

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR EL
POLÍMERO ANFÍFILICO PAM -18 Na ASOCIADO A AMPICILINA EN CEPAS
DE *Staphylococcus aureus*.**

STEPHANY BARAJAS JORDÁN

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR EL
POLÍMERO ANFÍLICO PAM -18 Na ASOCIADO A AMPICILINA EN CEPAS
DE *Staphylococcus aureus*.**

STEPHANY BARAJAS JORDÁN

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

**ASESORES: ANDRÉS FELIPE DÁVALOS, M.Sc
CONSTAIN SALAMANCA, Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a Dios, porque me ha dado la fortaleza y la perseverancia necesaria para finalizar satisfactoriamente este trabajo de grado. A mi familia, por su apoyo incondicional y por estar presente en cada una de mis decisiones. A mi tutor y co-tutor de tesis, por orientarme y permitirme hacer parte del grupo de investigación, por el conocimiento que siempre compartieron conmigo y por todo el esfuerzo invertido a fin de trabajar en pro de este proyecto. A la Universidad Icesi, porque me ha brindado una formación integral, en el campo profesional y personal.

Stephany Barajas Jordán

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	4
CONTENIDO DE TABLAS	7
CONTENIDO DE FIGURAS	8
1. RESUMEN	10
2. INTRODUCCIÓN	11
3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	13
<i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</i>	13
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	15
4.1 <i>ESTADO DEL ARTE</i>	15
4.2 <i>MARCO TEÓRICO</i>	15
5. OBJETIVOS	25
5.1 <i>Objetivo General</i>	25
5.2 <i>Objetivos Específicos</i>	25
6. METODOLOGÍA	26
6.1 <i>Materiales</i>	26
6.2 <i>Métodos</i>	26
6.2.1 <i>Preparación de insumos, materiales de laboratorio y adaptación de pruebas y procedimientos operativos para el manejo seguro de las cepas evaluadas.</i>	26
6.2.2 <i>Determinación de la producción de enzimas β-lactamasas.</i>	27
6.2.3 <i>Pruebas de micro-dilución en caldo para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI).</i>	29
6.2.4 <i>Análisis estadístico de los resultados obtenidos de las pruebas de micro-dilución en caldo.</i>	32
7. RESULTADOS	33

7.1 Determinación de la resistencia expresada por cada una de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, 29213 y 43300, y evaluación de la producción de enzimas β -lactamasas en las cepas estudiadas.....	33
7.1.1 Prueba de difusión en disco:.....	33
7.1.2 Prueba cromogénica o de cefalosporinas cromogénicas:.....	35
7.1.3 Prueba de micro-dilución en caldo:.....	36
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	39
8.1 Prueba de difusión en disco:	39
8.2 Prueba Cromogénica o de cefalosporinas cromogénicas:	40
8.3 Prueba de micro-dilución en caldo:	41
8.4 Análisis estadístico mediante el método de Kaplan-Meier	44
9. CONCLUSIONES.....	46
10. RECOMENDACIONES.....	47
11. REFERENCIAS.....	48
12. ANEXOS.....	52
ANEXO 1: Certificado de Calidad de la ampicilina trihidratada.	52
ANEXO 2: Procedimiento para el manejo de las cepas de <i>S. aureus</i> (ATCC: 43300, 29213 y 25923) y disposición de residuos generados.....	53
ANEXO 3: Hoja de seguridad de las cepas bacterianas liofilizadas.....	61
ANEXO 4: Preparación de insumos necesarios para las pruebas de laboratorio:	65
Anexo 4.1: preparación de agar nutritivo marca Merck® (solubilidad de 20g/L):	65
Anexo 4.2: preparación del caldo nutritivo marca Merck® (solubilidad de 20g/L):	65
Anexo 4.3: preparación del caldo Mueller Hinton marca Scharlau® (solubilidad 21g/L) y ajuste de cationes (entre 20-25mg/mL de Ca ²⁺ y de 10-12,5 mg/mL de Mg ²⁺):.....	65
Anexo 4.4: crio-conservación de cepas bacterianas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, 29213 y 4330:.....	66
Anexo 4.5: preparación de las soluciones antibiótico, polímero y del complejo fármaco-polímero para las pruebas de micro-dilución en caldo:	67
Anexo 4.5.1: preparación solución de ampicilina de 2048 μ g/mL:	67
Anexo 4.5.2: preparación de la solución polimérica de PAM-18 Na de 1024 μ g/mL:.....	67

Anexo 4.5.3: preparación de los sistemas de mezcla ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1 de 1024 µg/mL:	68
<i>Anexo 4.6: Procedimiento detallado de la prueba de difusión en disco límite de zona.</i>	<i>69</i>
ANEXO 5: Estudio de la estabilidad de la ampicilina trihidratada bajo las condiciones de experimentación:	70
<i>Anexo 5.1: metodología implementada</i>	<i>70</i>
<i>Anexo 5.2: resultados obtenidos</i>	<i>70</i>
ANEXO 6: Resultados obtenidos para cada ensayo de la prueba de micro-dilución en caldo:	74
<i>Anexo 6.1 Resultados ensayo antibiótico + bacteria</i>	<i>74</i>
<i>Anexo 6.2: Resultados ensayo polímero anfifílico + bacteria:</i>	<i>75</i>
<i>Anexo 6.3: Resultados ensayo antibiótico + polímero + bacteria:</i>	<i>76</i>
Anexo 7. Análisis estadísticos de los datos. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.	77

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1: Tratamientos evaluados en las pruebas de micro-dilución en caldo sobre las cepas en estudio de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, 29213 y 43300.....	29
Tabla 2: Resultados obtenidos de la prueba de difusión en disco para cada una de las cepas de <i>S. aureus</i>	33
Tabla 3: Resultados prueba cromogénica con discos de nitrocefin comerciales sobre las cepas de <i>S. aureus</i> ATCC 25923, 29213 y 43300.	35
Tabla 4: Criterios según el CLSI para determinar la susceptibilidad (S) o resistencia (R) de las cepas de <i>Staphylococcus</i> hacia la ampicilina (CLSI, 2012).	39
Tabla 5: Resultados pruebas de micro-dilución en caldo para cada uno de los ensayos realizados en las cepas de <i>S. aureus</i> . Como punto de comparación se encuentran las CMI establecidas como puntos de corte para especies de <i>Staphylococcus</i> por el CLSI.....	42
Tabla 6: Resultados para la prueba de micro-dilución en caldo para las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas en presencia de ampicilina. El valor de cero (0) indica que la réplica o tratamiento realizado presentó inhibición del crecimiento, y los valores numéricos registrados indican la cantidad de réplicas (de las 24 realizadas) que tuvieron un crecimiento observable.	74
Tabla 7: Resultados para la prueba de micro-dilución en caldo para las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas en presencia del PAM-18 Na. Los valores numéricos registrados indican la cantidad de réplicas (de las 24 realizadas) que tuvieron un crecimiento observable en la placa.....	75
Tabla 8: Resultados obtenidos de la prueba de micro-dilución en caldo para las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas en presencia de la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1. Donde, El valor de cero (0) indica que la réplica o tratamiento realizado presentó inhibición del crecimiento a dicha concentración, y los valores numéricos registrados indican la cantidad de réplicas (de las 24 realizadas) que tuvieron un crecimiento observable en la placa.....	76

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1: Estructura base de antibióticos beta-lactámicos (ácido 6-amino-penicilánico).....	16
Figura 2: Estructura molecular de la ampicilina trihidratada.	19
Figura 3: Estructura molecular del sulbactam (inhibidor beta-lactámico).....	20
Figura 4: Esquema del monómero de la matriz polimérica del PAM-18 Na.....	24
Figura 5: Medición del diámetro de inhibición formado mediante el uso de un calibrador.	28
Figura 6: Prueba Cromogénica. Disco amarillo indica no producción de enzimas betalactamasas. Cambio de color del disco a rojo, indica positivo para la producción de enzimas betalactamasas. Imagen tomada de: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/NitrocefDisks	28
Figura 7: Prueba de micro-dilución en caldo. En rosado se ilustra la concentración de antibiótico a la cual hay crecimiento bacteriano (se observa un precipitado y/o turbidez). En rojo se ilustra la concentración a la cual no hay crecimiento bacteriano (CMI). En blanco se ilustra el control positivo realizado en cada tratamiento.	31
Figura 8: Esquema del método de micro-dilución en caldo utilizado en el estudio.	32
Figura 9: Halo de inhibición definido obtenido para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	33
Figura 10: Halo de inhibición difuso obtenido para la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (lado izquierdo), y para la cepa ATCC 43300 (a la derecha).	34
Figura 11: Comportamiento de las cepas de <i>S. aureus</i> en términos de nivel de susceptibilidad o resistencia hacia la ampicilina.	34
Figura 12: Resultados obtenidos de la prueba cromogénica para las cepas de <i>S. aureus</i> evaluadas.....	35
Figura 13: Resultado de la prueba de micro-dilución en caldo para la cepa ATCC 25923. Ensayo con ampicilina.	36
Figura 14: Resultado de la prueba de micro-dilución en caldo para la cepa ATCC 29213. Ensayo con ampicilina.	36
Figura 15: Resultado de la prueba de micro-dilución en caldo para la cepa ATCC 43300. Ensayo con ampicilina.	37
Figura 16: Resultado obtenido de la prueba de micro-dilución en caldo para cada una de las cepas de <i>S. aureus</i> estudiadas. Ensayo con la matriz polimérica PAM-18 Na.	37
Figura 17: Resultado obtenido de la prueba de micro-dilución en caldo para la de <i>S. aureus</i> ATCC 29213. Ensayo con la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1.	38
Figura 18: Resultado obtenido de la prueba de micro-dilución en caldo para la de <i>S. aureus</i> ATCC 43300. Ensayo con la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1.	38

Figura 19: “Estructura molecular del nitrocefín, cefalosporina cromogénica usada en la detección de enzimas β -lactamasas en las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas. Tomado de Sauvage, E, et al, 2005, Crystal Structure of the Actinomadura R39 DD-peptidase Reveals New Domains in Penicillin-binding Proteins”.41

Figura 20: Espectro UV de la ampicilina. Día 1 del estudio de estabilidad.71

Figura 21: Espectro UV de la ampicilina. Día 2 del estudio de estabilidad.72

Figura 22: Espectro UV de la ampicilina. Día 3 del estudio de estabilidad.72

Figura 23: Espectro UV de la ampicilina. Día 1, 2 y 3 del estudio de estabilidad..73

Figura 24: Método de Kaplan-Meier para los diferentes ensayos realizados en la prueba de micro-dilución en caldo sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.77

Figura 25: Método de Kaplan-Meier para los diferentes ensayos realizados en la prueba de micro-dilución en caldo sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.78

1. RESUMEN

La presente investigación evaluó el efecto antimicrobiano ejercido por el antibiótico betalactámico ampicilina trihidratada asociado a la matriz polimérica sal sódica de poli(ácido maléico-*alt*-octadeceno) denominada como PAM-18 Na, en tres cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, 29213 y 43300). Este estudio indaga sobre nuevas estrategias farmacéuticas de vehiculización de antibióticos betalactámicos en nano y micro fases poliméricas, con el objetivo de combatir la resistencia mediada por enzimas β -lactamasas a este tipo de penicilinas; a partir del supuesto efecto bio-protector del PAM-18 Na.

