

|

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN/COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA ANTIBIÓTICOS GENÉRICOS Y ANTIBIÓTICOS INNOVADORES,
FRENTE A PATÓGENOS CLÍNICOS.

SERGIO IVAN BUSTAMANTE.

PROYECTO DE GRADO
PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR EL TÍTULO.
MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL.

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
BOGOTA D.C

2015.

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus Alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada Contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan Ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el Anhelado de buscar la verdad y la justicia”

ARTÍCULO 23, RESOLUCIÓN NUMERO 13 DE 1946.

Contenido

Generalidades de los antibióticos	6
Clasificación de los antibióticos.....	6
Clasificación según su mecanismo de acción.....	6
Clasificación según su componente activo	7
Carbapenems.....	9
Mecanismo de acción Carbapenems.....	10
Espectro antibacteriano.....	10
Metabolismo y farmacocinética.....	10
Mecanismo de resistencia	11
Efectos adversos	11
Meropenem.....	12
Definición	12
Estructura química	12
Mecanismo de acción	13
Resistencia bacteriana.....	14
Mecanismos de Resistencia de bacterias Gram negativas.....	15
Modificación enzimática del antibiótico.....	16
β -lactamasas.....	16
β -lactamasas tipo AmpC.....	17
Carbapenemasas.....	18
Microorganismos de interés clínico.	19
Staphylococcus aureus.....	19
<i>Escherichia coli</i> y otras enterobacterias.	20

|

Potencia de antibióticos	21
Definición	21
Clasificación	21
Métodos cuantitativos	22
Método de dilución	22
Planteamiento del problema	24
Objetivos	26
Objetivo general.	26
Objetivos específicos	26
Justificación	26
Enfoque de investigación	27
Criterios de elegibilidad	27
Criterios de inclusión	27
Criterios de exclusión.....	27
Cuadro de variables.	28
Instrumento de recolección de información.....	28
Procedimiento	28
Materiales	28
Microorganismos.....	28
Reactivos	28
Equipos	29
Metodología	29
Pureza, Cinética y viabilidad	29
Estandarización del inóculo	29

|

Control del inóculo.....	30
Preparación de los antibióticos.	30
Estandarización de las concentraciones evaluadas	30
Procedimiento para la evaluación de los antibióticos.....	31
Incubación y lectura de las placas	32
RESULTADOS Y DISCUSION.....	33
Pureza, cinética y viabilidad.....	33
Estandarización del inóculo	34
Estandarización de las concentraciones evaluadas	36
Procedimiento para la evaluación de los antibióticos.....	38
Incubación y lectura de las placas	39
Procedimiento estandarizado.....	41
Desarrollo del procedimiento.....	42
Conclusiones.....	47
Bibliografía.....	48

Generalidades de los antibióticos

El término antibiótico fue acuñado por Selman Abraham Waksman en 1941, quien lo define como toda sustancia natural producida por un organismo vivo, hongo o bacteria, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. (1)

La segunda mitad del siglo xx fue la época de los antimicrobianos, producto de una serie de adelantos tecnológicos y científicos. Antes del descubrimiento de los antibióticos una simple infección podía ser la causa de muerte de muchas personas, situación que actualmente se ha superado gracias a la acción de los antibióticos. Anteriormente la mortalidad infantil era muy elevada, principalmente por las infecciones, al igual que la mortalidad materna en el parto y después del parto. En el siglo XVII la mitad de la población de Europa murió por alguna infección. Ahora existe una gran cantidad de fármacos, como la penicilina, derivados de la penicilina, sulfas, nitrofuranos, quinolonas, fenoxacinas y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, que presentan acción antimicrobiana frente a agentes infecciosos.(2,3)

Clasificación de los antibióticos.

Los antibióticos se pueden clasificar según su mecanismo de acción y su componente activo.

Clasificación según su mecanismo de acción.

El primer grupo actúa sobre la membrana citoplasmática y en este se encuentran las poliximinas, la nistatina, los imidazoles y la colimicina.

El segundo grupo conformado por las cefalosporinas, la vancomicina, la cicloserina, la bacitracina, la fosfomicina, la ristocetina, la novobiocina, la penicilina y muchos de sus derivados como la metacilina, oxacilina, nafcilina, ampicilina, carbenicilina y amoxicilina interviene en la síntesis de la pared celular. (2,4)

El tercer grupo actúa sobre la síntesis de proteínas y en este grupo se encuentra, el cloranfenicol, las tetraciclinas, la lincomicina, la oleandomicina y los aminoglucosidos como la kanamicina, la gentamicina y la amikacina. (2,4)

El cuarto grupo interviene en la replicación celular y está conformado por la porfiromicina, la actinomicina, la mitomicina, los nitrofuranos, la novobiocina, la griseofulvina y el ácido nalidixico y sus derivados. (2,4)

El quinto grupo actúa sobre la transcripción y traducción del ADN y está compuesto por la estreptomicina, la novobiocina, el cloranfenicol, las tetraciclinas, los macrolidos y la puromicina. (2,4)

El sexto grupo actúa como antagonista metabólico y lo conforman las sulfonamidas, el trimetoprim y la isoniazida. (2,4)

Clasificación según su componente activo

Betalactámicos

Los betalactámicos obstaculizan la síntesis de la pared celular bacteriana mediante la inhibición por la incorporación del ácido N-acetilmurámico a los mucopeptidos de la pared celular en las bacterias gram positivas, a diferencia de las bacterias Gram negativas, que contienen pequeñas cantidades de mucopeptidos, que hace que las penicilinas no sean eficientes frente a este grupo de microorganismos. Los antibióticos betalactámicos se pueden dividir en: penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactams y carbacefem. (2, 4,5)

Aminoglucosidos

Son un grupo de antimicrobianos que reciben su nombre genérico por su composición química estructural, al estar integrados a una base de azúcares aminados. Su acción sobre la célula bacteriana es destructora (bactericida) por interferencia en la síntesis proteica a nivel de los ribosomas mediante la unión irreversible en la subunidad 30S. En este grupo de antibióticos encontramos a la estreptomicina, gentamicina, amikacina, tobramicina,

neomicina, kanamicina, paramomicina, sisomicina, dibekacina, netilmicina y espectromicina. (2, 4,5)

Fenolicos

De los fenolicos el cloranfenicol es un antibiótico bacteriostático que inhibe la síntesis proteica de la bacteria, al reprimir la transmisión de aminoácidos activados. Es muy difusible, con excelente absorción digestiva y distribución en todo el organismo, además de ser de fácil penetración en los espacios raquideo y pleural y con paso transplacentario. (2, 4,5)

Polimixinas

En las polimixinas o antimicrobianos polipeptidicos, encontramos la polimixina B y la polimixina E. las polimixinas tienen efecto bactericida al aumentar la permeabilidad de las membranas bacterianas, de forma que estas pierden sustancias de bajo peso molecular.

Glicopeptidos

De los antimicrobianos glicopeptidos, la vancomicina es un antimicrobiano glucopeptido tricíclico que se presenta en polvo soluble en agua, para administración endovenosa lenta. Su espectro de acción en primer lugar incluye al género *Staphylococcus*, pero también se pueden utilizar en infecciones por *Clostridium*, *Corynebacterium* y *Bacillus*. (2, 4,5)

Macrolidos

Este grupo de antibióticos deben su nombre a que estructuralmente poseen una lactona macrocíclica. Presentan un espectro antimicrobiano entre la penicilina y la tetraciclina, y su mecanismo de acción es por interferencia en la síntesis proteica bacteriana. (2, 4,5)

Tetraciclinas

Son antibióticos bacteriostáticos que interfieren en la síntesis proteica, al impedir la unión del ácido ribonucleico de transferencia con el ribosoma. Su espectro se considera amplio. (2, 4,5)

Sulfamidas

Son derivados de la sulfanilamida. Tiene acción bacteriostática al interferir en la síntesis del ácido fólico. Su espectro de acción es muy amplio, incluyendo Gran positivos y negativos. (2, 4,5)

Carbapenems

Debido a su amplio espectro antibacteriano que incluye *Pseudomonas aureginosa*, lo carbapenemicos han abierto nuevos horizontes al uso de antibióticos betalactamicos. El imipenem fue el primer carbapenem usado clínicamente, subsecuentemente muchos carbapenems como pampenem, meropenem, biapenem, han sido desarrollados y usados para el tratamiento de infecciones graves o estudios clínicos. La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, constituye un problema serio en la quimioterapia antimicrobiana. Sin embargo, los carbapenems no muestran gran actividad contra estos organismos altamente resistentes. (6)

Los carbapenems son antibióticos relacionados con la penicilina en los cuales el átomo de azufre del anillo A del ácido penicilánico ha sido reemplazado por carbono. La doble ligadura presente en el anillo A contribuye a que el carácter planar del anillo se asemeje al del ácido penicilánico. Los carbapenems se fijan a las proteínas fijadoras de penicilinas 1 y 2, en consecuencia, poseen una actividad antibacteriana similar a las de las penicilinas. Sin embargo, también se fijan a la proteína fijadora 7, lo que les permite destruir bacterias que no se encuentran en vías de proliferación, rasgo que sin duda es importante para el tratamiento de infecciones asociadas con poblaciones numerosas de células latentes (endocarditis, meningitis,oftalmitis, osteomielitis, etc.) los carbapenemicos inducen betalactamasas, pero también son resistentes a estas enzimas, este fenómeno explica su eficacia contra mas del 90% de las especies de bacterias Gran negativas. (6)

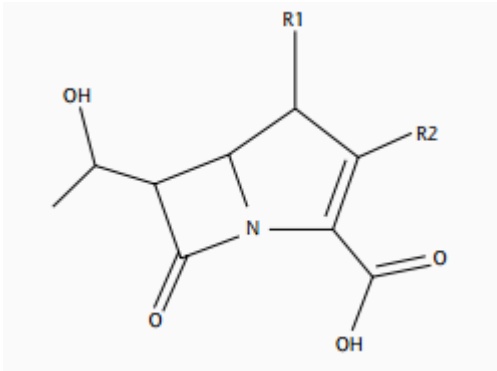


Figura 1. Estructura química de los carbapenems (Tomada de: Nuevos Betalactámicos <http://www.medicrit.com/rev/v3n6/36132.pdf>)

Mecanismo de acción Carbapenems

Como betalactámicos que son, inhiben la síntesis de la pared bacteriana al unirse a proteínas ligadoras de penicilinas, que produce una forma esférica en la bacteria, provocando la lisis inmediatamente. Los sitios "blanco" en la *E. coli* son las proteínas tipo 2, 1 y 3; con los cuales ocurre afinidad decreciente según el orden antes mencionado. Por otro lado, imipenem aumenta su actividad antibacteriana por el pequeño tamaño de su molécula, su configuración trans y su efecto post-antibiótico. (7)

Espectro antibacteriano

Los carbapenémios tienen un espectro antimicrobiano amplio que cubre la mayoría de los microorganismos Gram positivos y Gram negativos, aerobios y anaerobios, cocos y bacilos. Las únicas especies bacterianas que normalmente son resistentes a los carbapenémicos son la *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomona cepacia*, *Corynebacterium keikeium*, *Enterococcus faecium*, y algunas otras especies de *enterococos*. (8)

Metabolismo y farmacocinética

Son medicamentos que no se absorben por la vía oral, administrándose solamente por vía parenteral. Su unión a proteínas plasmáticas es pobre en el caso del imipenem y meropenem y alta en el caso de doripenem, panipenem y ertapenem con una buena

distribución corporal, sobre todo a nivel del sistema nervioso central, peritoneo y riñón. Tiene escasa excreción por la bilis y heces fecales, de ahí su pobre efecto sobre la flora intestinal. La vida media varía en dependencia del compuesto desde una hora para el imipenem, hasta el ertapenem con una vida media que le permite una dosificación cada 24 horas. Como para el resto de los β -lactámicos, su acción es dependiente del tiempo de permanencia por encima de la CIM, pero a diferencia de otros, ellos poseen un prolongado efecto postantibiótico frente a bacilos Gram negativos, lo que determina que el intervalo entre dosis sea de seis a ocho horas, mucho más largo que su vida media, sin embargo las CIM para *P. aeruginosa* y *Acinetobacter sp.* Son de 10 a 40 veces más elevadas que para las enterobacterias, por lo que deben utilizarse dosis más elevadas y en intervalos que no deben superar las 6 horas para imipenem y meropenem. (9)

