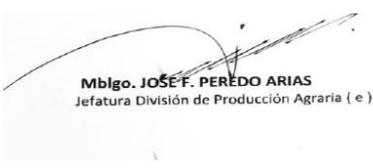
Apellidos y nombres	DE LA CRUZ LUJÁN, JOSÉ MILTON.
Grado Académico	Maestría.
Mención	Microbiología y ciencias.
Firma	

Anexo 06

Procedimientos:

Constancia de sanidad vegetal emitida por el laboratorio de biotecnología del proyecto especial Chavimochic

PROYECTO ESPECIAL CHAVIMOCHIC
SUBGERENCIA DE DESARROLLO AGRICOLA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL

CONSTANCIA DE SANIDAD VEGETAL	
ESPECIE.....	<i>Vaccinium corymbosum</i>
VARIEDAD/CLON.....	"BILOXY"
TECNICA DE PROPAGACION	MICROPROPAGACION IN VITRO
PROCEDENCIA	LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA
ENTIDAD	PROYECTO ESPECIALCHAVIMOCHIC
LUGAR	CAMPAMENTO SAN JOSE- VIRU
RESPONSABLE TECNICO	Mblgo José Peredo Arias
N° LOTE	1
CODIGO PAIS	PERU
<u>REGLAS Y NORMAS</u>	
MATERIAL	VEGETAL
CANTIDAD(PLANTAS)	NUEVE (9)
CODIGO DEL PRODUCTO.....	S/C
FECHA DE EMISION	09.10.2020
 Mblgo. JOSÉ F. PEREDO ARIAS Jefatura División de Producción Agraria (e)	
_____ Firma del Responsable	

Obtención del extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L

Las plantas frescas de *Vaccinium corymbosum* L, se obtuvieron del laboratorio de biotecnología del proyecto especial Chavimochic, portando todas, sus respectivos frutos. La muestra se obtuvo tras enjuagar y lavar los frutos con agua destilada, para posteriormente dejarse orear con papel absorbente estéril, hasta que los frutos estuvieran completamente secos.^{9, 10}



La obtención del extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* L, se realizó mediante el método de decocción. Este procedimiento consistió en primer lugar, en pesar una cantidad de 50g de arándano azul y ponerlos en un matraz estéril. Posteriormente, se incorporó en el recipiente, una cantidad de 100ml de agua destilada, para luego llevarlo a una cocina eléctrica en donde se le expuso al calor hasta la ebullición, durante 15 minutos.^{9, 10}



Una vez finalizado ello, se realizó una filtración por medio de gasa estéril y también por medio de papel filtro. El resultante, se colocó en placas Petri y se pasó a una estufa a 40°C, hasta que quedase a una concentración total de 200mg/ml, obteniéndose así, extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* L al 100%.^{9, 10}

Prueba de sensibilidad

La prueba de sensibilidad fue realizada utilizando el método de Kirby-Bauer, teniendo en cuenta los criterios descritos en el Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, de los Estados Unidos de América. ^{9, 10, 34}

Preparación del inóculo bacteriano

A partir de colonias de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina cultivadas previamente hace 18 horas, se procedió a recoger una muestra con un asa bacteriológica, equivalente al tubo N°5 de la escala de McFarland; para ser depositada en un tubo de ensayo estéril con 4 ml de suero salino fisiológico. Tras ello, se agitó la muestra, manualmente y se constituyó el inóculo. ^{9, 10, 34}



Siembra del microorganismo

Para la siembra, se introdujo un hisopo estéril en la suspensión, embebiéndolo y posteriormente, desplazándolo sobre la superficie de las placas Petri, permitiendo una siembra uniforme. ^{9, 10, 34}