Por medio de la prueba cromogénica y la técnica de difusión en disco, se logró determinar la resistencia bacteriana exhibida por cada una de las cepas evaluadas; y la producción de enzimas β -lactamasas en las mismas. De este modo, se estableció que las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y 43300 son productoras de enzimas β -lactamasas. Paralelamente, se determinó que la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 no es productora de estas enzimas. Los resultados obtenidos coinciden con la información disponible y suministrada por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), entidad que sugiere la utilización de estas cepas en una variedad de pruebas.

Posteriormente, se evaluó a través de la técnica de micro-dilución en caldo el efecto antimicrobiano producido por el antibiótico ampicilina trihidratada, solo y en asociación con la matriz polimérica de PAM-18 Na, estableciendo el perfil de susceptibilidad de cada una de las cepas frente al fármaco. Los resultados permitieron concluir que las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y 43300 son resistentes a la ampicilina trihidratada sola, expresando esta última cepa un patrón más fuerte de resistencia hacia el agente betalactámico. Por otro lado, se pudo establecer que la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 fue susceptible al antibiótico, sirviendo ésta como control negativo en las pruebas de micro-dilución en caldo.

Además, se encontró que el polímero anfifílico PAM-18 Na solo, a las concentraciones evaluadas no tiene ningún efecto antimicrobiano sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas; mientras que la matriz polimérica asociada al antibiótico incrementó el efecto antimicrobiano de la ampicilina trihidratada en las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y 43300; disminuyendo, la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de la población bacteriana (CMI). Cabe mencionar, que aunque dicha asociación no hace que las cepas resistentes (ATCC 29213 y 43300) sean susceptibles al antibiótico, según los criterios del CLSI, si permite evidenciar una reducción significativa de aproximadamente cuatro veces de la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano.

2. INTRODUCCIÓN

Una amplia variedad de microorganismos resistentes a fármacos antibióticos han sido descritos desde los años setenta hasta la actualidad, esto ha desencadenado una gran problemática en el ámbito clínico a la hora de controlar infecciones producidas por este tipo de patógenos. Porque las farmacoterapias dadas a los pacientes para controlar las enfermedades infecciosas que ellos presentan, resultan siendo ineficientes a causa de la resistencia adquirida o naturalmente presentada en bacterias como *S. aureus*. Dicha problemática ha despertado el interés de la comunidad científica en general, que busca mejorar la efectividad de las terapias antibióticas, incrementando la posibilidad de salvar la vida de seres humanos y animales.

El fenómeno de la resistencia bacteriana a fármacos antibióticos ha ocasionado dos efectos principales en la población: el primero, consiste en un aumento significativo en la concentración mínima requerida del antibiótico para inhibir el crecimiento o desarrollo de la bacteria; de tal modo, que es necesario incrementar la dosis del antibiótico para mejorar su eficacia en los tratamientos infecciosos (Greca, 2000). El segundo, está relacionado con el incremento en la tasa de mortalidad de los pacientes debido a enfermedades infecciosas porque la prevalencia de cepas resistentes a los tratamientos farmacológicos aumenta el riesgo de alcanzar niveles epidemiológicos difíciles de controlar (Tenover, 2006). Cabe mencionar, que la utilización indiscriminada de estos antibióticos se sugiere como una de las causas que induce resistencia.

Ante esta problemática han surgido nuevas estrategias, entre ellas la utilización de polímeros que sirvan como vehículos que transporten el antibiótico, y a su vez, lo protejan de algunos mecanismos de resistencia bacteriana; para así mejorar el uso del tratamiento antibiótico y para mitigar las consecuencias asociadas a este fenómeno.

La presente investigación tuvo como objetivo principal la evaluación del efecto antimicrobiano producido por el antibiótico betalactámico ampicilina asociado a un polímero anfifílico sobre diferentes cepas de *S.aureus* (ATCC 25923, 29213 y 43300). El polímero con carácter dual de polaridad estudiado fue el PAM-18 Na y el antibiótico ampicilina trihidrato.

Staphylococcus aureus fue el patógeno de estudio seleccionado por ser una de las bacterias resistentes de mayor impacto tanto en humanos como en animales y como consecuencia de su elevada prevalencia en la población; elementos que convierten a las infecciones y enfermedades producidas por *S. aureus* en una problemática de salud pública de gran relevancia.

La ampicilina es un antibiótico betalactámico semi-sintético que pertenece al grupo de las amino-penicilinas, es utilizada para tratar enfermedades estafilocócicas junto con el inhibidor betalactámico sulbactam, como resultado de la elevada tasa de resistencia que presenta *S. aureus* hacia este antibiótico. También, es usada en animales domésticos y de producción para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias Gram positivas y Gram negativas; dentro de estas se incluyen los géneros *Streptococcus sp*, *Stafilococcus sp*, *Listeria Monocytogenes* y algunas especies de *Enterococcus* (Veterinaria, 2012).

La metodología implementada en este estudio involucró la realización de pruebas para detectar la producción de enzimas β -lactamasas en las cepas evaluadas, y pruebas dirigidas a establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antibiótico tanto en presencia como en ausencia del polímero anfifílico. Finalmente, se determinó el efecto antimicrobiano producido por la asociación de la matriz polimérica de PAM-18 Na con la ampicilina trihidrato.

Esta investigación se enmarca dentro del contexto del macro-proyecto de Fisicoquímica- Farmacéutica de la Universidad Icesi, que está enfocado en la búsqueda de matrices poliméricas con potencial uso en el ámbito farmacéutico. De tal modo, que el presente estudio proporciona una información sustanciosa acerca de un posible vehículo farmacológico que actué como reservorio y ejerza un efecto bio-protector sobre el antibiótico estudiado.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los antibióticos betalactámicos han sido utilizados ampliamente como farmacoterapia para pacientes ambulatorios, hospitalizados e incluso en las unidades de cuidados intensivos de los hospitales (UCIs), donde se presentan septicemias, abscesos, infecciones nosocomiales, endocarditis y afecciones superficiales que ponen en riesgo la salud de las personas. En muchas ocasiones las infecciones anteriormente mencionadas, son producidas por un patógeno de alta incidencia en el ambiente: *Staphylococcus aureus*, una bacteria Gram positiva que ha sido capaz de generar resistencia a una gran cantidad de fármacos antibacterianos incluyendo la ampicilina.

S. aureus es un patógeno oportunista, que ha logrado desarrollar mecanismos de resistencia para evadir a diversos agentes antimicrobianos que son usados para combatirlo. Esto se debe, a mutaciones o adquisición de elementos genéticos que han desencadenado cambios estructurales y fisiológicos en la bacteria (Alsaimary, 2012); dentro de éstos se puede mencionar la resistencia a antibióticos B-lactámicos mediado por producción de enzimas β -lactamasas (American Academy of Microbiology, 1999). Lo anterior ocasiona que muchos de los fármacos disponibles actualmente en el sistema de salud sean inefectivos para el tratamiento de las enfermedades causadas por este patógeno.

Un ejemplo, de esta problemática puede evidenciarse con las cifras estadísticas reportadas en varios estudios, donde se ha encontrado que *Staphylococcus aureus* es el patógeno más frecuentemente aislado en pacientes hospitalizados, y es el segundo en pacientes ambulatorios en los Estados Unidos. Entre 1997 y 2002, *S. aureus* fue la causa más común de bacteriemia nosocomial en Norteamérica (prevalencia del 26,0%) y América Latina (prevalencia del 21,6%), y ocupó el segundo lugar en Europa (prevalencia del 19,5%) (Naber, 2009). En Colombia, de acuerdo a un sub-estudio prospectivo de cohortes realizado en diez hospitales a nivel nacional, se obtuvo que la prevalencia de *Staphylococcus aureus* implicados en sepsis en sangre y pulmón en las UCIs, fue mayor que la de otros patógenos; presentando la mayor prevalencia en pulmón en pacientes de UCI de 32,4%, seguido de *Klebsiella pneumoniae* (17,6%); mientras que en sangre ocupó el segundo lugar con un 13,5% (Molina et al, 2011). Lo que proporciona un panorama de la alta presencia de este patógeno en una variedad de tejidos vivos.

Los antecedentes demuestran que el presente estudio es de gran relevancia tanto para el sector farmacéutico, como para el ámbito clínico a nivel nacional e internacional, donde la resistencia a antibióticos es una problemática creciente que

dificulta el tratamiento medicamentoso de los pacientes, debido a la difícil erradicación de los patógenos de su huésped. Esto a su vez ha conducido a explorar nuevas estrategias, entre ellas la evaluación de matrices poliméricas anfífilas como reservorios bio-protectores que permitan mitigar o disminuir mecanismos de resistencia, como aquellos asociados a cepas bacterianas productoras de β -lactamasas.

La información derivada de este proyecto puede ser utilizada como base para el desarrollo de nuevas formulaciones a partir de fármacos ya estudiados, combatiendo la situación anteriormente expuesta. La resistencia a antibióticos tiene relevantes implicaciones en el marco de la salud pública, por ello es importante que se realicen estudios que demuestren la eficacia de estrategias novedosas en el entorno farmacéutico para combatir la problemática. Es importante resaltar que los ensayos realizados en esta investigación son pruebas *in vitro*, que sirven para evidenciar el comportamiento del antibiótico, asociado a la matriz polimérica estudiada en presencia de la bacteria, pero no están relacionados con la eficacia ni con la efectividad a nivel terapéutico. Para lo anterior se requieren estudios adicionales que confirmen dichas variables.

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 ESTADO DEL ARTE

Esta investigación contribuye al desarrollo de trabajos científicos interdisciplinarios, donde se combina la investigación básica y aplicada, con proyecciones al desarrollo de nuevos productos farmacéuticos con mejores características farmacotécnicas, biofarmacéuticas y de estabilidad fisicoquímica y biológica. La propuesta investigativa radica en evaluar el efecto antimicrobiano que exhibe la sal sódica del poli(ácido maléico-*alt*-octadeceno), como un novedoso sistema reservorio de fármacos antibióticos; partiendo de la supuesta capacidad del polímero anfifílico de auto-organizarse, generando nano y micro agregados hidrofóbicos en medios acuosos, los cuales pueden asociar sustratos farmacológicos por interacciones específicas con las pseudo-fases poliméricas; mejorando así su bio-estabilidad frente a microorganismos productores de enzimas que pueden degradar a los agentes farmacológicos, tal como sucede con los antibióticos beta-lactámicos.