Mecanismo de resistencia

La mayoría de las β -lactamasas de espectro expandido son incapaces de conferir resistencia a los carbapenémicos, pero algunas bacterias producen β -lactamasas especializadas del grupo de las metalo- β -lactamasas, mediadas por zinc, que inactivan estos compuestos. En algunos organismos la resistencia a imipenem se ha asociado a alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilina (PFP). La resistencia en cocos gram positivos se debe a la presencia de PFP no sensibles a los carbapenémicos. Además se describe la resistencia adquirida por la *P. aeruginosa* por la pérdida de una proteína de la membrana externa que forma una porina (proteína D2 y proteína 47Kd), por último se ha descrito una resistencia por aumento del flujo de meropenem en *P. aeruginosa*, este mecanismo se asocia con resistencia cruzada con fluoroquinolonas, pero no con imipenem. (10)

Efectos adversos

Convulsiones: Especialmente con el uso del imipenem asociado a la administración de dosis altas y/o insuficiencia renal, enfermedades del SNC, o se administra conjuntamente con ciclosporina, teofilina o ganciclovir. Con los nuevos agentes este efecto tiene un porcentaje muy bajo. Náuseas, vómitos (4%): Se asocia a infusión rápida del

medicamento. Aumento de las transaminasas (5%), leucopenia, eosinofilia, prueba de Coombs positiva. Hipersensibilidad cruzada con otros β -lactámicos. (11)

Meropenem

Definición

Meropenem es un antibiótico de amplio espectro, actúa frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas. Es un betalactámico, perteneciente al grupo de los carbapenems que son un grupo de antibióticos resistentes a la beta lactamasas. Por sus propiedades son utilizados en el tratamiento de diversas enfermedades nosocomiales de gran importancia. (12)

Estructura química

El anillo carbapenem es un azobicyclo formado por la condensación de un anillo β -lactámico y otro pirrolidínico de 5 miembros e insaturado. Posee en posición 1 un átomo de carbono (carba) y un enlace no saturado entre 2 y 3 (-em). Todos tienen en posición 6 un grupo hidroxietilo en configuración trans que protege al anillo β -lactámico de muchas serino- β -lactamasas y en posición 3 un radical carboxilo, importante para que el anillo pirrolidínico active al β -lactámico. (12)

Los distintos carbapenems son fruto de sustituciones en 1 y 2. En meropenem, el H en posición β está sustituido por un metilo que le confiere estabilidad frente a la DHP-I renal, a diferencia del imipenem, otro antibiótico del grupo de los carbapenems, en el cual los hidrógenos del C1 no están sustituidos, por lo que es sensible a la DHP-I renal y potencialmente nefrotóxico. En la posición 2, hay una cadena lateral tioacídica de carácter básico que diferencia a los distintos carbapenems determinando actividad antimicrobiana, potencial neurotóxico, atrapamiento por algunas bombas de expulsión, farmacocinética y colabora en la estabilidad frente a la DHP-I. (12)

En meropenem está sustituida por un grupo hidrofóbico dimetil-carbomoil-pirrolidin-tio que incrementa la actividad frente a Gram negativos, además es responsable de la ligera

disminución de actividad frente a Gram positivos, y puede de igual manera explicar la reducción del efecto proconvulsionante observado en imipenem/cilastatina. Meropenem tienen un peso molecular de 437,51 es un antibiotico hidrofílico y de estructura compacta y zwitteriónica, lo que permite una penetración rápida a través de las porinas de los Gram negativos

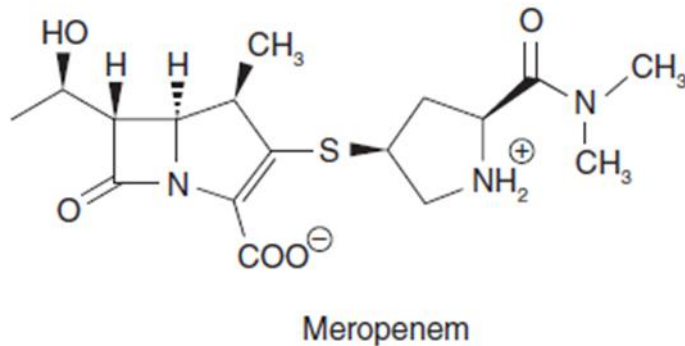


Figura 2. Estructura de Meropenem (Tomada de: Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias)

Mecanismo de acción

Inhibe la síntesis de la pared celular durante la transpeptidación uniéndose a residuos de serina de peptidasas situadas en la cara externa de la membrana citoplasmática denominadas PBP (penicillin binding protein, proteínas que fijan penicilinas). La pared celular se debilita y la bacteria normalmente se lisa. Por ello, es bactericida. El poder bactericida es rápido y dependiente del tiempo. Frente a *Listeria monocytogenes* meropenem se comporta como bacteriostático, aunque la actividad intracelular es bactericida a las 24 h. Para ejercer su acción debe atravesar la pared celular para acceder a las PBP, lo que es fácil en Gram positivos pero más complicado en gramnegativos. Sus características estructurales le permiten acceder a las PBP de las bacterias Gram negativas a través de las porinas de la membrana externa. En *P. aeruginosa* meropenem emplea la vía de la OprD y otras porinas. (12)

Los carbapenems muestran una elevada afinidad por múltiples PBP fundamentales en gramnegativos (especialmente por las PBP de alto peso molecular 1a, 1b, 2 y 3). La mayor afinidad por las PBP-1a y 1b de *Escherichia coli* y *P. aeruginosa*, en comparación con otros β -lactámicos, determina un mayor y más rápido efecto bactericida. La inhibición de las PBP-2 y 3 es responsable de la aparición de cambios morfológicos que conducen a la formación de células esféricas (PBP-2) o de formas filamentosas (PBP-3). El meropenem, al contrario que ceftazidima y aztreonam, muestra una elevada afinidad por la PBP-4 y una afinidad preferente sobre las PBP-3,4 y 6 de *E. coli* y la PBP-2 de *P. aeruginosa*. (12)

En *Staphylococcus aureus* cabe destacar la elevada afinidad por las PBP-1, 2 y 4 y baja por las PBP-3. Los carbapenems no tienen afinidad por la PBP-2^a. Meropenem muestra una afinidad baja por las PBP-1, 2 y 4 y casi inexistente sobre la PBP-3. Estas diferencias avalan la menor actividad frente a *S. aureus*. (12)

Resistencia bacteriana.

La resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico. Desde el principio de la era antibiótica los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos. Cabe destacar la importancia inicial de cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de degradar la penicilina y la posterior aparición de esta misma bacteria con resistencia a la metilina. Inicialmente el problema fue resuelto con el descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias que eran capaces de controlar las bacterias con este fenómeno, y aparecen medicamentos como los aminoglucósidos, macrólidos, glicopéptidos, entre otros. Sin embargo, esto no es suficiente y cada vez aparecen nuevos mecanismos que son difíciles de controlar por estos medicamentos. (13)

Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos

que controlen éstos es mucho más lento. Son varias razones las que explican este hecho: costo de la síntesis hasta el mercadeo del medicamento (US\$100 millones a US\$350 millones); falta de nuevos blancos para la acción de los antibióticos, entre otras. Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes causan una amplia morbilidad y mortalidad. Asimismo causan un mayor costo por mayor estancia hospitalaria y complicaciones. Se calcula que el costo anual en los Estados Unidos por la resistencia antibiótica es entre 100 millones y 30 billones de dólares. (13)

Mecanismos de Resistencia de bacterias Gram negativas.

Teniendo en cuenta que las bacterias Gram negativas tienen un arsenal de mecanismos de resistencia a su disposición y que la selección de estos mecanismos puede llevar a allá terapéutica, es importante conocer los mecanismos de resistencia más prevalentes en las bacterias Gram negativas.

Estos mecanismos de resistencia podrían resumirse en cuatro categorías (figura 3)

1. Modificación enzimática del antibiótico: las bacterias expresan enzimas capaces de crear cambios en la estructura del antibiótico haciendo que éste pierda su funcionalidad. Las β -lactamasas son las más prevalentes. Son proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico que poseen los antibióticos de esta familia. De igual forma, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos son capaces de modificar estos antibióticos mediante reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación(14).

2. Bombas de salida: operan tomando el antibiótico del espacio periplásmico y expulsándolo al exterior, con lo cual evitan que llegue a su sitio de acción. Este mecanismo es frecuentemente utilizado por las bacterias Gram negativas. (14)

3. Cambios en la permeabilidad de la membrana externa: las bacterias pueden generar

Cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos, entre ellos, los antibióticos. Los cambios en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de estos agentes al espacio periplásmico. (14)

4.Alteraciones del sitio de acción: las bacterias pueden alterar el sitio donde el antibiótico se une a la bacteria para interrumpir una función vital de ésta. Este mecanismo es, principalmente, utilizado por las bacterias Gram positivas, las cuales generan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas. (14)

Modificación enzimática del antibiótico

Debido a que el mecanismo de resistencia más prevalente en las bacterias Gram negativas a los antibióticos es la producción de β lactamasas, es importante mencionar las más prevalentes.

β -lactamasas

Los antibióticos β -lactámicos tienen en común su estructura molecular con un anillo β -lactámico, los cuales son responsables en gran parte de su acción antimicrobiana. Las β -lactamasas son enzimas capaces de romper este anillo e inactivar estos antibióticos. Las β -lactamasas son ubicuas de las bacterias Gram negativas y representan una forma importante de resistencia. Los genes que codifican estas enzimas pueden encontrarse en el cromosoma bacteriano o en plásmidos, lo cual permite su fácil transferencia entre diferentes bacterias, lo que representa un gran reto para el control de las infecciones. (14)

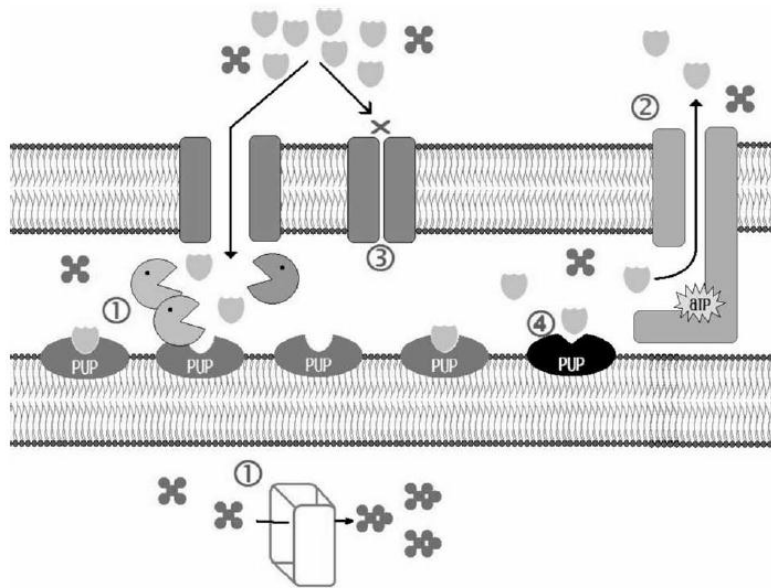


Figura 3. Mecanismos de resistencia (Tomado de: Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas)

β -lactamasas tipo AmpC.