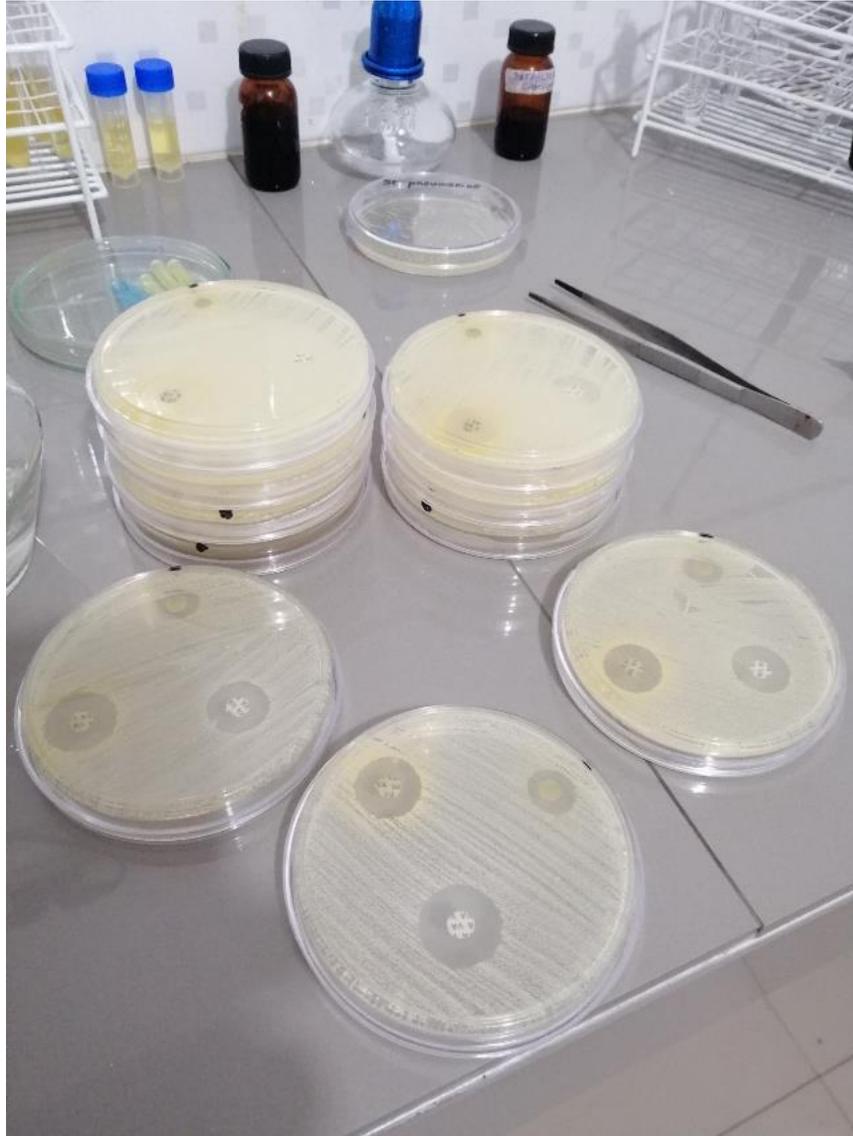
Preparación de los discos de sensibilidad

Se realizaron 4 excavaciones de 6mm en el agar Müller-Hinton de las placas usando un sacabocado. Luego, se procedió a agregar 10 μL de extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* I al 100%, Vancomicina 30 μL , extracto acuoso de *Vaccinium corymbosum* I al 100% junto a Vancomicina 30 μL y dimetil sulfóxido, en cada excavación, respectivamente, con la ayuda de una micropipeta. Este procedimiento, se repitió 10 veces. Luego, las placas se incubaron por 18 horas de forma invertida en la estufa a 37°C. ^{9, 10, 34}



Lectura e interpretación de los resultados

La lectura fue realizada, observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento bacteriano. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido por el CLSI.^{9, 10, 41}





San Jose
LABORATORIO CLINICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde LUIS FERNANDO ESPINOZA SÁNCHEZ, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Sinergia antimicrobiana entre el extracto acuoso del fruto de *Vaccinium corymbosum* L. "arándano" y vancomicina sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina", durante los días 21 al 24 de septiembre de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud de la estudiante, sólo para fines académicos, a los 26 días del mes de octubre de 2020.


José Luis Calle Quevea
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO
C.B.P. 0301
Gerente General

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - 📠 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/