4.2 MARCO TEÓRICO

Dentro de los grandes adelantos médicos del siglo XX, se encuentra el descubrimiento de la penicilina. En 1928, Alexander Fleming evidenció el crecimiento de un hongo contaminante (*Penicillium notatum*) en una placa de cultivo que había quedado abierta al aire accidentalmente. Él observó una zona de inhibición en las bacterias que crecían adyacentemente al hongo, deduciendo así que éstas estaban sufriendo lisis. Lo que lo llevó a concluir que la sustancia difusible producida por *Penicillium notatum* tenía la capacidad de ser bacteriostática, y fue denominada posteriormente como penicilina (Koneman, 2008)

Las penicilinas son fármacos antibióticos cuyo mecanismo de acción, consiste en interferir en la síntesis de peptidoglucanos, los cuales forman parte del material de la pared celular. En consecuencia, el protoplasto bacteriano pierde la capacidad de formar una pared celular protectora (Gennaro, 2003). Estos antibióticos betalactámicos van dirigidos a blancos farmacológicos llamados proteínas de unión a penicilina "PBPs"; de modo, que si fármacos como la ampicilina logran unirse a ellas, provocan la destrucción de la bacteria; cuando logran inhibir la acción de las peptidasas y carboxipeptidasas implicadas en la síntesis de la pared celular bacteriana. Para que estos antibióticos actúen es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación, ya que es en este momento cuando se sintetiza la pared celular (Rang & Dale, 2008; Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2011).

Las proteínas de unión a penicilina o PBPs son proteínas asociadas a la biosíntesis de la pared celular en las bacterias (*Staphylococcus aureus*). Estas proteínas generalmente presentan dos dominios, uno de los cuales tiene actividad glicosiltransferasa, y se encarga de la elongación de las hebras de glicanos; el otro, que siempre está presente, tiene actividad transpeptidasa, la cual entrecruza peptídicamente las hebras de glicanos. Los antibióticos betalactámicos acílan irreversiblemente la serina catalítica del sitio activo transpeptidasa, inhibiendo el entrecruzamiento de las cadenas (Llarrull, Fisher, & Mobashery, 2009). Cuando una cepa es sensible a penicilina, éste antibiótico se convierte en el fármaco de primera línea debido a su buena disponibilidad, bajo costo, y toxicidad selectiva, que permite atacar sólo las células bacterianas (Castellano González & Perozo-Mena, 2010).

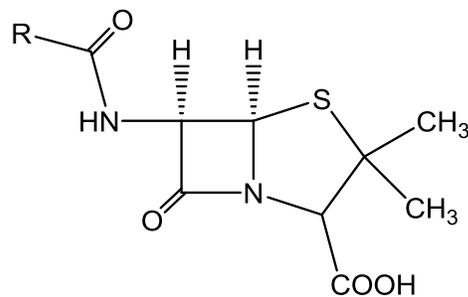


Figura 1: Estructura base de antibióticos beta-lactámicos (ácido 6-amino-penicilánico).

Como se muestra en la figura 1, las penicilinas son fármacos compuestos por un anillo betalactámico responsable de la acción antibacteriana (es decir, la unión a las PBPs), un anillo de tiazolidina que protege al betalactámico y una cadena lateral que varía según el tipo de penicilina, y otorga las propiedades características del fármaco como su potencia, lipofilicidad y espectro antibacteriano.

A lo largo de la historia, una gran variedad de microorganismos resistentes a antibióticos β -lactámicos han sido descritos, dicha resistencia bacteriana se define como la capacidad de una bacteria o microorganismo de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un fármaco antibiótico (Greca, 2000); es decir que dichos microorganismos resistentes poseen la habilidad de mantener su progenie, tasa de crecimiento y viabilidad incluso bajo condiciones que destruirían o inhibirían el crecimiento de los individuos de la especie resistente (Cloete, 2003). Lo anterior ha generado un gran desafío para la industria farmacéutica, tanto en la obtención de nuevos compuestos con este tipo de actividad farmacológica, como en el diseño y la formulación de nuevas formas

farmacéuticas que puedan dar solución dicha problemática (Sussmann et al, 2002).

Todo este interés por parte de la comunidad científica nació en 1941 ante la necesidad de tratar y controlar las infecciones estafilocócicas que se estaban diseminando en la población, de modo que se empezaron a erradicar las enfermedades infecciosas en la comunidad con antibióticos de la familia de la penicilina; sin embargo, en 1944, tres años después de la introducción de las penicilinas en el ámbito clínico fue reportado el primer aislamiento de una cepa resistente a antibióticos betalactámicos por producción de enzimas β -lactamasas. Dos décadas más tarde, el 60% de las cepas intrahospitalarias eran ya resistentes a penicilina, fue entonces en este momento que la resistencia por parte de las bacterias se desarrolló rápidamente y surgió la necesidad de buscar nuevas estrategias para el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo las estafilocócicas (Gil, 2000).

Hoy en día, la resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública, quizás uno de los de mayor preocupación a escala mundial. Desde la aparición del primer antibiótico, la presión evolutiva en los microorganismos y el uso descontrolado de agentes antimicrobianos, ha desencadenado la aparición de resistencia a éstos, con consecuencias negativas importantes. Lo cual ha ocasionado en instituciones de salud que los tratamientos farmacológicos dados a los pacientes sean ineficientes, situación que puede comprometer en la mayoría de ocasiones la vida de los mismos. Por otra parte, aumenta los costos en el sistema de salud pública porque la probabilidad de hospitalización y la duración de la misma es aproximadamente el doble para infecciones por microorganismos resistentes en comparación con las cepas que son sensibles a penicilinas (Greca, 2000). De acuerdo a las estadísticas se ha evidenciado que la neumonía causada por neumococo resistente a penicilina PRSP, tiene una tasa de resistencia en Argentina del 25%, en México del 48%, en Colombia del 15% y en Brasil del 24%; lo que manifiesta la tendencia de aparición de una variedad de cepas resistentes a antibióticos de tipo de betalactámico (Greca, 2000).

El problema se agrava debido a los grandes retos y esfuerzos que implica el desarrollo de nuevas moléculas más potentes, razón por la cual es más conveniente optimizar las formulaciones o el diseño de los medicamentos antibióticos ya existentes (como los betalactámicos). Lo más próximo que se ha conseguido son los antibióticos de amplio espectro, que tienen la capacidad de combatir algunas, pero no todas las especies de microorganismos existentes. Aunque son los más ampliamente utilizados, son también los responsables de la aparición de las resistencias, debido al consumo indiscriminado (Medina, 2011).

Una de las bacterias resistentes de mayor impacto es *Staphylococcus aureus*, un coco Gram positivo reconocido por su pigmentación dorada al crecer sobre algunos medios de cultivo; es una bacteria anaerobia facultativa, coagulasa

positiva y no esporulada (Lowy, 1998). Patógeno que cuando invade organismos y causa enfermedades infecciosas es tratado con penicilinas; sin embargo, se han encontrado reportes en los que se notifica la resistencia de éste a penicilinas naturales, aminopenicilinas y penicilinas antipseudomónicas (Rice, 2006). Dentro de las enfermedades y trastornos infecciosos que puede desencadenar *S. aureus* en el ser humano, se encuentran las afecciones invasivas, endocarditis, bacteremias, sepsis y síndrome de shock tóxico.

Staphylococcus aureus fue identificado por primera vez en 1880 como agente causal de abscesos en partes blandas (Echevarria, J. & Iglesias, D., 2003). Posteriormente, en 1883, fue reconocido como patógeno inicialmente nosocomial, y posteriormente comunitario. En la época pre-antibiótica la tasa de mortalidad para infecciones sanguíneas por *Staphylococcus aureus* excedía el 80% (Smith & Jarvis, 1999) y por encima de 70% desarrollaron infecciones sistémicas (Lowy, 2003a). *Staphylococcus aureus* además de poseer una alta tasa de mutación, adquiere, fácilmente, de forma natural elementos genéticos determinantes de resistencia (Ross Fitzgerald, 2013)

El género *Staphylococcus* es uno de los géneros bacterianos más estudiados a nivel mundial. “la especie *S. aureus* es la más virulenta, y con los años ha mantenido una importante morbimortalidad a pesar de los numerosos antibióticos utilizados para su control. Presenta diferentes mecanismos patogénicos, y es un microorganismo con enorme importancia a nivel clínico, que debe ser estudiado debido a su efecto sobre la salud pública en general”.(Berga, 2009, p. 11)

Staphylococcus aureus es habitante común de la flora normal del cuerpo, encontrándose especialmente en la nasofaringe, la piel, la garganta, y el tracto gastrointestinal de personas sanas (asintomáticas), así como en el tracto urogenital de las mujeres, (Ross Fitzgerald, 2013). Las infecciones producidas por *S. aureus* son causadas principalmente por cepas colonizantes, que bajo determinadas condiciones se comportan como agentes oportunistas. Las tasas de colonización son altas para pacientes con diabetes tipo 1, usuarios de fármacos intravenosos, pacientes en hemodiálisis, pacientes en cirugía, pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), y también pacientes que presentan deficiencias en la función leucocitaria (Lowy, 1998).

La infección comienza cuando se rompen las barreras primarias como la piel y mucosas, que permiten el acceso de la bacteria. La infección puede presentarse de forma localizada (contenida) o diseminada, esto está determinado por las interacciones que se presentan entre los mecanismos de virulencia del microorganismo y los de defensa del hospedero. Cuando se invade el flujo sanguíneo por la infección, pueden desarrollarse complicaciones tales como endocarditis, infecciones metastásicas y sepsis. La célula endotelial juega un papel importante en el proceso patogénico de *Staphylococcus aureus*. La bacteria es fagocitada por las células endoteliales y es protegida del sistema inmunitario y

de los efectos de los antibióticos. Esto contribuye al desarrollo de infecciones recurrentes y persistentes (Lowy, 1998).

La ampicilina es el antibiótico de primera elección frente a infecciones respiratorias, óticas, sinusales y meningitis causadas por microorganismos Gram negativos, como *Haemophilus influenzae*. Además, se emplea como tratamiento para la fiebre paratifoidea, faringitis bacteriana, gonorrea, neumonía e infecciones producidas principalmente por bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas como *Enterococos*, *E. coli* y *Salmonella*. En cuanto a la distribución de la ampicilina en el organismo, puede mencionarse que ésta se encuentra ampliamente perfundida en pulmones, hígado, riñones y piel (Rang H., Dale M, 2008).

La ampicilina corresponde a un antibiótico de tipo betalactámico, del grupo de las aminopenicilinas (junto con la amoxicilina), este fármaco contiene un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina dentro de su estructura, los cuales forman el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de valina y una de cisteína para dar lugar a los anillos fusionados característicos (Kfoury, et al, 2003).