Estas enzimas se han encontrado codificadas por cromosomas en una amplia variedad de bacterias Gram negativas; algunas de ellas son fáciles de recordar utilizando la mnemotecnia AMPCES (*Aeromonas* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. (indol positivo), *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp. y *Serratia* spp.). También se ha encontrado AmpC mediada por plásmidos en *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella* spp., especies que no tienen naturalmente expresión de AmpC cromosómico. Las β -lactamasas tipo AmpC hidrolizan generalmente a las cefalosporinas de espectro reducido, cefalosporinas de tercera generación, aztreonam e inhibidores de β -lactamasas. Las bacterias con AmpC cromosómico, bajo condiciones normales, producen esta enzima en bajas cantidades sin alterar significativamente la sensibilidad a las cefalosporinas de tercera generación. Sin embargo, pueden ocurrir mutaciones espontáneas (a una tasa de 10^{-5} a 10^{-7}) en los genes que regulan la producción de AmpC, lo cual lleva a la producción constitutiva de esta enzima, en suficiente cantidad como para hidrolizar los antibióticos antes mencionados. Las bacterias que ya no regulan la producción de AmpC, pueden ser seleccionadas durante la terapia con cefalosporinas de tercera generación y pueden acumularse en la microflora

hospitalaria. Diferentes estudios han demostrado prevalencias de aislamientos de *Enterobacter spp.* De este tipo entre 29,5% y 50% lo cual se asocia al uso de cefalosporinas de tercera generación. (14)

Carbapenemasas.

Este grupo de enzimas hidroliza hasta los carbapenems. Pueden estar codificadas en el cromosoma bacteriano o estar presentes en elementos genéticos móviles. Se ha propuesto una clasificación en dos grupos: carbapenemasas de serina (incluidas en la clasificación molecular de Ambler, clases A y D) y metalo- β -lactamasas, MBL (Ambler, clase B), denominadas así por la dependencia de metales como el zinc para su funcionamiento. Aunque las carbapenemasas fueron inicialmente consideradas poco frecuentes, los recientes reportes en la literatura han generado preocupación entre los clínicos y los grupos de investigación por el reto terapéutico que representan y por su impacto en el desenlace clínico de los pacientes, ya que la resistencia a los carbapenems implica resistencia a otros β -lactámicos. Un fenotipo que puede ayudar a la detección de carbapenemasas tipo MBL, es la resistencia a todos los β -lactámicos, excepto a aztreonam. En el caso de las carbapenemasas de serina, no existe un fenotipo característico y su identificación constituye actualmente un reto en los laboratorios de microbiología. (14)

Se han identificado carbapenemasas de serina en Enterobacteriaceas y en *Acinetobacter spp.* En Enterobacteriaceas se han descrito algunos ejemplos de enzimas clase A, como NMC-A, SME-1-3, KPC 1-4, IMI-1 y GES-220. Las enzimas tipo KPC se han descrito clásicamente en *K. pneumoniae* y en algunas Enterobacteriaceas alrededor del mundo.

Aunque su actividad hidrolítica es mucho menor que el de las metaloenzimas, su mayor frecuencia en *Acinetobacter spp.* las hace importantes. Son enzimas capaces de hidrolizar

las penicilina, las cefalosporinas de primera generación y débilmente los carbapenems; no hidrolizan las cefalosporinas de tercera generación ni el aztreonam. (14)

En Colombia se reportó la primera OXA-23 en (*A. baumannii* en el 2007.) Las MBL requieren, generalmente, zinc como cofactor. Estas enzimas generan resistencia en un amplio rango de bacterias Gram negativas, incluso en la familia Enterobacteriaceae, como *Serratia marcescens*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* y *E. coli*, pero también en *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. Las principales familias de las MBL son las IMP y las VIM, las cuales, a pesar de su baja similitud en secuencia de aminoácidos, comparten características hidrolíticas muy afines. (14)

La información genética de las MBL es usualmente transportada en integrones en asociación con casetes genómicos, los cuales, generalmente, incluyen información para enzimas modificadoras de aminoglucósidos Las SIM, SPM y GIM son otras de las familias de MBL. Dentro de las MBL, se han reportado brotes, especialmente en *P. aeruginosa* portadora de VIM en Estados Unidos, Europa y Suramérica. En Colombia se ha encontrado la VIM-8 y VIM-2 en *P. aeruginosa*.(14)

Microorganismos de interés clínico.

Staphylococcus aureus.

Es una bacteria capaz de sobrevivir en condiciones adversas, coloniza fácilmente las superficies cutáneas e invade los tejidos, por lo que los cuadros clínicos que podemos encontrar más frecuentemente ocasionados por este microorganismo son infecciones de piel, anexos cutáneos y tejidos blandos, otitis, osteomielitis, artritis, neumonía y sepsis

El pronóstico de las infecciones por *S. aureus* cambió sustancialmente con la introducción de la penicilina, pero pronto se aislaron cepas productoras de penicilinas; la transmisión

por plásmidos de esta resistencia favoreció su propagación, siendo en el momento actual más del 90% de las cepas, tanto extra como intrahospitalarias, resistentes por este mecanismo. La aparición de meticilina y otras penicilinas y cefalosporinas resistentes a penicilinas, pareció resolver el problema un tiempo, pero pronto empezaron a aparecer cepas meticilin-resistentes, que a nivel clínico se asocian también con resistencia a múltiples antibióticos (penicilinas, cefalosporinas, macrólidos, lincosamidas, amino glucósidos y fluoroquinolonas), permitiendo escasas alternativas terapéuticas. Esta resistencia, que puede aparecer en casi el 20% de los aislados. (15)

***Escherichia coli* y otras enterobacterias.**

E. coli se aísla casi en el 90% de los casos de infección del tracto urinario (ITU) adquirida en la comunidad, seguido de *Klebsiella*, *Proteus* y *Enterococcus*. El tratamiento empírico de estas infecciones deberá instaurarse (tras la historia clínica, exploración y recogida de una muestra de orina para cultivo y sedimento), basándose en las tendencias estadísticas de los gérmenes y las sensibilidades del área de influencia. En líneas generales más del 90% de las cepas de *E. coli* y de otras enterobacterias aisladas en ITU extra hospitalarias son sensibles a cefalosporinas de 2.a y 3.a generación, pero al menos el 50% son resistentes a amoxicilina y cotrimoxazol. Puesto que la mayor parte de las resistencias a amoxicilina lo son por producción de betalactamasa, si se añade ácido clavulánico a la amoxicilina como inhibidor de betalactamasas, el porcentaje de sensibilidad sube a un 90% , sin embargo es importante recordar que los inhibidores de betalactamasas actúan como inductores de cefalosporinasas, aunque en cualquier caso las combinaciones de amoxicilina-clavulánico y ampicilina-sulbactam representan la oportunidad de poder seguir utilizando amino penicilinas para el tratamiento de infecciones causadas por enterobacterias. (15)

En cuanto a las quinolonas la resistencia de cepas de *E. coli* aisladas en infecciones urinarias ha aumentado paulatinamente, estando relacionada con la edad del paciente, llegando hasta el 50% en los mayores de 65 años que tienen recidivas de infección. (15)

Cuando la decisión es empírica es necesario meditar la actitud terapéutica ante infecciones urinarias o que tengan allí su origen, siendo necesario determinar la sensibilidad en el laboratorio para tratamientos largos o de enfermedad grave, si ha habido fracaso terapéutico, o si el paciente ha recibido tratamientos previos con quinolonas (15).

Potencia de antibióticos

Definición

Es la evaluación de la actividad (potencia) de un antibiótico, el efecto medido es la inhibición del crecimiento de una cepa apropiada de microorganismo, este debe ser demostrado bajo condiciones adecuadas y controladas durante toda la prueba.

La potencia debe ser una propiedad o atributo definible y medible para un producto biológico o semisintético, y debe estar presente en los estudios de estabilidad, con el ánimo de verificar la conformidad del producto en lo que respecta a su calidad. (13)

La actividad o potencia de un antibiótico puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia. Si se prueban las muestras en diferentes concentraciones se puede determinar una concentración inhibitoria mínima del antibiótico hacia ese microorganismo. (14)

Clasificación

Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos.

Métodos cuantitativos

Son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración Inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM). Entre estos métodos se encuentran la técnica de micro dilución y la técnica de dilución. (15,16)

CIM

Es la mínima concentración de antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inhibir el crecimiento in vitro de un inóculo bacteriano previamente estandarizado. (15,16)

CBM

La mínima concentración de un antibiótico que en un período de tiempo predeterminado, es capaz de inducir la muerte in vitro del 99.9% de una población bacteriana previamente estandarizado (17)

Método de dilución

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) y la concentración mínima inhibitoria (MIC), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (MBCs) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos. En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o micro placas (micro dilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la MIC es determinada después de la incubación. (18)

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración del antibiótico a evaluar, luego se inoculan con el

microorganismo en estudio y se incuban por 18-24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar. (18)

Métodos de micro dilución.

Los métodos de micro dilución en caldo son una técnica útil para determinar MIC, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático. (19)

Métodos cualitativos

Son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente. Este es uno de los métodos más utilizados en la práctica diaria. Dentro de los métodos cualitativos se encuentra la técnica de difusión en agar. (20,21).

Difusión en agar o en placa

Este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser sencillo, barato y de fácil control, estandarización y que es indicado para microorganismos no exigentes. Se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. El antibiograma por disco difusión basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, es uno de los métodos que el NCCLS recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antibióticos. (20,21).

El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cualitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de

crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia. (20,21).

Planteamiento del problema

En la actualidad el mayor reto al que se enfrenta la medicina moderna para controlar las enfermedades infecciosas es la aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos utilizados cotidianamente, esto se ha convertido en un problema de salud pública mundial como claramente lo ha expuesto OMS, así lo deja ver el primer informe mundial sobre la resistencia a los antibióticos presentado el 30 de abril de 2005 en Ginebra Suiza, con datos de más de 114 países, revelando que esta grave amenaza ha dejado de ser una simple previsión para el futuro, para convertirse en todas las regiones del mundo en una realidad que afecta a cualquier persona, sin importar la edad en cualquier país.(22)

Sobra decir por lo anterior, que es de suma importancia la investigación de nuevos antibióticos para combatir esta problemática en el mundo, para dar una idea del nivel de importancia que ha tomado la investigación de medicamentos en el mundo se estima que en 1980, las empresas estadounidenses gastaron un total de 5,5 millones de dólares en investigación y desarrollo de productos farmacéuticos y medicamentos, de acuerdo con la National Science Foundation .Para 2003, esa cifra había crecido a más de 17 mil millones de dólares un aumento promedio del 5 por ciento por año en términos reales y esto sin contar con el estímulo nacional que los países invierten en investigación y desarrollo, se calcula que el gobierno federal gastó más de 25 mil millones de dólares en actividades de investigación y desarrollo en el 2005 (23).

Lastimosamente no todos los medicamentos en desarrollo llegan a feliz término un artículo de 2012 en *Nature Reviews Drug Discovery* dice que el número de medicamentos

inventados por cada 1,000 millones de dólares invertidos en inversión y desarrollo se ha reducido a la mitad de cada nueve años a lo largo de medio siglo.(24)

Debido a esto lo que se puede esperar en los años venideros es la “gran formula” de menos medicamentos a alto costo, lo que aumentará la problemática de control de enfermedades infecciosas, por el simple hecho de que los medicamentos serán menos accesibles para el común de las personas; este problema se agudiza en países como Colombia, donde el ingreso per capital es de 8.300 dólares(25) y donde el sueldo de la gran mayoría de personas no supera el millón de pesos.

Como se puede prever el panorama para la inmensa mayoría de Colombianos tendrán una accesibilidad precaria a medicamentos innovadores (se entiende como medicamento innovador aquellos medicamentos que son por las industrias farmacéuticas en su proceso de investigación y desarrollo) desarrollados en el primer mundo.

En Colombia el uso de medicamentos innovadores se ve disminuido cada vez más por el costo y este siendo desplazado por los medicamentos genéricos (versión del medicamento innovador que demostró mediante pruebas de bioequivalencia, que tiene idéntica acción terapéutica y seguridad(26) hasta el punto de que en noviembre de 2010, por medio de la Resolución gubernamental numero 4377 el Ministerio de Protección social de Colombia determinó que todos los médicos del sistema de salud del país recetados a los pacientes deben ser medicamentos genéricos.(27) la principal razón de esto es que la diferencia de precios entre innovadores y genéricos es de 100 pesos a 25 pesos(28) generando un gran ahorro a la nación.

Es en este punto sustancial donde la presente investigación cobra importancia porque los medicamentos genéricos se encuentran rodeados por una gran cantidad de mitos y creencias populares que los desprestigian, se piensa que son medicamentos inseguros, de baja potencia de, baja calidad y que ponen en riesgo la salud del paciente todos estos mitos se amparan en la creencia de que a “mayor costo, mayor eficiencia”.(29).

Pero como hacer para desmentir estos mitos y creencias. Pregunta de investigación: ¿Cómo se podrá evaluar y/o comparar la actividad antimicrobiana de los antibióticos genéricos y antibióticos innovadores? ¿Cuáles serán las diferencias y similitudes entre los antibióticos genéricos y los antibióticos innovadores? Y ¿qué efectos tendrá los antibióticos genéricos y antibióticos innovadores frente a patógenos clínicos?

Objetivos

Objetivo general.

Elaborar un protocolo para la comparación de antibióticos genéricos y antibióticos innovadores con cepas de pacientes de cuidados intensivos

Objetivos específicos

- Establecer las diferencias y similitudes de meropenem genérico y meropenem innovador con el protocolo establecido
- Desarrollar la metodología propuesta frente a *E. coli*, y *S. aureus*, cepas de interés clínico aisladas en el hospital universitario *San Ignacio*.

Justificación

La importancia que ha cobrado la utilización de los medicamentos genéricos en la última década, en nuestro caso específico los antibióticos, ha generado la necesidad de demostrar su eficacia frente a cepas resistentes y su equivalencia en calidad, potencia y efectividad frente a los antibióticos innovadores.

Al ser los antibióticos una herramienta de uso recurrente en clínicas y hospitales esta necesidad se convierte en una necesidad prioritaria para la salud pública, para esto se ha realizado este estudio de investigación el cual tiene como objetivo principal cubrir la necesidad de demostrar la equivalencia en calidad, potencia y efectividad de los antibióticos genéricos frente a cepas de interés clínico.

Este objetivo se llevara a cabo mediante la elaboración de un protocolo sencillo frente a cepas de interés clínico que demostrara que los antibióticos genéricos poseen la misma eficacia que los antibióticos innovadores frente a cepas resistentes porque la mejor manera de demostrar su equivalencia es utilizándolos en una prueba donde el medicamento tanto genérico e innovador se prueben en igualdad de condiciones frente a cepas recurrentemente vistas en clínicas y hospitales.

Enfoque de investigación

Cuantitativo, experimental.

Población: Cepas bacterianas resistentes del hospital san Ignacio de pacientes de cuidados intensivos.

Tipo de muestreo: No probabilístico, por conveniencia

Muestra: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión

Las cepas deben tener las siguientes características: Pureza hace referencia a que la cepa de la muestra posean las mismas características microscópicas, de tinción de Gram y de bioquímica reportados en la literatura para cada microorganismo.

Cinética hace referencia a que la cepa bacteriana presenta un comportamiento óptimo de crecimiento en el medio empleado en una curva de crecimiento de 12 horas. (Medio Mueller Hinton).

Trazabilidad hace referencia a la posibilidad de saber de dónde proviene la cepa utilizada nombre del paciente, tipo de infección, forma de almacenamiento en el cepario.

Criterios de exclusión.

En el presente estudio no se tuvieron criterios de exclusión, debido a las cepas tan ***específicas*** que se evaluaron

Cuadro de variables.

Las variables son las siguientes: Concentración y crecimiento.

Variable	Definición operativa	Naturaleza	Unidad de medida
Crecimiento	si hay o no turbidez después de 48 horas incubado a 37°C	cuantitativa/de razón/politómica	turbidez : creció no hay turbidez : no creció
Concentración	cantidad de antibiótico pesado dividido en la cantidad de líquido utilizado para reconstituir	cuantitativa/de razón/politómica	ug/ml: microgramo sobre mililitro

Instrumento de recolección de información.

La información de las variables se recolectará por medio del procedimiento para la evaluación de los antibióticos posteriormente en este documento será descrito.

Procedimiento

Materiales

Microorganismos

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*

Reactivos

- Caldo Mueller Hinton
- Agar Nutritivo
- Antibiótico innovador Meropenem
- Antibiótico genérico Meropenem

Equipos

- Microscopio
- Espectrofotómetro
- Nevera
- Incubadora
- Balanza digital
- Balanza analítica
- Material de vidrio (Erlenmeyer, probetas, balones aforados, frascos Schott, pipetas)
- Autoclave
- Asas
- Espátulas

Metodología

Pureza, Cinética y viabilidad

Para determinar la pureza de las cepas se le realizó coloración de Gram a cada una de ellas y se observaron las láminas en el microscopio comprobando su morfología.

Para la cinética y viabilidad de las cepas se realizó el siguiente procedimiento: En condiciones estériles se preparó un cultivo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en Erlenmeyer de 250 ml con caldo Mueller Hinton (el caldo se elaboró según especificaciones del proveedor), los cultivos se mantuvieron con agitación mecánica a 150 rpm y a una temperatura de 37°C durante 12 horas. Se tomaron 3ml de muestra a las horas 0, 2, 6, 10 y 12, las cuales fueron analizadas por absorbancia en un espectrofotómetro a 540nm.

Estandarización del inóculo

Para la estandarización del inóculo se realizaron y compararon 2 procedimientos:

El primero consistió en llevar un inóculo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* al patrón 0,5 de mcfarland que posee una concentración bacteriana aproximada de 1.5×10^8 bacterianas por ml. (550nm que equivale aproximadamente a – 0.125 unidades de absorbancia).

En el segundo procedimiento se inóculo en caldo Mueller Hinton *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se incubó a 35°C por 150 rpm tomando 3ml de muestra a las horas 0,2,4,6,8 las cuales fueron analizadas por absorbancia en un espectrofotómetro a 540nm. (Se realizó otra prueba con este mismo procedimiento sin agitación)

Control del inóculo.

Se tomó una azada del inóculo y se sembró en una caja de Petri con agar nutritivo, se incubó durante 24 horas y posteriormente se realizó una coloración de Gram para evidenciar la pureza del inóculo.

Preparación de los antibióticos.

Para el presente estudio de los antibióticos se prepararon a medida que se necesitaron. La preparación de los antibióticos fue según las especificaciones del proveedor, para los 2 antibióticos la reconstitución del antibiótico se realizó con agua destilada y estéril.

Estandarización de las concentraciones evaluadas

Para la estandarización de las concentraciones a evaluar del antibiótico, se realizó la técnica de dilución en caldo en la cual se adicionó 1 ml de la concentración de antibiótico a evaluar y 1ml de inóculo previamente estandarizado en 8 ml de caldo Mueller Hinton, se incubó por 24-48h y se observó el crecimiento microbiano por turbidez.

Las concentraciones evaluadas preliminarmente para la prueba fueron 1ug/ml, 10ug/ml, 100ug/ml, 500ug/ml, 1000ug/ml, 2500ug/ml, 5000ug/ml y 10000ug/ml

Procedimiento para la evaluación de los antibióticos.

Una vez establecidas las concentraciones se realizaron y compararon 2 procedimientos para evaluar y comprar la eficacia de los antibióticos frente a los microorganismos.

- El primero consistió agregar a una placa de 12 pozos la concentración de antibiótico a evaluar en cada pozo desde el A1 al A10 (figura 2) (previamente se establecieron las concentraciones) de tal manera que la concentración más alta evaluada se encuentre en el pozo A1 y la menor en el A10 y que decrezca la concentración a medida que se avanza en los pozos es decir el pozo A1 tiene una mayor concentración de antibiótico que el pozo A2 y este a su vez tiene mayor concentración de antibiótico que el pozo A3 y así sucesivamente, posterior a esto se completó a un volumen final de 3ml en el cual se agregó 1 ml de inóculo y el resto en caldo Mueller Hinton.
- El segundo procedimiento es en una placa de 12 pozos se adicionaron 1.5ml de caldo Mueller Hinton en cada uno de los pozos, posteriormente se agregaron 1.5ml de antibiótico a evaluar en el pozo A1, posterior a estos se realizaron diluciones seriadas en base 1:2 para disminuir la concentración del antibiótico. Para lo cual se tomaron 1.5ml del pozo A1 y se trasladaron al pozo A2, se homogeniza y se retira nuevamente 1.5ml del pozo A2 y se pasaron al pozo A3 y así sucesivamente hasta llegar al pozo A11, dando como resultado la disminución de la concentración del antibiótico en cada pozo debido a la diluciones realizadas, del pozo A11(control positivo) se sacaron 1.5ml y se descartaron, por último se adiciona 1.5ml del inóculo (Previamente estandarizado) en todos los pozos excepto en la A12(control negativo) todos los pozos quedaran con un volumen final de 3 ml. (Figura 2.). En los dos procedimientos se consideraron controles de crecimiento del inóculo (control positivo) y control del antibiótico (control negativo), con el propósito de buscar una mayor claridad en la lectura por turbidez de la prueba se

desarrolló el mismos procedimientos cambiando los volúmenes finales (2.ml, 4.ml, 6.ml, 8ml) y manteniendo las proporciones iniciales.

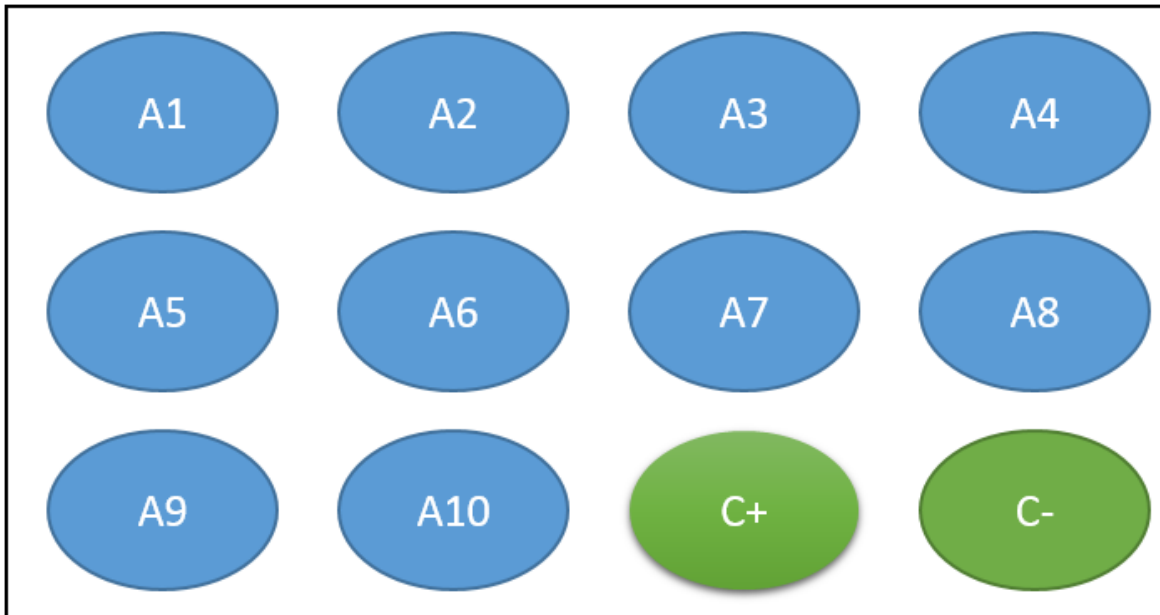


Figura 4.Esquema del procedimiento a realizar.