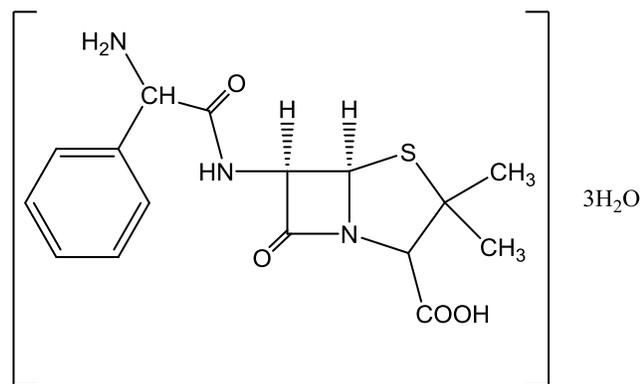


Figura 2: Estructura molecular de la ampicilina trihidratada.

Sin embargo, debido a la resistencia bacteriana presentada por una variedad de especies microbianas (dentro de ellas, *S. aureus*), la ampicilina no es usada sola en las farmacoterapias dadas a los pacientes, sino que se ha utilizado en combinación con un inhibidor betalactámico como el sulbactam. Los inhibidores de las penicilinasas plasmídicas y cromosómicas de las clases II a la V, como el sulbactam actúan compitiendo por el sustrato de la enzima β -lactamasa, en donde la interacción provoca la formación de un acil-enzima, logrando así que ambos productos se inactiven (inhibición suicida), es decir la β -lactamasa y el inhibidor betalactámico. El sulbactam en combinación con la ampicilina reduce la concentración mínima inhibitoria necesaria para erradicar a *S. aureus*, mejorando la terapia de los pacientes (Almaraz, 1996).

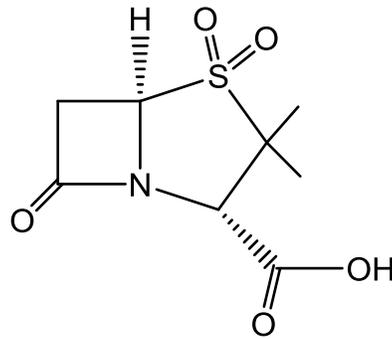


Figura 3: Estructura molecular del sulbactam (inhibidor beta-lactámico).

Estos inhibidores betalactámicos junto con las penicilinas actúan contrarrestando los siguientes mecanismos de resistencia antibiótica evidenciados en *S. aureus*:

1. **Modificación química de la diana donde actúa el fármaco o meticilino resistencia:** Es generada por una alteración en la proteína de unión de la penicilina PBP que no le permite a los antibióticos betalactámicos unirse a la célula bacteriana causando la resistencia. En este tipo de cepas llamadas MRSA (meticilino resistentes), además de producir las 4 PBPs normalmente necesarias para que *S. aureus* sintetice la pared celular (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4), codifica para la PBP2a una transpeptidasa de clase B, capaz de catalizar la formación de puentes cruzados en el peptidoglucano de la pared celular aún en presencia del antibiótico. (González, 2010).

Para la cepa de *S. aureus* MRSA (ATCC 43300), la resistencia a meticilina se debe a un gen llamado *MecA* que codifica una proteína alternativa de unión a penicilina llamada PBP2a que es menos afín a todos los betalactámicos en especial a la meticilina. (Berga, 2009; Sussmann, O. A. et al., n.d.; Vignoli, R. & Seija, V., 2006). Esta cepa ha llegado a ser la principal causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial desde su primer aislamiento en 1961 (Vaez, Tabaraei, Abdolvahab, & Ezzat, 2011). La resistencia a meticilina confiere resistencia a todas las penicilinas. Dicha resistencia es a menudo heterogénea, es decir, su expresión varía de acuerdo a las condiciones ambientales (Lowy, 1998).

2. **Disminución de la permeabilidad de la membrana:** Se debe a alteraciones en estructuras celulares superficiales, de modo que limitan la entrada del antibiótico, disminuyen su concentración intracelular o alteran su actividad sobre el sitio de acción a través modificaciones en las proteínas productoras de porinas, situadas en la membrana citoplasmática. (Abarca, 2001). También se puede originar por cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, lo que ocasiona que se excluyan moléculas que no logran pasar esta barrera (Sussmann et al, 2011).

3. **Inactivación enzimática del antibiótico:** Se da por la producción de β -lactamasas o penicilinasas capaces de abrir el anillo betalactámico del antibiótico, generando un compuesto terapéutica y farmacológicamente ineficaz, el ácido peniciloico. *S. aureus* produce β -lactamasas de la clase A, con actividad penicilinasas; estas son exoenzimas, es decir que se excretan al medio (para bacterias Gram positivas). Estas enzimas son usadas por el microorganismo para defenderse de antibióticos betalactámicos como la ampicilina; o bien son utilizadas por la bacteria para sintetizar su pared bacteriana. Y, pueden ser constitutivas o inducidas y codificadas a nivel cromosomal o plasmídico (Abarca, 2001).
 - 3.1 **Mecanismo cromosómico:** Se da cuando se expone a la bacteria durante mucho tiempo al antibiótico, de modo que se dan mutaciones en genes cromosómicos, permitiendo la expresión de β -lactamasa a alto nivel (Abarca, 2001).
 - 3.2 **Mecanismo mediado extra cromosómicamente por plásmidos:** portadores de determinada información como lo son los plásmidos y los trasposones tienen la capacidad de transferir el material genético de una célula bacteriana a otra, mediante procesos de conjugación, transformación y transducción (Abarca, 2001).
 - 3.3 **Hiperproducción de la enzima:** *S.aureus* y *Bacillus licheniformis* secretan grandes cantidades de β -lactamasas clase A, fuera de la célula, lo que ayuda a mantener poblaciones o cepas resistentes (Abarca, 2001).

La producción inducida de β -lactamasas y de PBP2a está regulada por sistemas proteínicos sensor-transductores y represores similares que se activan al ser inducidos por la presencia del antibiótico. Los genes que codifican proteínas sensoras de señales son BlaR1 y MecR1, y los genes que codifican proteínas represoras de unión al ADN son, Bla1 y Mec1 para β -lactamasa y PBP2a respectivamente (Zhang, Hackbarth, Chansky, & Chambers, 2001). La detección de BlaZ y MecA a través de la técnica PCR (por sus siglas en inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa), identifica correctamente las cepas con resistencia heterogénea y es considerado como el “gold standard” para detectar resistencia a penicilina (producción de β -lactamasa) y meticilina (producción de PBP2a), respectivamente (Castellano González & Perozo-Mena, 2010; Pitkala, Salmikivi, Bredbacka, Myllyniemi, & Koskinen, 2007). El gen BlaZ en cepas de *Staphylococcus aureus* que afectan a humanos se encuentra principalmente a nivel plasmídico, a diferencia del tipo que infecta Bovinos que se encuentra en el cromosoma, aunque también puede ser encontrado en plásmidos; adicionalmente se afirma que el gen BlaZ se transfiere verticalmente (Olsen et al., 2006).

Como alternativa, en el campo farmacéutico se encuentra el diseño de antibióticos que logren retar este tipo de estrategias de resistencia microbiana, dentro de las cuales la de producción de β -lactamasas, sea quizás una de las más importantes. Una de las alternativas planteadas para controlar dicho tipo de resistencia es la utilización de polímeros anfifílicos que mejoren las características fisicoquímicas de los fármacos ya existentes, generando matrices macromoleculares biocompatibles.

Los antecedentes obtenidos de estudios científicos han demostrado la importancia que tiene la utilización de materiales poliméricos anfifílicos en conjunto con fármacos antibacterianos; debido a que estos actúan como vehículos de transporte y liberación, o como sistemas reservorios que potencian las propiedades fisicoquímicas y biológicas de los fármacos antibacterianos ya existentes, logrando así aumentar el efecto farmacológico de los mismos *In vitro*. Dentro de estos estudios se encuentran:

- ✓ Colágeno como vehículo de liberación de fármacos antimicrobianos (Ruszczak, et al 2003).
- ✓ Encapsulación de gentamicina en microesferas de PLA/PLGA (polímeros derivados del ácido láctico) en tratamiento de infecciones de *Brucella* (Prior, S., et al 2000).
- ✓ Liberación y actividad antimicrobiana *In vitro* del dimero de poli (ácido oleico / linoleico: ácido sebácico) unido a gentamicina (Yang, X, et al 2003).

A nivel nacional también se han realizado algunos estudios que han explorado la utilización de novedosos sistemas poliméricos como matrices o excipientes farmacéuticos, que pretenden mejorar las características de los fármacos ya existentes (penicilinas) y la bio-protección de los mismos por fenómenos de asociación. En uno de estos estudios se evaluó la actividad antibiótica de la ampicilina en combinación con un compuesto tipo chalcona sintética en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilinas, en presencia de una matriz polimérica soluble en agua conocida como poli (ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona). Este estudio demostró un incremento de la actividad antimicrobiana de la ampicilina cuando se encontraba asociada a dicha matriz polimérica, y por tanto la eficacia de estos materiales como sistemas reservorios. (Arenas, et al, 2012).

La estrategia que se implementó en estos estudios previos y en el presente trabajo, consiste en asociar fármacos con sistemas poliméricos hidrosolubles que cuentan con la capacidad de auto-organizarse en solución acuosa generando micro-depósitos, en los cuales es posible incorporar moléculas farmacológicas, a partir de una asociación en pseudofases poliméricas, que proporcionan un efecto de barrera física frente a los sistemas enzimáticos, como las β -lactamasas (Arenas, et al, 2012). Una de las ventajas, es que estos polímeros responden súbitamente a condiciones físicas o químicas del ambiente como cambios

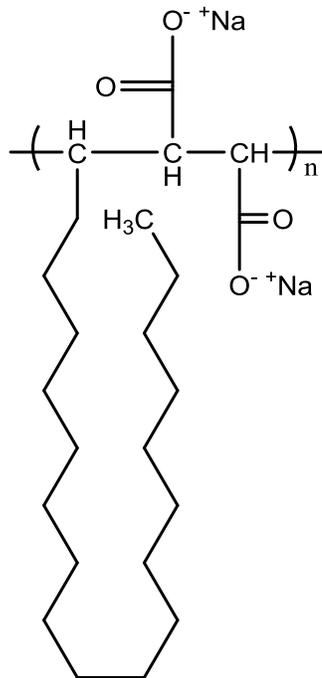
pronunciados en la temperatura, fuerza iónica, campos eléctricos, estrés mecánico, pH, iones específicos, agentes químicos y enzimas; lo que ocasiona que permitan la liberación controlada de activos con efecto terapéutico potencial, aumentando la estabilidad de los mismos y permitiendo la liberación de estos en sitios específicos en función de las propiedades anteriormente mencionadas (Rojas, 2008).