Incubación y lectura de las placas

Para determinar el tiempo óptimo de incubación y lectura de las placas, se incubaran a 37°C y se leerán las placas a las 24, 48,72 y 96 horas por turbidez y espectrofotometría a 610 nm, además la incubación se realizara con agitación a 150rpm y sin agitación.

RESULTADOS Y DISCUSION

Pureza, cinética y viabilidad

Se determinó la pureza de las cepas, ya que al realizar las coloraciones de Gram los resultados de las características microscópicas concordaron con lo reportado en la literatura para cada microorganismo además concuerdan con las fichas técnicas entregadas por el cepario de la universidad javeriana.

Microorganismos	Características microscópicas
<i>Escherichia coli</i>	Bacilo Gram negativo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram positivos

Tabla 1. Características microscópicas de *E. coli* y *S. aureus*

En cuanto a la cinética y viabilidad de las cepas, en la curvas de crecimiento se puede observar un crecimiento exponencial de todas las cepas, lo cual indica que los microorganismos son viables y presentan un comportamiento óptimo en el medio empleado y son aptas para el trabajo a realizar.

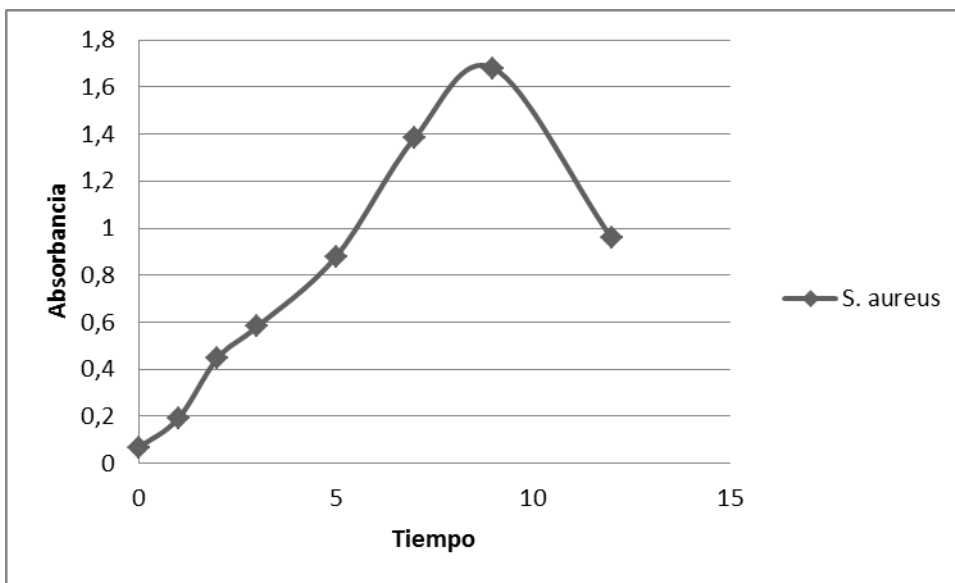


Figura 5. Curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en Caldo Muller Hinton.

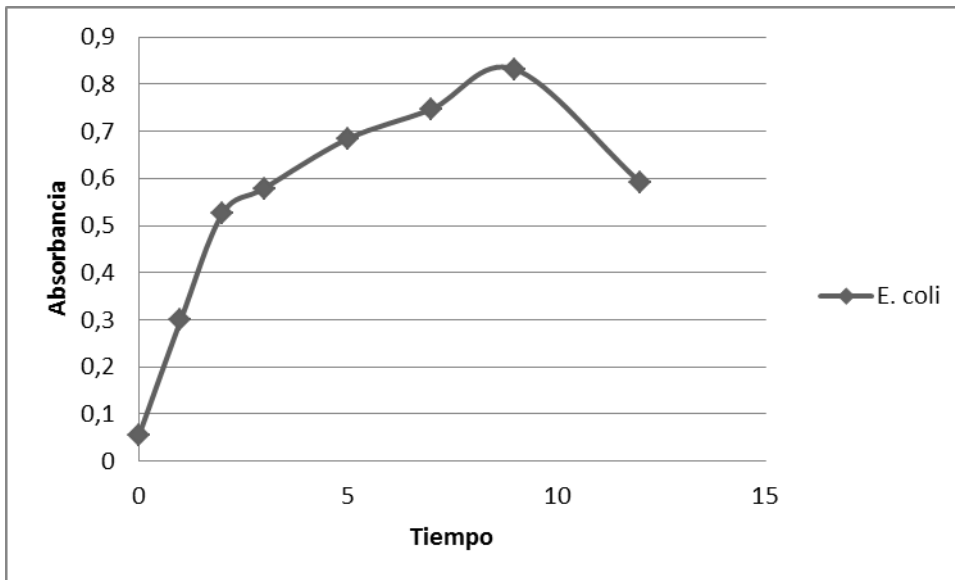


Figura 6. Curva de crecimiento de *Escherichia coli* en caldo Muller Hinton.

Estandarización del inocularo

El objetivo principal de este punto era buscar la mejor combinación de factores que nos permitiera mayor rapidez y homogenización en la concentración de microorganismos en la prueba, para esto se realizaron dos procedimientos como anteriormente se mencionó, en primer procedimiento consistía en llevar un inocularo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a el patrón 0,5 de mcfarland (550nm – 0.125) resultó bastante simple, rápido y homogéneo debido a que el procedimiento se basaba en tomar asadas de una caja Petri y agregarlas a un tubo de 16 x150 cm tapa rosca con caldo Mueller Hinton hasta llegar al patrón 0.5 de mcfarland ,pero al utilizar este inocularo en las pruebas preliminares observamos que presentaba una irregularidad en el crecimiento de las pruebas en algunas placas la prueba se desarrollaba como se esperaba y en otra no, debido a esto este procedimiento fue descartado para utilizarlo en las pruebas posteriores, por otro lado el segundo procedimiento aunque más lento pero igual de simple dejo mejores resultados, este procedimiento consistía en inocular en caldo Mueller Hinton *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* incubarlo a 35°C por 150 rpm tomando 3ml de muestras a las

horas 0,2,4,6,8 las cuales fueron analizadas por absorbancia en un espectrofotómetro a 540nm. Los resultados obtenidos en las pruebas preliminares fueron satisfactorios en las horas 4 y 6 mientras que en los otros resultados en las horas 2 y 8 insatisfactorios, en la hora 8 el principal problema que tuvimos fue que el crecimiento de los inóculos eran muy alto, *Escherichia coli* estaba alrededor de 1 a 550nm a la hora y *Staphylococcus aureus* alrededor de 0.8 a 550nm además al ser agregados en las placas de la prueba se observa mucha turbidez lo cual podría generar confusiones en la posterior lectura de la prueba como se observa en la figura 7.

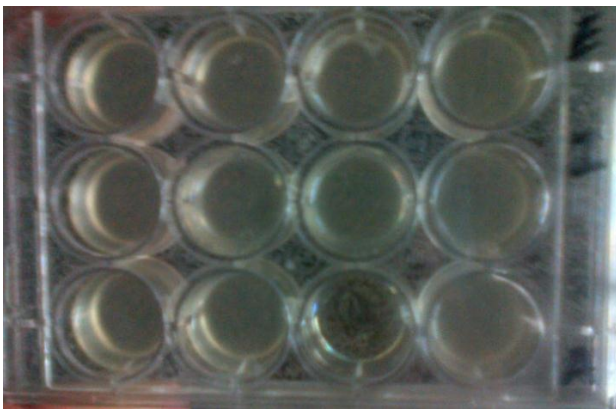


Figura 7. Estandarización del inóculo hora 8

En relación a la hora dos pudimos observar que *Staphylococcus aureus* se encontraba debajo del patrón 0.5 de mcfarland debido a esto se descartó esta hora para utilizarla para la estandarización del inóculo, por otro lado la hora 4 era perfecta para el inóculo de *Staphylococcus aureus* dado que se encontraba alrededor de 0.175 a 0.2 solo un poco más arriba que el patrón 0.5 de mcfarland, pero por el lado *Escherichia coli* a la hora 4 el inóculo se encontraba entre alejado del patrón 0.5 de mcfarland y estaba alrededor de 0.3 a 0.35 lo que indicaba que el inóculo de *Escherichia coli* necesitaba menos tiempo, con relación a la hora 6 paso algo similar con la hora 6 el inóculo se encontraba muy crecido, aunque no genere turbidez en la hora 0 como sucedió en la hora 8 y daba buenos resultados en las pruebas preliminares, debido a practicidad en el desarrollo de la prueba se eligió la hora 4 como estándar para el inóculo para los 2 microorganismos dado

Staphylococcus aureus y *Escherichia coli* se encontraban activas con un buen crecimiento y generaba pruebas satisfactorias.

Estandarización de las concentraciones evaluadas

El objetivo principal de este segmento del trabajo, es identificar el mejor rango de concentración que nos permitiera evaluar y visualizar el efecto de los antibióticos frente a las cepas elegidas; para esto en la prueba se emplearon concentraciones en un rango de 1 a 1000ug/ml, tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Escherichia coli*. Las concentraciones evaluadas preliminarmente fueron 1, 10, 100, 500, 1000, 2500, 5000,10000 ug/ml para los 2 microorganismos, *Staphylococcus aureus* presento una inhibición en las concentraciones superiores a 1000 ug/ml y creciendo en las concentraciones inferiores de 500 ug/ml, mientras que *Escherichia coli* presento inhibición en los rangos superiores a 1000 es decir en las concentraciones 2500 ,5000 y 10000 ug/ml y presento crecimiento en los rangos inferiores a 1000ug/ml y en esta misma concentración como podemos ver en la tabla 3, estos resultados son coherentes con la información encontrada en la literatura, la cual informa que las bacterias gram negativas poseen un mayor arsenal de formas para contrarrestar los antibióticos que las bacterias Gram positivas, algunos de los mecanismos de resistencias en las bacterias Gram negativa son las β -lactamasas tipo *AmpC* y la β -lactamasas de espectro extendido (BLEE),modificación enzimática del antibiótico, alteraciones del sitio de acción, cambios en la permeabilidad de la membrana externa, bombas de salida, modificación enzimática del antibiótico, mientras que la resistencia a β -lactamicos en microorganismo Gram positivos puede ser debido a 2 mecanismos , la acción de las β -lactamasas y la modificación de las PBP. En el caso de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* presenta una mayor resistencia debido a las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales confieren resistencia a las oximinocefalosporinas (como las cefalosporinas de tercera generación) y *Staphylococcus aureus* no presenta esta enzimas solo posee β -lactamasas las cuales se diferencian de las β -lactamasas de las Gram negativas e hidrolizan a este

antibiótico pero presentan menos resistencia a las cefalosporinas de tercera generación(30)(31).

<i>Staphylococcus aureus</i>								
Concentraciones de antibiótico	1ug/ml	10ug/ml	100ug/ml	500ug/ml	1000ug/ml	2500ug/ml	5000ug/ml	10000ug/ml
Crecimiento microbiano	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>								
Concentraciones de antibiótico	1ug/ml	10ug/ml	100ug/ml	500ug/ml	1000ug/ml	2500ug/ml	5000ug/ml	10000ug/ml
Crecimiento microbiano	+	+	+	+	+	-	-	-

+: Crecimiento -: No hay crecimiento

Tabla 2. Resultado de las concentraciones evaluadas de antibiótico frente a *S. aureus*, *E. coli*

Aunque en rango de concentraciones de antibióticos a evaluar nos permitió preliminarmente determinar en qué rango de concentraciones eran inhibidos los microorganismos, no era muy exacto dado que entre la última concentración de crecimiento y la de inhibición existen 500 ug/ml de diferencia como es en el caso de *Staphylococcus aureus* y 1500 ug/ml en el caso de *Escherichia coli*, debido a esto debimos buscar una mejor forma de evaluar los rangos de las concentraciones, la solución a este problema llego mediante la adaptación de un procedimiento utilizado por Tsukatani T y colaboradores en el años 2012, donde utilizaban un rango de concentraciones basado en diluciones 1:2, teniendo en cuenta este antecedente se determinó que el rango de concentraciones para el procedimiento seria de una concentración de 10ug/ml hasta 5000 ug/ml(Tabla 4)(32) la cual nos da un mayor exactitud en determinar la concentración de inhibición.

Rango de concentraciones a evaluar.									
5000 ug/ml	2500 ug/ml	1250 ug/ml	625 ug/ml	313 ug/ml	156 ug/ml	78 ug/ml	39 ug/ml	20 ug/ml	10 ug/ml

Tabla 3. Rango de concentraciones evaluadas frente a *S. aureus*, *E. coli*

Procedimiento para la evaluación de los antibióticos

El objetivo principal de este punto del trabajo es obtener la información necesaria para evaluar cuál es la mejor metodología que nos permita evaluar de forma óptima los antibióticos frente a cepas de interés clínico, para esto se compraron 2 procedimientos, el primero consistía en agregar las concentraciones de los antibióticos directamente al pozo sin realizar ninguna dilución y la segunda pretendía agregar la primera concentración y a partir de esta realizar diluciones en base 1:2 hasta llegar a la concentración más baja, los resultados obtenidos en los 2 procedimientos fueron los esperados dado que nos permitían visualizar en qué punto el antibiótico presentaba inhibición frente a la cepa y desde que punto no generaba inhibición, esto se lograba gracias a la turbidez que se podía visualizar en una concentración y en otra es decir si se encontró turbidez en el pozo A3 y en el pozo a A4 no se encontró se puede decir que el antibiótico es efectivo a la concentración del pozo A4 y concentraciones inferiores a esta no generan un efecto de inhibición en la cepa y se utiliza esta concentración de el pozo para comparar con el otro antibiótico, es decir que si en la placa del antibiótico genérico genero inhibición en el pozo A4 para que tenga un mismo comportamiento que el antibiótico innovador la placa de este debe generar inhibición en el mismo pozo dado que si genera en un pozo inferior A3 será mejor y si genera inhibición en un pozo superior A5 será peor, teniendo en cuenta estos parámetros no se pudo distinguir cuál de los 2 procedimientos es mejor ya que los 2 cumplen la función establecida, aunque en este proyecto y para fines de estandarizar la técnica se tomó como procedimiento a utilizar el 1 el cual no realiza diluciones en base 1:2, se escogió este procedimiento porque no deja duda de que se agregó antibiótico a la prueba duda que se podría objetar en el segundo procedimiento por las diluciones que se

realizan , por último y para tener una prueba confirmatoria y ayudar a despejar resultados dudosos se implementó en el procedimiento un repique confirmatorio en la prueba.

Incubación y lectura de las placas

El objetivo principal de este punto del trabajo es indagar y obtener la información necesaria para evaluar cuál es el mejor pull de opciones para obtener el mejor resultado en la lectura e incubación de las placas, para determinar el tiempo óptimo de incubación y lectura de las placas, se incubaron a 37°C y se leyeron las placas a las 24, 48, 72 y 96 horas por espectrofotometría a 610 nm, esto se realizó con el fin de determinar cuál es la hora óptima de lectura de las placas debido a que se reportó que un rango mayor en el tiempo de incubación prevendría errores en la determinación de la resistencia bacteriana en la prueba, dado que se pueden generar falsos positivos en determinadas concentraciones en las horas más tempranas de la prueba como sería a las 24 (33)(34) esto, fue evidente en el trabajo realizado ya que la prolongación en el tiempo de incubación logro mitigar errores en la determinación de la resistencia bacteriana; dado que al no haber prolongado el tiempo de incubación y haberse incubado únicamente durante 24 horas como el método CLSI indica(35), los valores de resistencia hubieran sido menores como se puede observar en las figuras 6 y 7, en donde la menor concentración que genero inhibición en *Staphylococcus aureus* a las 24 fue 320 ug/ml y a las 48 horas fue 640ug/ml debido a que la concentración inicial que genero inhibición en este caso, la de 320ug/ml a las 48 horas reporto crecimiento; en el caso de *Escherichia coli* los resultados fueron similares en donde a las 24 horas se reportó resistencia en 640ug/ml y a las 48 horas este ya presentaba resistencia dado como resultado una resistencia presente por *Escherichia coli* de 1280 ug/ml a las 48 horas , tanto *Escherichia coli* como en *Staphylococcus aureus* no presentaron cambio alguno en sus resistencias después de las 48 horas dando como resultado esta hora como la hora óptima a leer las placas; en cuanto a la agitación en la incubación de las placas se observó que no era relevante en los resultados de las placas dado que se obtuvieron los mismos resultados tanto con agitación que sin esta.

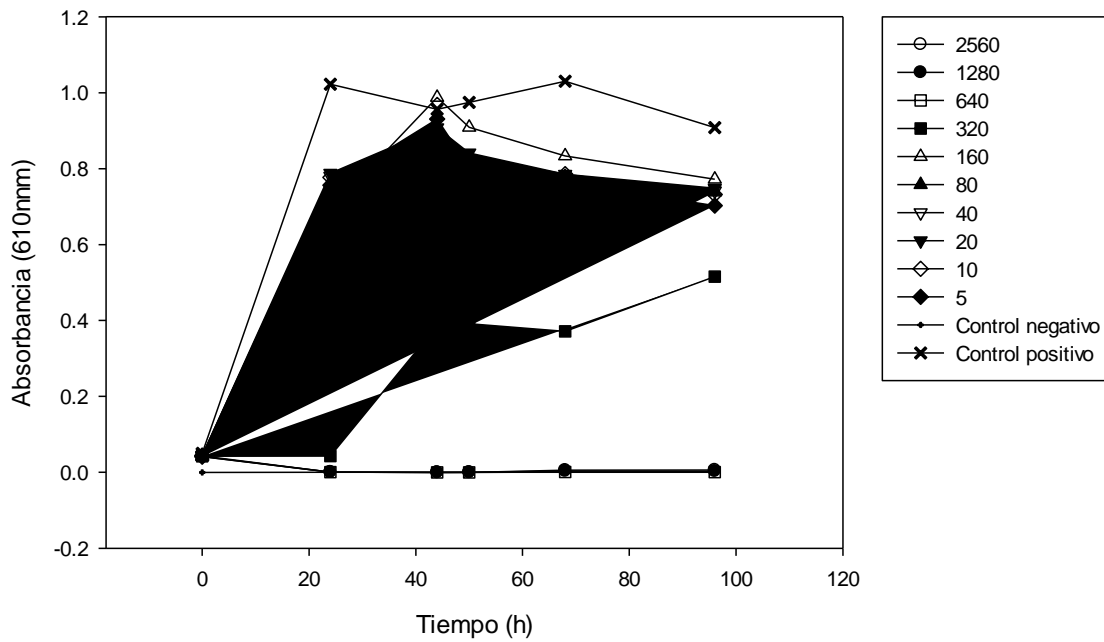


Figura 8. Comportamiento de *S. aureus* frente a diferentes concentraciones de Meropenem genérico.

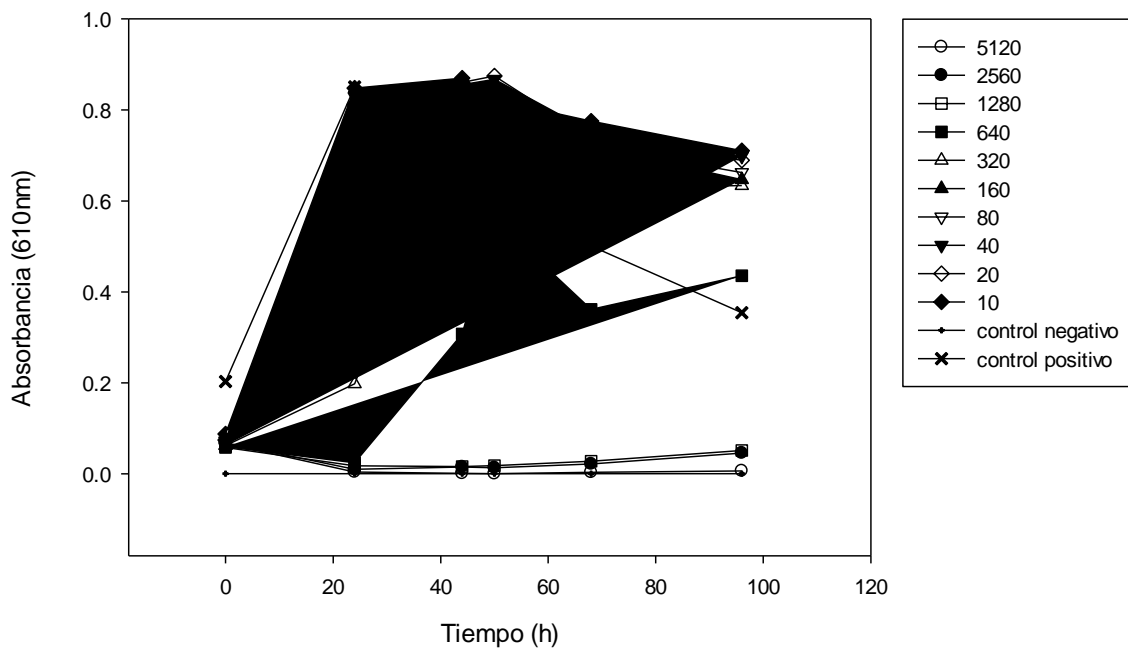


Figura 9. Comportamiento de *E. coli* frente a diferentes concentraciones de Meropenem genérico

Procedimiento estandarizado.