Estos polímeros, corresponden a polielectrólitos, es decir, sistemas macromoleculares que presentan una fracción significativa de cargas en su cadena principal polimérica, por lo que comúnmente se denominan poliiones. Estos se pueden clasificar según la carga como aniónicos o catiónicos; o bien, según la composición de monómeros como homopolímeros o copolímeros. Por otra parte, también es posible adicionar grupos funcionales hidrofóbicos a dichos sistemas poliméricos (cadenas laterales poliméricas), con lo que se obtienen polielectrólitos con mayores propiedades anfipáticas cuando se encuentran en solución acuosa, similares a las exhibidas por los agentes tensoactivos corrientes. Dentro de estas propiedades se encuentra la capacidad de formar sistemas microheterogéneos, semejantes a las micelas y/o vesículas. Esta propiedad se debe a la capacidad de la macromolécula de auto organizarse cuando se encuentra en solución, adquiriendo diferentes conformaciones (Salamanca, 2007).

En el ámbito de la industria farmacéutica los polímeros que se vienen utilizando principalmente como sistemas de transporte de fármacos (drug carrier) o bien como sistemas contenedores o reservorios de fármacos (drug reservoir), son aquellos que presentan en su estructura macromolecular, grupos tales como, ester, lactónico, carboxilato y anhídrido, debido a que son grupos funcionales biocompatibles (Salamanca, 2007). La investigación extensiva y los esfuerzos encaminados a mejorar constantemente las características de los polímeros, además de sus mecanismos de protección y transporte, conllevan al desarrollo de nuevos medicamentos, con materiales poliméricos cada vez más específicos en su función a cumplir, como por ejemplo, obtener un control preciso y ajustable de liberación del principio activo, o ejerciendo un mecanismo de protección biológico o fisicoquímico.

El presente trabajo utilizó un polímero derivado del anhídrido maléico en forma de sal. El poli (ácido maleico-18C), en su forma salina sódica (PAM-18 Na). Véase figura 4. El PAM-18 Na fue seleccionado para el presente estudio debido a las características fisicoquímicas que ha exhibido al ser estudiado en asociación con la ampicilina, por integrantes del grupo de investigación en fisicoquímica farmacéutica (GIFF) de la Universidad Icesi (GIFF). Potenciando ésta matriz polimérica propiedades fisicoquímicas del fármaco betalactámico como su solubilidad y estabilidad en medio acuoso. En segundo lugar, se implementó en el trabajo de investigación éste polímero ya que se disponía de suficiente cantidad del mismo, porque había sido sintetizado y caracterizado, previamente por el GIFF. De tal modo, que en un proyecto de grado realizado en el año 2013 por el

estudiante Alejandro Ortiz se obtuvo información sustanciosa sobre el potencial biológico que presentaba el PAM 18 Na en asociación con la penicilina G; demostrando, un incremento en la actividad antibacteriana del fármaco. Los resultados obtenidos en ese estudio permitieron evidenciar el efecto bioprotector del polímero anfifílico PAM 18 Na; fenómeno que expresó en un nivel más bajo el PAM 18 K cuando se encontraba combinado con la penicilina G. Fundamento que permitió seleccionar al PAM 18 Na como un material polimérico de gran interés para ser estudiado junto con otro fármaco de alto uso y bajo costo de tipo betalactámico como la ampicilina; debido a la capacidad que presenta este polímero de generar interacciones con los grupos funcionales hidrofóbicos e hidrofílicos del fármaco antibacteriano, produciendo así un sistema reservorio que tiene la capacidad de contener al fármaco betalactámico.



Sal sódica Poli(ácido maleico-alt-octadeceno)

Figura 4: Esquema del monómero de la matriz polimérica del PAM-18 Na

De este modo, se evaluó el efecto *in vitro* que tiene dicho polímero sobre el crecimiento de tres cepas de *Staphylococcus aureus* al vehicular la ampicilina trihidratada a su sitio de acción. Para ello se utilizaron pruebas de susceptibilidad según los estándares del CLSI.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antimicrobiano producido por el polímero anfifílico PAM-18 Na asociado a ampicilina en cepas de *S. aureus* β -lactamasas positivas.

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar en las cepas de *S. aureus* (evaluadas) la resistencia a la ampicilina asociada a la producción de enzimas β -lactamasas.
- Estudiar *In vitro* el efecto producido por el antibiótico (ampicilina) y el polímero anfifílico PAM-18 Na sobre las cepas de *S. aureus*.
- Establecer el efecto antimicrobiano producido por la matriz de asociación ampicilina-PAM-18 Na (antibiótico-polímero) en las cepas de *S.aureus* evaluadas.

6. METODOLOGÍA

El desarrollo de la presente investigación fue llevada a cabo en los laboratorios de Microbiología (406L) y de Físicoquímica-Farmacéutica de la Universidad Icesi de la Ciudad de Cali. La metodología propuesta buscó evaluar el efecto antimicrobiano producido por el polímero anfifílico PAM-18 Na asociado a ampicilina en cepas de *Staphylococcus aureus*.

6.1 Materiales

Los compuestos utilizados en la parte experimental fueron: ampicilina trihidratada la cual fue proporcionada por laboratorios Tecnoquímicas S.A y cuenta con su correspondiente certificado de análisis de control de especificaciones de calidad, el cual se puede evidenciar en el anexo 1. Por otro lado, se utilizó el sistema polimérico sal sódica del poli(ácido-maléico-*alt*-octadeceno) obtenido bajo procedimientos previamente estandarizados en el laboratorio de investigación de Físicoquímica- Farmacéutica de la Universidad Icesi. Las cepas certificadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 29213 y 43300 fueron obtenidas de Microbiologics Inc[®]. Para la preparación de medios de cultivo y las pruebas de micro-dilución en caldo se usaron: agar nutritivo marca Merck[®], caldo nutritivo marca Merck[®] y caldo Mueller- Hinton (MH) marca Scharlau[®], los cuales fueron preparados de acuerdo a las instrucciones dadas por el proveedor y las especificaciones expuestas en la etiqueta.

6.2 Métodos

La metodología propuesta fue dividida en las siguientes fases a fin de cumplir los objetivos planteados en la investigación:

6.2.1 Preparación de insumos, materiales de laboratorio y adaptación de pruebas y procedimientos operativos para el manejo seguro de las cepas evaluadas.

Para garantizar un manejo SEGURO y adecuado de las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, 29213 Y 43300) utilizadas en el presente estudio, y de los residuos generados por la manipulación de las mismas, los estudiantes Alejandro Ortiz y Stephany Barajas desarrollaron un procedimiento operativo estándar el cual se encuentra en el anexo 2. Éste se elaboró con la finalidad de evitar la

contaminación o diseminación del microorganismo (*S. aureus*) en áreas o superficies utilizadas, así como el personal que hace uso de estas. De acuerdo al manual de bioseguridad de la OMS esta bacteria es clasificada en un nivel de riesgo dos, bajo el cual debe mantenerse y usarse dentro de un marco de buenas prácticas de laboratorio que aseguren un nivel de bioseguridad dos (OMS,2005). El procedimiento fue redactado y elaborado de acuerdo al manual y se siguieron sus instrucciones durante la realización de las pruebas de laboratorio. Para la adaptación de las pruebas y métodos realizados se utilizaron los estándares del CLSI, los cuales se ajustaron a las condiciones del laboratorio.

Por otro lado, la metodología implementada para la preparación de los insumos de laboratorio se describe específicamente en el anexo 4, en donde se presenta de manera detallada la elaboración de materiales de cultivo, la preparación de las cepas bacterianas y la elaboración de las soluciones madre de antibiótico, polímero y de la matriz de asociación antibiótico- polímero. Además, de los determinaciones de estabilidad realizadas para la ampicilina trihidratada.

6.2.2 Determinación de la producción de enzimas β -lactamasas.

Para detectar la producción de enzimas β -lactamasas se realizaron dos tipos de pruebas:

La prueba de difusión en disco, recomendada por el CLSI en su documento M100-S22 del 2012 y descrita por Gill y colaboradores en 1981 (CLSI, 2012; Gill, Manning, & Ingalls, 1981). Este método se fundamenta en la formación de un halo alrededor de un disco que está impregnado con el antibiótico en una placa de agar Mueller- Hinton inoculada con el microorganismo; observándose la diferencia en el halo formado alrededor de una cepa productora de enzimas β -lactamasas y una no productora de la enzima. Si el halo formado se encuentra bien definido esto indica que la cepa evaluada no es productora de β -lactamasas, pero si se evidencia un crecimiento gradual o no definido en dicha zona, es decir un halo con forma difusa indica la producción de la enzima. Esta prueba permite evaluar principalmente la resistencia que presenta la cepa bacteriana estudiada hacia un fármaco antimicrobiano de interés, por medio del diámetro del halo de inhibición obtenido al desafiar a la población bacteriana al contacto con el antibiótico impregnado en el disco. Este diámetro del halo de inhibición formado es medido con un calibrador, tal como se muestra en la Figura 5. De este procedimiento se realizaron 4 réplicas por cepa (se describe su elaboración en el anexo 4.6).

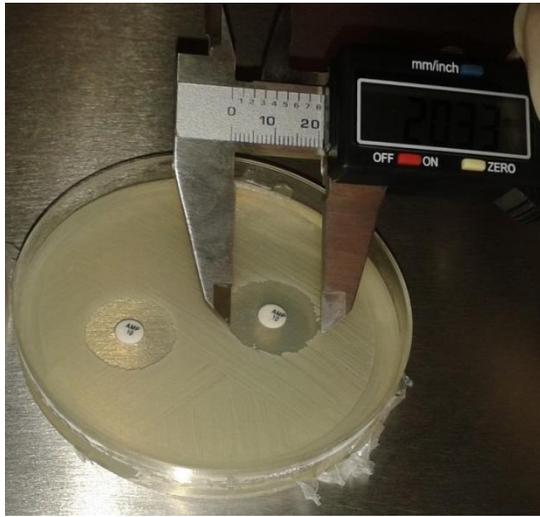


Figura 5: Medición del diámetro de inhibición formado mediante el uso de un calibrador.

La segunda determinación realizada fue la prueba cromogénica o de cefalosporinas cromógenas, la cual utiliza un compuesto denominado nitrocefín que está disponible en discos de papel de filtro impregnados con dicha sustancia. La prueba consiste en la realización de un frotis sobre el disco de una buena cantidad de colonias de cada una de las cepas y una pequeña cantidad de agua estéril, usando un asa bacteriológica estéril, posteriormente, los discos impregnados con las colonias bacterianas se colocan sobre una placa Petri cerrada para evitar la rápida desecación. Las cepas que contenían β -lactamasas cambiaron el color del disco de nitrocefín de amarillo a rojo/naranja; mientras que la cepa no productora permaneció de coloración amarilla aún una hora después de la impregnación. La prueba se leyó una hora después de realizado el frotis (Koneman, 2008).

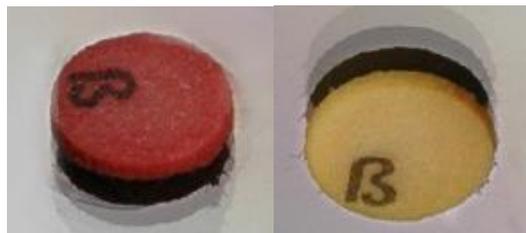


Figura 6: Prueba Cromogénica. Disco amarillo indica no producción de enzimas betalactamasas. Cambio de color del disco a rojo, indica positivo para la producción de enzimas betalactamasas. Imagen tomada de: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/NitrocefDisks

El fundamento de esta prueba se basa en el cambio de color que exhibe la cepa bacteriana cuando es productora de enzimas β -lactamasas, como consecuencia de la reacción de hidrólisis que tiene lugar en el enlace amida del anillo betalactámico del nitrocefín por acción de las enzimas β -lactamasas (O'Callaghan, Morris, Kirby, & Shingler, 1972). Esta prueba es rápida y confiable, y permite una determinación con alta especificidad acerca de la producción de enzimas β -lactamasas en la cepa objeto de estudio.

6.2.3 Pruebas de micro-dilución en caldo para evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Para determinar el efecto que presenta el antibiótico solo sobre las cepas de *S. aureus* seleccionadas en el estudio, al igual que el polímero solo y la matriz polimérica fármaco-polímero se llevaron a cabo los siguientes tratamientos:

Tabla 1: Tratamientos evaluados en las pruebas de micro-dilución en caldo sobre las cepas en estudio de *S. aureus* ATCC 25923, 29213 y 43300.

Ensayo	Componentes (ensayos)	Proporción de los componentes	Intervalo de concentraciones evaluadas ($\mu\text{g/mL}$)
1	ampicilina trihidrato	-	0,0625; 0,125; 0,25; 0,35; 0,5; 2; 8; 32; 128; 256; 512 $\mu\text{g/mL}$.
2	PAM-18 Na	-	0,0625; 0,125; 0,25; 0,35; 0,5; 2; 8; 32; 128; 192; 256 $\mu\text{g/mL}$.
3	ampicilina + PAM-18 Na	1:1	0,0625; 0,125; 0,25; 0,35; 0,5; 2; 8; 32; 128; 192; 256 $\mu\text{g/mL}$.

Se realizaron tres ensayos en total con 24 réplicas cada uno, con la finalidad de disminuir la variabilidad de los resultados. Las pruebas de micro-dilución en caldo se llevaron a cabo inoculando las placas de 96 pozos con concentraciones experimentales que se definieron de antibiótico, polímero o de la solución antibiótico- polímero (50 μL por pozo), y concentraciones fijas de microorganismos (10 μL por pozo); en el inóculo final preparado se espera que la concentración bacteriana que se encuentra en crecimiento se aproxime a: 5×10^5 (UFC/mL),

realizando una dilución 1:20 a partir de la suspensión bacteriana ajustada al estándar de Mc Farland más Caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes (Cavalieri, 2005). Se determinó experimentalmente en este estudio que la dilución de la suspensión bacteriana inicial preparada hasta la obtención de una final diluida, permite conseguir unos resultados más reproducibles y con menor variabilidad.

Las concentraciones evaluadas en el ensayo 2 y 3 fueron diferentes respecto al ensayo 1, debido a que la concentración máxima a la cual se podía solubilizar el polímero PAM 18 Na en medio acuoso era aproximadamente 256 µg/mL; mientras, que la ampicilina trihidratada se evaluó hasta un concentración de 512 µg/mL en las pruebas de micro-dilución en caldo como consecuencia de su buena solubilidad en agua. Cabe aclarar que estas concentraciones se establecieron de manera experimental en el presente estudio, con el objetivo de determinar la respuesta que expresaba cada componente (polímero, antibiótico o polímero más antibiótico) en la prueba de micro-dilución en caldo, resultado que permite en estudios posteriores realizar ensayos con concentraciones ya definidas y seriadas de cada componente, al existir datos previos de su comportamiento.

Posteriormente, las placas se incubaron de 16 a 20 horas a 35°C, después de cumplido dicho intervalo de tiempo éstas fueron interpretadas (Cavalieri, 2005). La lectura se realizó, tomando como respuesta positiva para el crecimiento, la formación de un precipitado de color amarillo-crema en el fondo de la placa o la presencia de turbidez observada bajo luz transmitida. Como inhibición de crecimiento se tomó la ausencia del precipitado en la placa o la no presencia de turbidez en los pozos. Cada placa incluía un control positivo en el cual era inoculada la bacteria en caldo Mueller Hinton (con ajuste de cationes), y un control negativo usando la concentración más alta de antibiótico, polímero o antibiótico más polímero- según corresponda- (90µL por pozo) más 10µL por pozo de la suspensión bacteriana, tratamiento al cual no se evidenció crecimiento del microorganismo.



Figura 7: Prueba de micro-dilución en caldo. En rosado se ilustra la concentración de antibiótico a la cual hay crecimiento bacteriano (se observa un precipitado y/o turbidez). En rojo se ilustra la concentración a la cual no hay crecimiento bacteriano (CMI). En blanco se ilustra el control positivo realizado en cada tratamiento.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se tomó como la menor concentración de antibiótico, polímero o antibiótico más polímero evaluada, que inhibió el crecimiento del microorganismo. La prueba se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos estandarizados del CLSI. A continuación se describen los pasos generales seguidos en la prueba de micro-dilución en caldo:

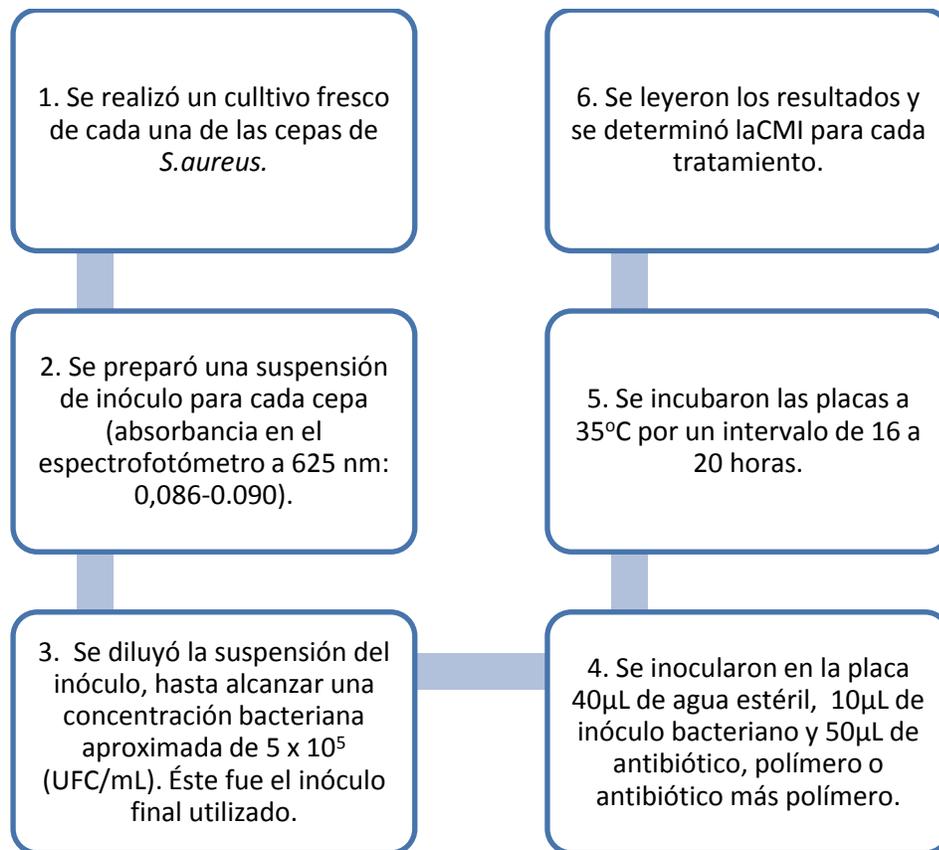


Figura 8: Esquema del método de micro-dilución en caldo utilizado en el estudio.

6.2.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos de las pruebas de micro-dilución en caldo.

El análisis estadístico se llevó a cabo a partir del método no paramétrico de Kaplan Meier que permite determinar la función de supervivencia de una población (en este caso la bacteriana). Para lo cual la respuesta estadística obtenida a través del tratamiento de los datos son curvas de supervivencia de Kaplan-Meier; donde se calcula la supervivencia como producto de probabilidades condicionadas (Quintín Martín, 2008). La CMI de los diferentes compuestos: antibiótico, polímero y la mezcla antibiótico más polímero se fijó en términos de la probabilidad de inhibición del crecimiento bacteriano. Así que si la probabilidad de inhibir el crecimiento bacteriano a una concentración definida es del 90% (o un valor aproximado al mismo) se definirá como CMI_{90} , si es del 100% será CMI_{100} . Una CMI_{100} significa que un tratamiento particular consiguió inhibir en todas las réplicas realizadas (24 réplicas) el 100% del crecimiento de la bacteria.

7. RESULTADOS

7.1 Determinación de la resistencia expresada por cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 29213 y 43300, y evaluación de la producción de enzimas β -lactamasas en las cepas estudiadas.

7.1.1 Prueba de difusión en disco:

Tabla 2: Resultados obtenidos de la prueba de difusión en disco para cada una de las cepas de *S. aureus*.

Cepa evaluada	Diámetro zona de inhibición (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar	Características del halo de inhibición.
ATCC 25923	34,29	33,99	0,5205	halo definido
	33,35			
	33,81			
	34,52			
ATCC 29213	21,34	20,15	0,9342	Crecimiento difuso del halo de inhibición.
	19,82			
	20,33			
	19,12			
ATCC 43300	11,52	12,19	0,5133	Crecimiento difuso del halo de inhibición.
	12,49			
	12,66			
	12,13			



Figura 9: Halo de inhibición definido obtenido para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923

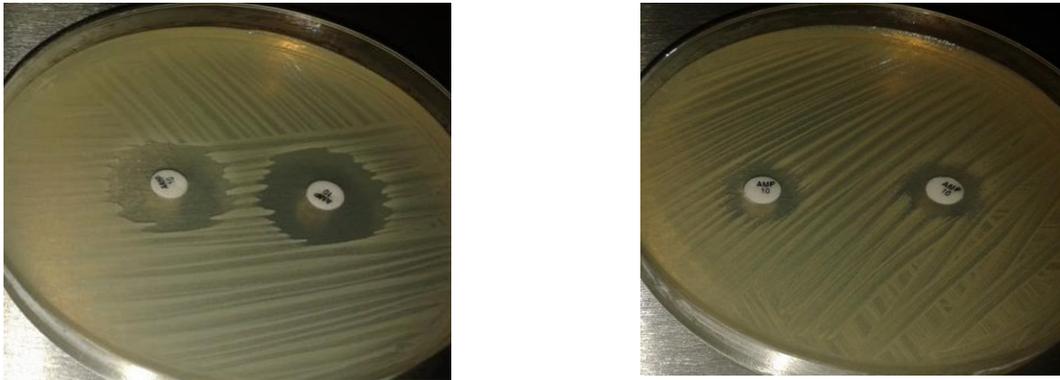


Figura 10: Halo de inhibición difuso obtenido para la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 (lado izquierdo), y para la cepa ATCC 43300 (a la derecha).