Después de establecer las mejores variables en los diferentes puntos evaluados nos dispusimos a unirlas y establecer un solo procedimiento el cual es (figura 10):

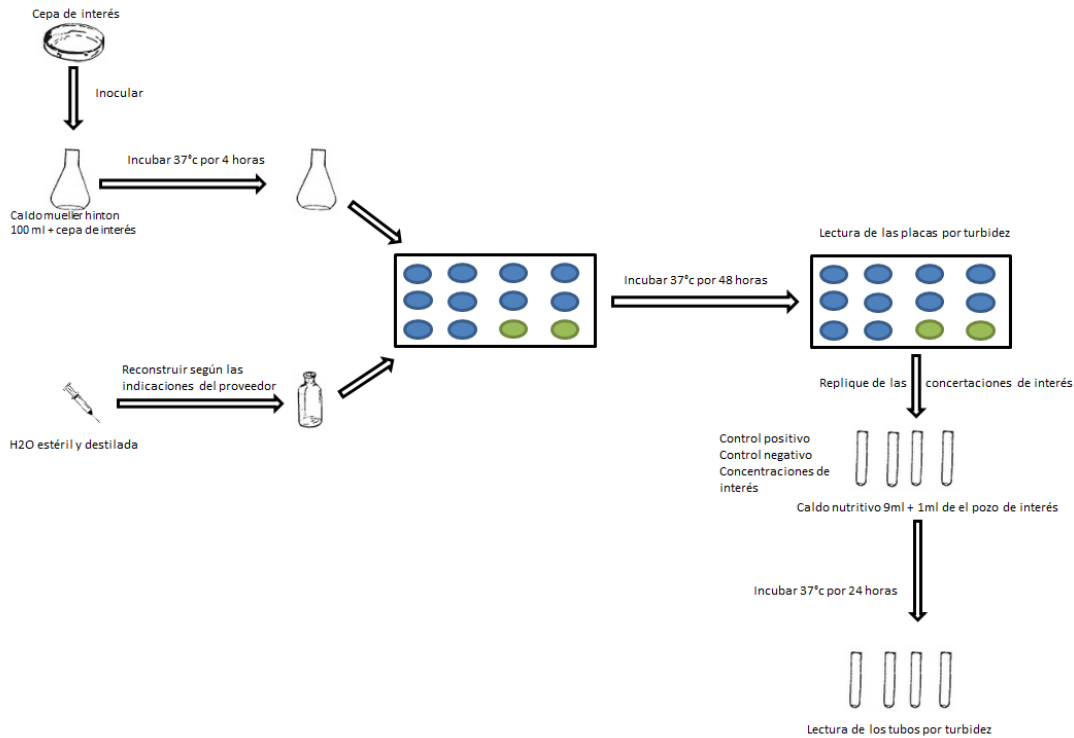


Figura 10. Esquema de protocolo para la evaluación y comparación de antibióticos

- Inocular de la caja de la cepa de interés a evaluar, una asada a un Erlenmeyer con 100 ml de caldo Mueller Hinton.
- Incubar el caldo Mueller Hinton a 37°C por 4 horas.
- Reconstituir del antibiótico a evaluar siguiendo las indicaciones del proveedor
- Agregar a una placa de 12 pozos la concentración de antibiótico a evaluar en cada pozo desde el A1 al A10 (Figura9), posterior a esto se completó a un volumen final de 3ml en el cual se agregó 1 ml de inóculo y el resto en caldo Mueller Hinton.
- Incubar la placa a 37°C por 48 horas.
- Leer las placas por turbidez

- Realizar repique de las Concentraciones que no presentes turbidez y/o resultados dudosos
- Agregar 1 ml de las concentraciones a replicar a 9 ml de caldo nutritivo en tubos 16x150.
- Incubar la placa a 37°C por 24 horas
- Realizar la lectura de los tubos por turbidez.

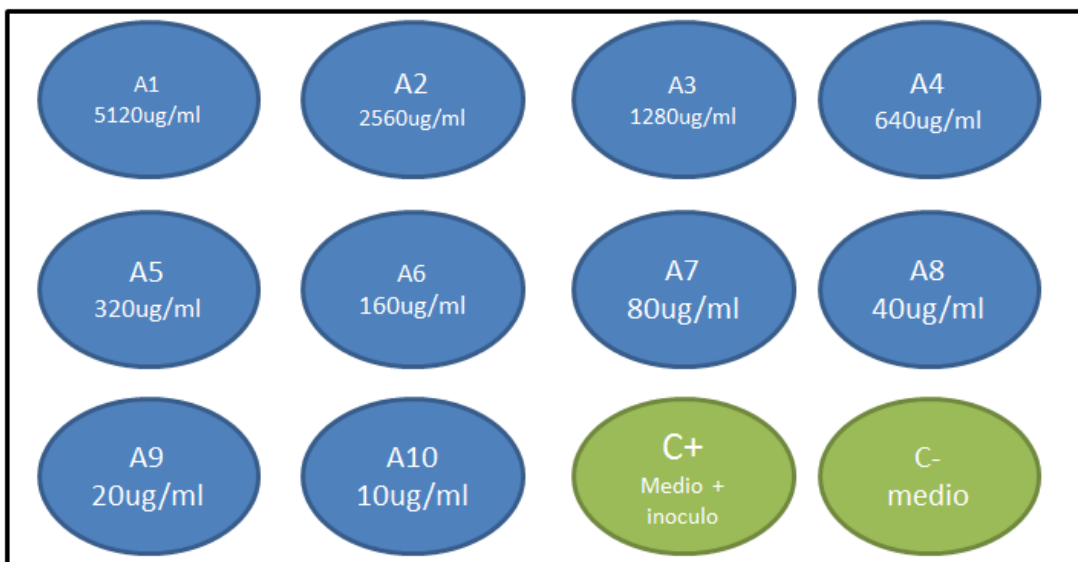


Figura 11. Esquema de concentraciones a utilizar

Desarrollo del procedimiento.

Una vez estandarizado el protocolo para la evaluación y comparación de los antibióticos, nos dispusimos a evaluarlo frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, se eligieron esta cepas teniendo en cuenta los antecedentes de estos microorganismos en las salas de cirugía y en la presencia de mecanismos de resistencia presentes por estos microorganismos ⁽³⁶⁾ (15).

Para este punto se elaboraron 20 réplicas desarrolladas por 2 analistas de las cuales 10 réplicas se realizaron con el antibiótico genérico, 10 réplicas con el antibiótico innovador por microorganismo para un total de 40 réplicas, de las cuales se obtuvo el siguiente resultado:

	Concentraciones a evaluar en ug/ml									
<i>Escherichia coli</i>	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
Analista 1 Generico	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0
Analista 1 Innovador	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0
Analista 2 Genérico	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0
Analista 2 Innovador	5	5	5	5	5	5	5	1	0	0

Tabla 4. Numero de réplicas con crecimiento en *Escherichia coli*

	Concentraciones a evaluar en ug/ml									
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
Analista 1 Generico	5	5	5	5	5	5	1	0	0	0
Analista 1 Innovador	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0
Analista 2 Genérico	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0
Analista 2 Innovador	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0