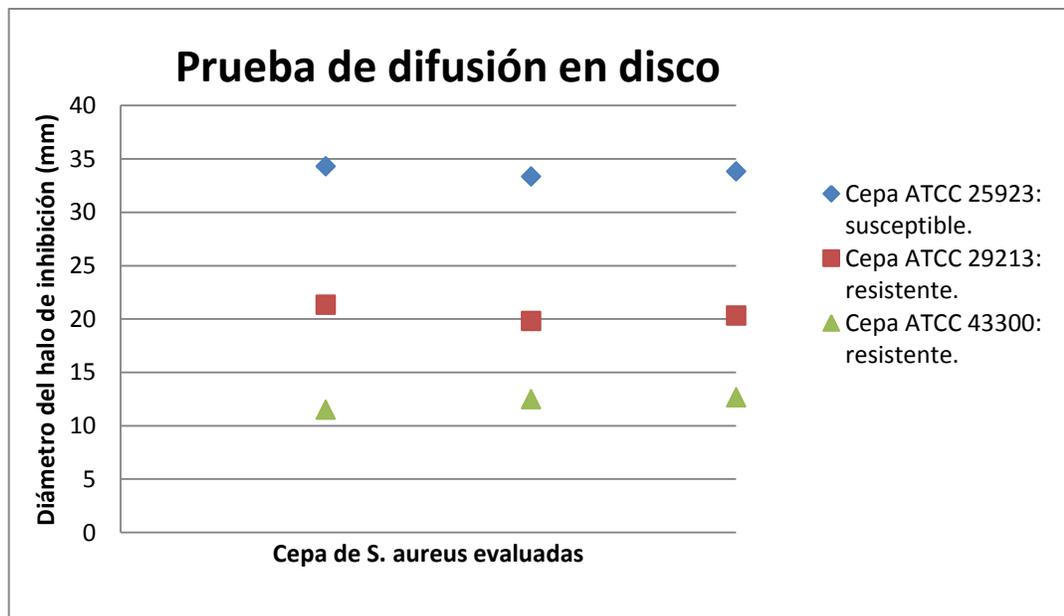


Figura 111: Comportamiento de las cepas de *S. aureus* en términos de nivel de susceptibilidad o resistencia hacia la ampicilina.

7.1.2 Prueba cromogénica o de cefalosporinas cromogénicas:

Tabla 3: Resultados prueba cromogénica con discos de nitrocefín comerciales sobre las cepas de *S. aureus* ATCC 25923, 29213 y 43300.

Cepa de <i>S. aureus</i>	Resultado
ATCC 25923	No presentó cambio de color (permaneció amarillo).
ATCC 29213	Cambio de color de amarillo a rojo intenso.
ATCC 43300	Cambio de color de amarillo a rojo anaranjado.

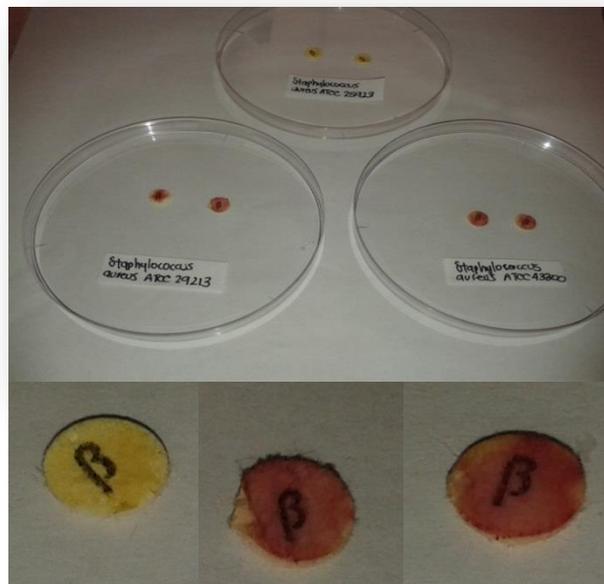


Figura 122: Resultados obtenidos de la prueba cromogénica para las cepas de *S. aureus* evaluadas.

7.1.3 Prueba de micro-dilución en caldo:



Figura 133: Resultado de la prueba de micro-dilución en caldo para la cepa ATCC 25923. Ensayo con ampicilina.

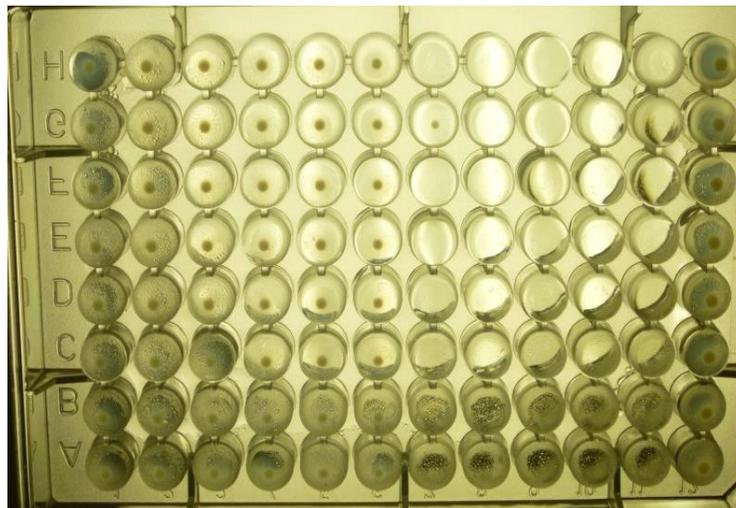


Figura 144: Resultado de la prueba de micro-dilución en caldo para la cepa ATCC 29213. Ensayo con ampicilina.

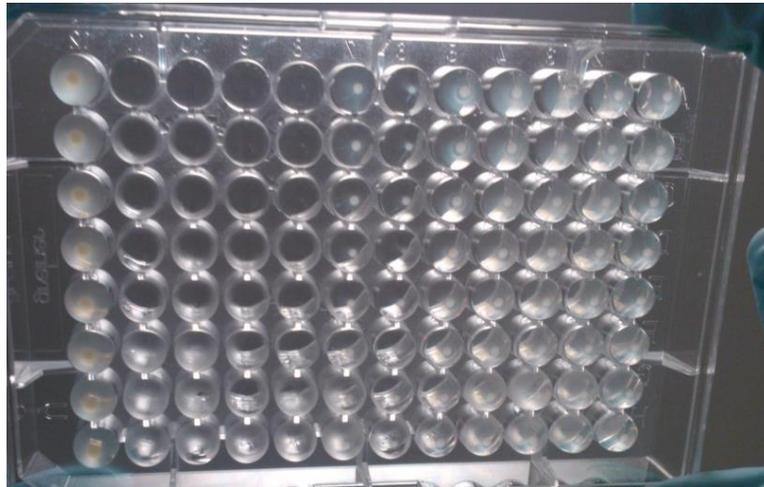


Figura 155: Resultado de la prueba de micro-dilución en caldo para la cepa ATCC 43300. Ensayo con ampicilina.



Figura 166: Resultado obtenido de la prueba de micro-dilución en caldo para cada una de las cepas de *S. aureus* estudiadas. Ensayo con la matriz polimérica PAM-18 Na.



Figura 177: Resultado obtenido de la prueba de micro-dilución en caldo para la de *S. aureus* ATCC 29213. Ensayo con la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1.

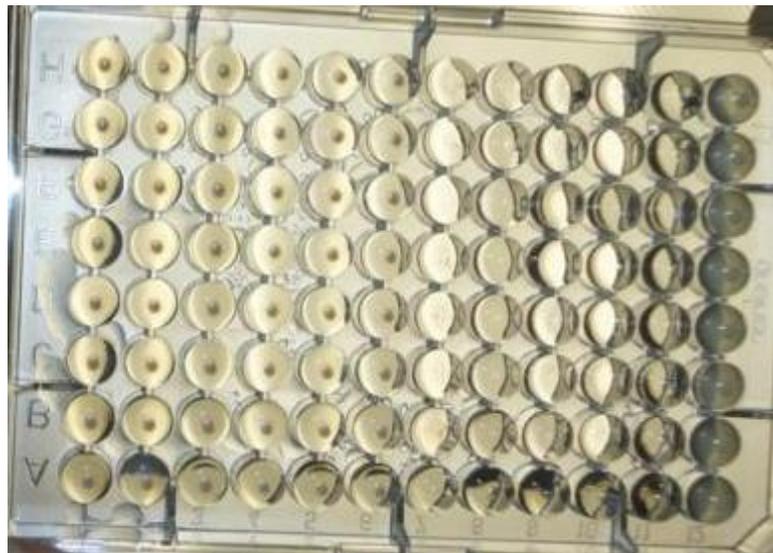


Figura 188: Resultado obtenido de la prueba de micro-dilución en caldo para la de *S. aureus* ATCC 43300. Ensayo con la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

8.1 Prueba de difusión en disco:

De acuerdo a los parámetros establecidos por el CLSI, se determinó si las cepas de *Staphylococcus aureus* eran susceptibles a la ampicilina o eran resistentes al antibiótico, por medio de los diámetros obtenidos de las zonas de inhibición que cada cepa de *S. aureus* exhibió al realizar la prueba. La forma del halo de inhibición indicó para cada cepa la producción o la no producción de enzimas β -lactamasas.

Tabla 4: Criterios según el CLSI para determinar la susceptibilidad (S) o resistencia (R) de las cepas de *Staphylococcus* hacia la ampicilina (CLSI, 2012).

Agente Antimicrobiano	Contenido del disco (μ g)	Diámetro de la zona de inhibición (mm).		
		S	I	R
Ampicilina	10	≥ 29	-	≤ 28

Información tomada de CLSI, 2012, Performance Standards for antimicrobial Susceptibility testing; twenty- second informational Supplement.

Al realizar la prueba de difusión en disco para la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 se evidenció que la cepa era susceptible a la ampicilina porque ésta presentó un diámetro promedio de la zona de inhibición formada de 33,99 mm (observar en la tabla 2). Lo cual es indicativo de la acción bacteriostática que estaba ejerciendo el antibiótico sobre el microorganismo. En cuanto a la producción de enzimas β -lactamasas, se evidenció que la cepa ATCC 25923 no era productora, pues ésta presentó un crecimiento definido del halo de inhibición (figura 9), resultado que confirma las características de la cepa ATCC adquirida.