Tabla 5. Numero de réplicas con crecimiento en *Staphylococcus aureus*

Figura 12. Analista 1, genérico, *E.coli*



Figura 13. Analista 2, genérico, *E.coli*

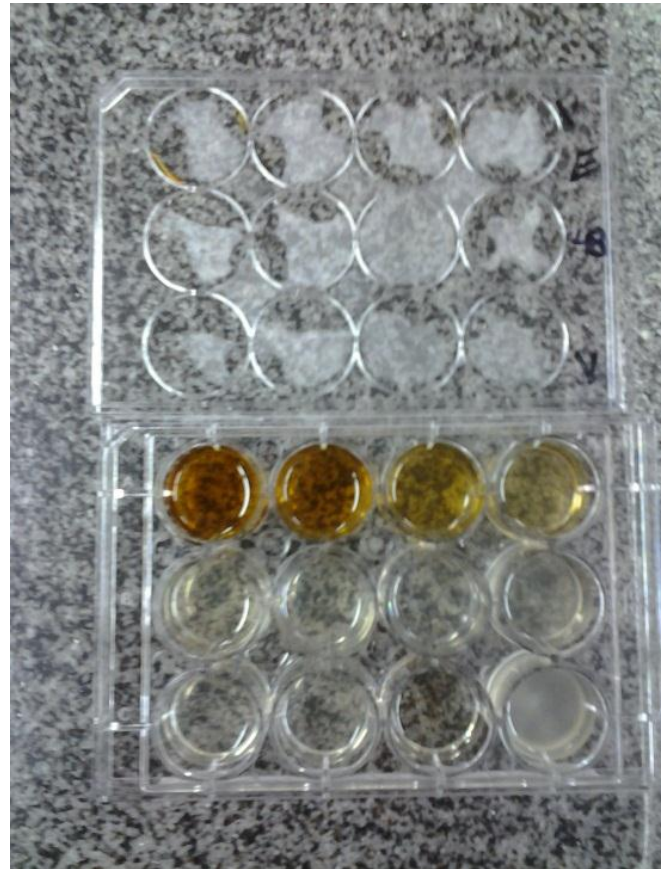


Figura 14. Analista 1, Innovador, *E.coli*



Figura 15. Analista 2, Innovador, *E.coli*



Figura 16. Analista 2, innovador, *S. aureus*, 24 horas

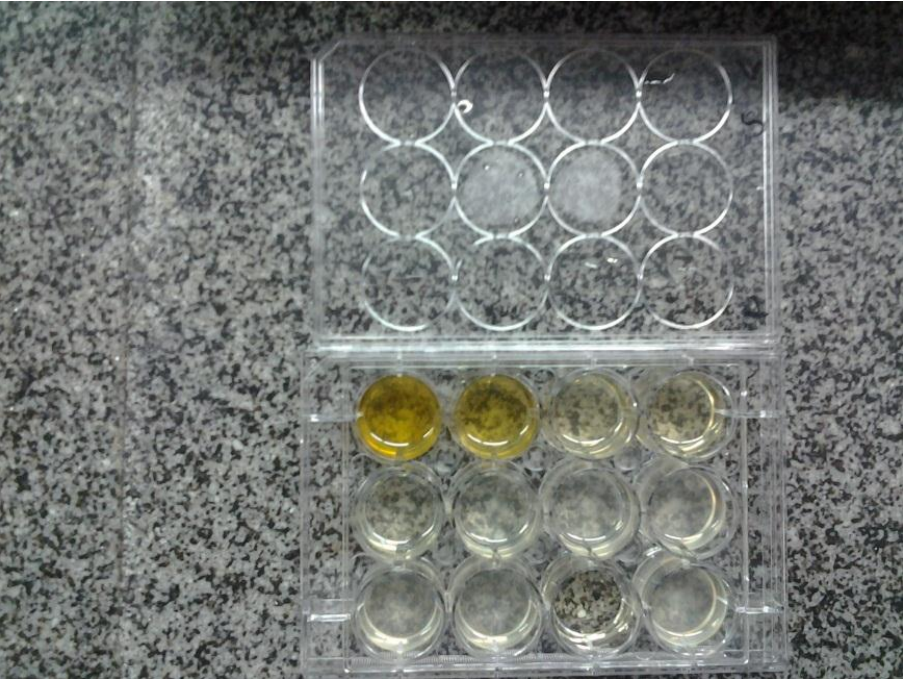


Figura 17. Analista 1, Genérico, *S. aureus*, 24 horas

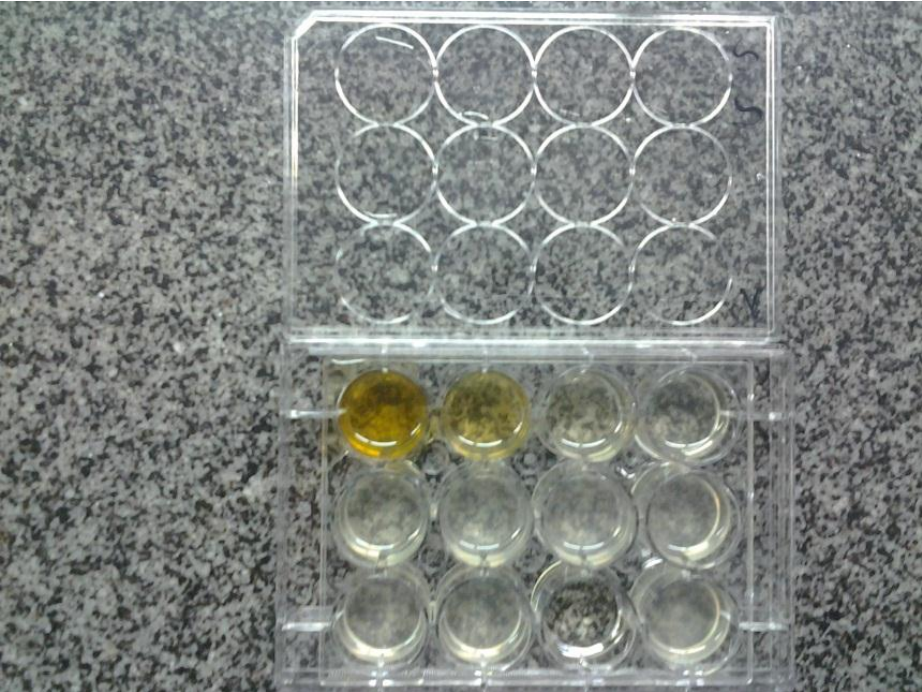


Figura 18. Analista 2, Genérico, *S. aureus*, 48 horas 48h

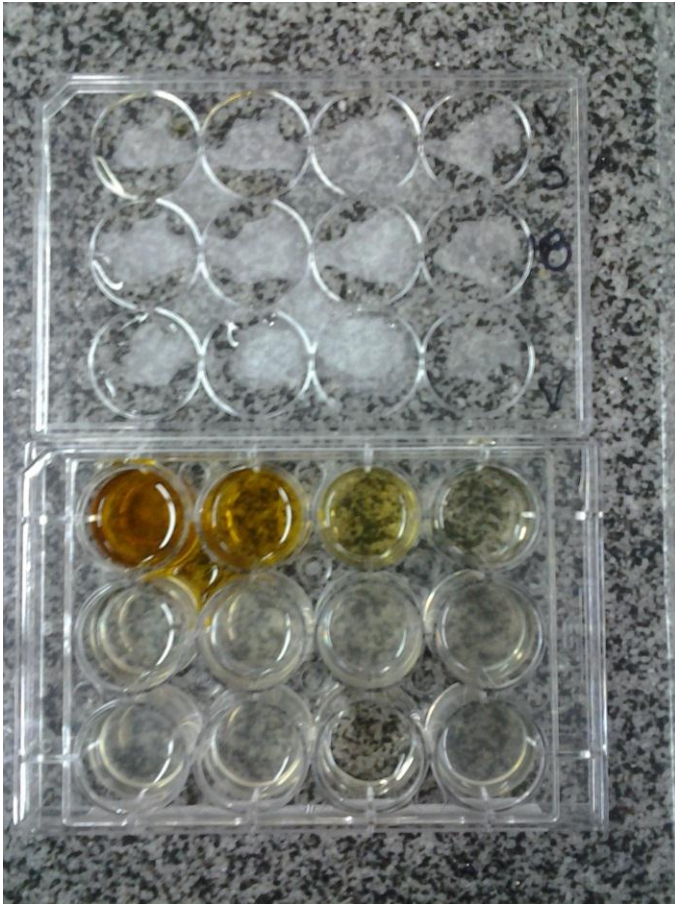
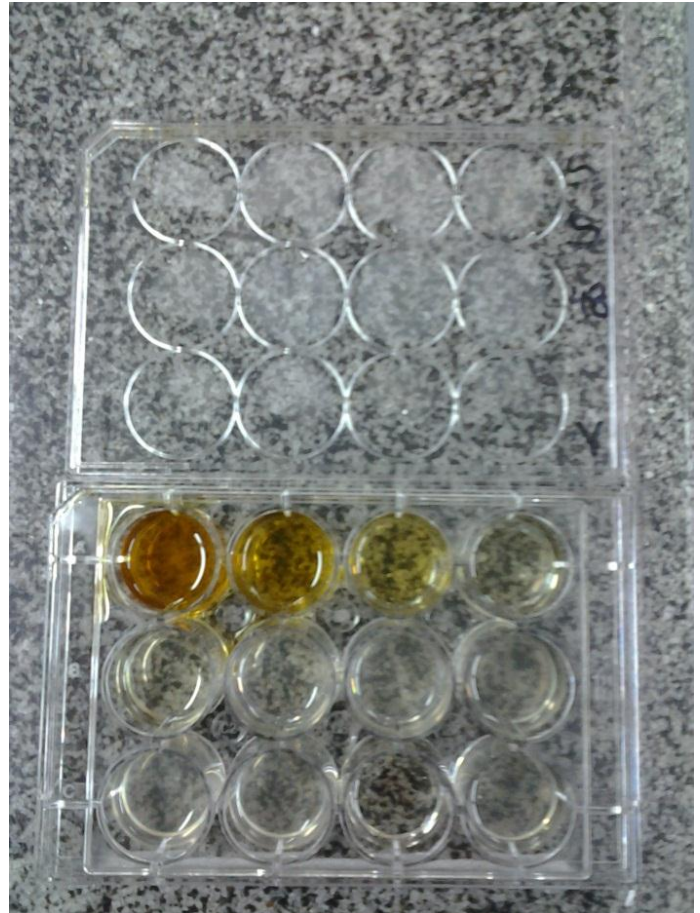


Figura 19. Analista 1, Genérico, *S. aureus*,



De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo corroborar que el 95% de los resultados obtenidos por las réplicas realizadas por los 2 analistas reafirmarían los resultados encontrados en el estudio anterior, lo cual indica que el porcentaje de inhibición de meropenem innovador y genérico para *E. coli* y *S. aureus* fue igual (Tabla 6).

Resultados presentados en el estudio anterior fueron obtenidos mediante el análisis estadístico de Tukey y Scheffé el cual muestra poca variación entre los resultados de la CMI y CMB de los antibióticos evaluados, para *E. coli* – genérico (0,3071) (0,0846) y para *E. coli* – innovador (0,5086) (0,0907) respectivamente. En cuanto a *S. aureus*- genérico (0,6671) (0,3057) y *S. aureus*- innovador (0,6788) (0,2671).

Microorganismo	% Inhibición Meropenem genérico	% Inhibición Meropenem innovador
<i>E. coli</i>	100%	100%
<i>S. aureus</i>	100%	99.25%

Tabla 6. Porcentajes de inhibición en el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y por la CMI de Meropenem genérico y Meropenem innovador.

Conclusiones.

- Se elaboró un protocolo rápido y sencillo que permitió Comparación y evaluar la actividad antimicrobiana del antibiótico genérico e innovador.
- De acuerdo a las pruebas realizadas se pudo observar que no hay diferencia entre los antibióticos evaluados en el desarrollo del protocolo
- De acuerdo a las pruebas realizadas se pudo observar que no hay diferencia entre los antibióticos antimicrobiana del antibiótico genérico y el antibiótico innovador frente *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*
- Se pudo corroborar los resultados del estudio anterior que indicaban que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los antibióticos meropenem genérico e innovador para los microorganismos evaluados son 320ug/ml para *Staphylococcus aureus*, 640ug/ml para *Escherichia coli*
- Se pudo corroborar los resultados del estudio anterior que indicaban que las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) establecidas fueron 640ug/ml para *Staphylococcus aureus* , 1280 ug/ml para *Escherichia coli*.

Bibliografía

1. Ahumada I, Santana L, Serrano J. *Farmacología practica*. Editorial Díaz de Santos. Madrid. España. 2002. Pag 244.
2. Lorenzo P, Moreno A, Lizosoain I, Leza J.C, Moro M.A, Portoles A. *Farmacología básica y clínica*. 18ª Edición. Editorial Medica Panamericana. Madrid, España. 2008. Pag 8-9.
3. Sheppard G, Donnenfeld F. *Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 2007. Pag 89-108.
4. Martinez J.A, Sanchez F. Mecanismo de accion de los antibióticos. *www.doyma.es/jano*. 2007:1660
5. Remington. *Remington Farmacia*. 20ª Edición. Editorial Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 2003. Pag 639
6. Mendoza N. *Farmacología Medica*. 1ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Mexico DF. 2008. Pag 616-617.
7. Jones RN, Huynh HK. Doripenem (S- 4661), a Novel Carbapenem: Comparative Activity against Contemporary Pathogens Including Bactericidal Action and Preliminary In Vitro Methods Evaluations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004; 54(1):144–54.
8. Brown SD, Traczewski MM. Comparative In Vitro Antimicrobial Activity of a New Carbapenem, Doripenem: Tentative Disc Diffusion Criteria and Quality Control. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005; 55: 944–9
9. Kimura T, Sunakawa K, Matsuura N. Population Pharmacokinetics of Arbekacin, Vancomycin, and Panipenem in Neonates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48(4):1159–67
10. Swabb EA. Review of the Clinical Pharmacology of the Monobactams Antibiotic Aztreonam. *The American Journal of Medicine*. 1985; 78(2A):8–11.
11. Ennis DM, Cobbs CG. The Newer Cephalosporins. Aztreonam and Imipenem. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1995; 9(3):687–713
12. Fresnadillo M.J, Garcia M.I, Garcia E, Garcia J.E. Los carbapenems disponibles: propiedades y diferencias. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 2010; **28:53-64**.
13. Resistencia bacteriana [Internet]. [cited 2014 Oct 16]. Available from: <http://med.javeriana.edu.co/publi/vniversitas/serial/v43n1/0026 Resistencia.PDF>
14. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. [cited 2014 Oct 16]; Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v12n3/v12n3a07.pdf>

15. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria [Internet]. [cited 2014 Oct 16]. Available from: <https://www.msssi.gob.es/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>
16. McDermott P, Bodeis-Jones S, Fritsche T, Jones R, Walker R, "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents." *Clinical Microbiology and Infection*. 2005; 43:6136
17. National committee for clinical laboratory. Methodology for the serum bactericidal test. Approved guideline. Document M21-A, in press. Naational committe for clinical laboratory standars, villanova, Pa.
18. Andrews JM. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 2001; 48(31):5
19. Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*. *Journal of Ethnopharmacolog*. 2004; 94(2-3):279
20. S.National Committee for Clinical Laboratory, "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar", *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa*. 1997: 17(1)
21. Hacek D, Dressel D, Peterson L. Highly Reproducible Bactericidal Activity Test Results by Using a Modified National Committee for Clinical Laboratory Standards Broth Macrodilution Technique", *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(6):1881
22. OMS | El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo [Internet]. World Health Organization; [cited 2014 Aug 13]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>
23. Office CB. CONGRESS OF THE UNITED STATES CONGRESSIONAL BUDGET OFFICE STUDY. 2006.
24. Desarrollar un nuevo medicamento cuesta 5,000 mdd - Forbes México [Internet]. [cited 2014 Aug 13]. Available from: <http://www.forbes.com.mx/sites/desarrollar-un-nuevo-medicamento-cuesta-5000-mdd/>
25. Ingreso per cápita en Colombia | Portafolio.co [Internet]. [cited 2014 Aug 13]. Available from: <http://www.portafolio.co/economia/ingreso-capita-colombia>
26. .Hecho de los medicamentos genericos [Internet]. [cited 2014 Aug 14]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/ResourcesForYou/Consumers/BuyingUsingMedicineSafely/UnderstandingGenericDrugs/UCM173764.pdf>

27. Médicos sólo podrán recetar productos genéricos | 20101102 [Internet]. [cited 2014 Aug 14]. Available from: <http://www.caracol.com.co/noticias/actualidad/medicos-solo-podran-recetar-productos-genericos/20101102/nota/1379617.aspx>
28. EL COLOMBIANO | [Internet]. [cited 2014 Aug 14]. Available from: http://www.elcolombiano.com/BancoConocimiento/S/salud_no_es_negociable_organizaciones_sociales/salud_no_es_negociable_organizaciones_sociales.asp
29. Meléndez P, Díaz J. comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Rev ... [Internet]. 2005 [cited 2014 Aug 13];34(2):193–208. Available from: <http://scienti.colciencias.gov.co:8084/publindex/docs/articulos/0034-7418/1/9.pdf>
30. Tafur J, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectologia*. 2008; 12: 217-226)
31. Sierra JM, Vila J. Mecanismos de acción y resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram-positivas. *Infec E Inmunol*. 2005;22–32.
32. Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Noguchi K, Ishiyama M, Ezoe T, et al. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J Microbiol Methods* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;90(3):160–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2012.05.001>
33. Aldridge K.E, Janney A, Sanders C.V, Marier R.L. Interlaboratory variation of antibiograms of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains with conventional and commercial testing systems. *Journal of Clinical Microbiology*.1983;**18**:1226–1236.
34. Boyce J.M, Lytle L.S, Walsh D.A. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by microdilution and disk elution susceptibility systems. *Journal of Clinical Microbiology*.1984; **20**:1068–1075
35. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution microbial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th edition M7-A7, USA, 2006
36. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftazidime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983; **11**: 315-317