Para la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 se obtuvo que ésta es resistente a la ampicilina, ya que exhibió un diámetro promedio de la zona de inhibición de 20,15 mm (observar en la tabla 4). Resultado que indica que la acción del antibiótico no está siendo del todo eficaz debido a un mecanismo de resistencia presente en el microorganismo; en este caso, la razón se fundamenta en la producción de enzimas β -lactamasas en la cepa ATCC 29213 ya que se obtuvo un borde difuso o no definido en la zona de inhibición (Figura 10).

Por su parte para la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 se obtuvo una resistencia más marcada del microorganismo hacia la ampicilina, ya que exhibió un diámetro promedio de la zona de inhibición de 12,19 mm (observar en la tabla 5). Resultado que evidenció un mecanismo de acción bacteriostático bastante débil de la ampicilina frente a la cepa en cuestión; en este caso, la razón se fundamenta en la producción de enzimas β -lactamasas por parte de la cepa ATCC 43300, ya que se obtuvo un borde difuso o no definido en la zona de inhibición (Figura 10), y también se debe al mecanismo de resistencia que posee la cepa al ser MecA positiva (gen de resistencia a la meticilina MRSA). Por lo cual, el halo de inhibición obtenido es resultado de la sinergia existente entre los dos mecanismos de resistencia presentes en esta cepa.

Los valores obtenidos del halo de inhibición para cada una de las cepas, se ilustran en la figura 11, en donde se puede observar que las cepas ATCC 29213 y 43300 expresan un nivel de resistencia hacia el fármaco betalactámico, a diferentes niveles. Mientras, que la cepa ATCC 25923 resulta siendo sensible frente al efecto bacteriostático, y en última instancia bactericida del antibiótico.

8.2 Prueba Cromogénica o de cefalosporinas cromogénicas:

Por último, se realizó la prueba cromogénica o de cefalosporinas cromogénicas con el objetivo de validar y verificar los resultados anteriormente obtenidos. Los cuales se describen en la tabla 3.

Estos resultados indican que la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no es productora de enzimas β -lactamasas, ya que después de una hora de iniciada la prueba, el disco de nitrocefin permaneció de coloración amarilla, indicando un resultado negativo para la producción de la enzima. Por otro lado, la cepa ATCC 29213 demostró ser productora de β -lactamasas porque el anillo betalactámico de la cefalosporina cromogénica fue hidrolizado cambiando de coloración de amarilla a roja intensa después de 15 minutos de haber iniciado la prueba. Por último, para la cepa ATCC 43300 se evidenció una producción de enzimas β -lactamasas menos marcada en comparación con la cepa anterior, pues el cambio de color se dio de amarillo a rojo anaranjado (Figura 12).

Los cambios en las coloraciones observados, se deben a que esta prueba es realizada con un disco de nitrocefina el cual utiliza un sustrato betalactámico cromogénico (una cefalosporina); compuesto que cambia de color cuando el grupo funcional amida de su anillo betalactámico es hidrolizado por acción de una enzima β -lactamasa (ver estructura molecular en la figura 19). La hidrólisis de la nitrocefina produce un cambio de la absorción ultravioleta dentro del espectro de luz visible desde amarillo para la nitrocefina que no ha sufrido hidrólisis (~ 380 nm)

hasta rojo para la nitrocefina degradada (~500 nm), lo que permite la detección visual de la actividad beta- lactamasa en un nivel macroscópico.

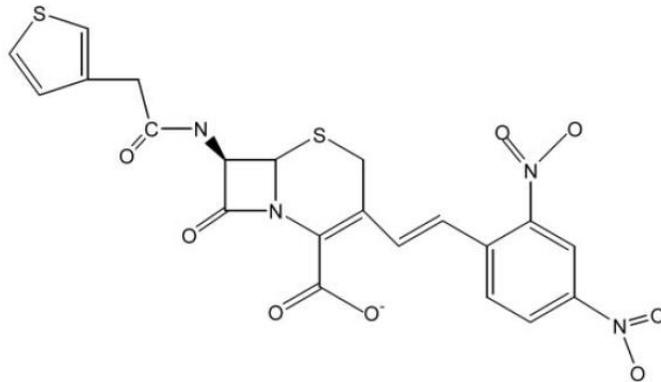


Figura 199: “Estructura molecular del nitrocefina, cefalosporina cromogénica usada en la detección de enzimas β -lactamasas en las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas. Tomado de Sauvage, E, et al, 2005, Crystal Structure of the Actinomadura R39 DD-peptidase Reveals New Domains in Penicillin-binding Proteins”.

8.3 Prueba de micro-dilución en caldo:

En esta fase las pruebas se realizaron e interpretaron bajo el supuesto de que el polímero PAM-18 Na se encuentra bien disperso en el medio acuoso utilizado y que está asociado al antibiótico (ampicilina) de manera efectiva, información evaluada en otros estudios realizados en el mismo grupo de investigación en Fisicoquímica- Farmacéutica de la Universidad Icesi. Adicionalmente, se determinó la estabilidad del antibiótico durante el tiempo en que se desarrollaron las pruebas (Anexo 5).

Para determinar la CMI del antibiótico, el polímero y de la matriz fármaco-polímero se realizaron 24 réplicas para cada una de las concentraciones evaluadas (11) de cada tratamiento, dando un total de 264 unidades experimentales por cepa. Los resultados detallados de cada uno de estos ensayos se muestran en el anexo 6. A partir de los resultados anteriores se puede determinar el valor de la CMI de la ampicilina, PAM-18 Na y de la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na. A continuación se muestra en la tabla 5 los resultados obtenidos de la prueba de micro-dilución en caldo para cada una de las cepas bacterianas evaluadas con el polímero, el antibiótico y la mezcla antibiótico-polímero, comparando dichos resultados con los parámetros establecidos por el CLSI.

Tabla 5: Resultados pruebas de micro-dilución en caldo para cada uno de los ensayos realizados en las cepas de *S. aureus*. Como punto de comparación se encuentran las CMI establecidas como puntos de corte para especies de *Staphylococcus* por el CLSI.

Sistema/cepa	CMI establecidas como puntos de corte por el CLSI ($\mu\text{g/mL}$).	CMI obtenida para la ampicilina ($\mu\text{g/mL}$)	CMI obtenida para el PAM-18 Na ($\mu\text{g/mL}$)	CMI obtenida para el sistema de mezcla ampicilina: PAM-18 Na ($\mu\text{g/mL}$)
Cepa ATCC 25923	$\begin{array}{l} \text{S} \quad \text{R} \\ \leq 0,25 \quad \geq 0,5 \end{array}$	0,25	-	0,25
Cepa ATCC 29213		8	-	2
Cepa ATCC 43300		32	-	8

Primero, se realizó la prueba de micro-dilución en caldo a cada una de las cepas de *S. aureus*, utilizando el antibiótico en cuestión (ampicilina), con la finalidad de establecer la concentración mínima de ampicilina requerida para inhibir el crecimiento de cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus*, además de verificar la susceptibilidad o resistencia de las mismas hacia el fármaco a través de la CMI obtenida. Para la cepa ATCC 25923 se evidenció que el microorganismo es susceptible a la ampicilina, pues la CMI obtenida fue de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ y de acuerdo a lo establecido por el CLSI, la cepa de *S. aureus* es susceptible a la ampicilina si su CMI es $\leq 0,25 \mu\text{g/mL}$ (Tabla 5). Por otro lado, para las cepas ATCC 29213 y 43300 se determinó que éstas son resistentes al antibiótico, porque la CMI obtenida fue de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ y 32 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; y de acuerdo a los puntos de corte del CLSI para *S. aureus* es de $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$, lo que indica que concentraciones superiores a estas denotarán la resistencia en el microorganismo.

En segundo lugar, se evaluó la matriz polimérica de PAM-18 Na junto con cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas. El objetivo era

determinar si el polímero anfílico podría exhibir algún efecto antimicrobiano por sí solo sobre las cepas. De los resultados obtenidos se concluyó que la matriz polimérica de PAM-18 Na no tiene ningún efecto antimicrobiano (inhibición del crecimiento) en las cepas utilizadas. Lo anterior se puede establecer porque se presentó crecimiento bacteriano en todas las réplicas realizadas de cada una de las concentraciones de polímero evaluadas, desde la menor concentración estudiada 0,0625 µg/mL hasta la concentración más alta evaluada 256 µg/mL (Anexo 6.2).

Por último, se realizó la prueba de micro-dilución en caldo, evaluando el efecto antimicrobiano que exhibe la matriz de asociación fármaco-polímero de ampicilina-PAM 18 Na sobre cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus*, de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria obtenida con el antibiótico solo. Para la cepa ATCC 25923 se obtuvo una CMI de 0,25 µg/mL, la misma concentración obtenida para el antibiótico solo (es decir, en ausencia del polímero) lo que indica que al ser susceptible la cepa a la ampicilina, por no presentar ningún mecanismo de resistencia aparente, la concentración requerida del antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano permanece constante bajo estas condiciones (Tabla 5). Al utilizar en este estudio la cepa ATCC 25923 como control negativo, se pudo inferir que el polímero presenta una acción clave en la inhibición o la reducción del efecto de resistencia dado por las β-lactamasas, ya que esta cepa no es productora de dichas enzimas, lo que ocasiona que el polímero no exprese junto con el antibiótico una reducción de la CMI, porque las enzimas responsables de la inestabilidad biológica de la ampicilina están ausentes en la cepa de *S. aureus* ATCC 25923.

Para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se obtuvo una CMI de 2,0 µg/mL, es decir que se logró disminuir cuatro veces la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento del microorganismo en comparación a la CMI obtenida cuando se evaluó la ampicilina sola (8,0 µg/mL), lo cual indica que existe un efecto antimicrobiano marcado cuando el antibiótico se encuentra asociado a la matriz polimérica de PAM 18 Na, actuando ésta como un sistema de reservorio que protege al fármaco de la degradación enzimática que tiene lugar a través de las β-lactamasas exógenas producidas por la cepa de *S. aureus* ATCC 29213. El polímero en este caso tuvo un papel fundamental en la disminución de la resistencia expresada por esta cepa en pruebas anteriores (en la de difusión en disco, prueba cromogénica y la de micro-dilución); debido a que logró disminuir la CMI del antibiótico en un 75%, cuando éste se encontraba asociado con la ampicilina.

Finalmente, para la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 se obtuvo una CMI de 8,0 µg/mL lo que indica que se logró disminuir cuatro veces la concentración requerida de ampicilina para inhibir el crecimiento bacteriano en comparación con la obtenida cuando se estudió la ampicilina sola (32,0 µg/mL). Este resultado no sólo indica que existe un efecto bio-protector de la matriz

polimérica en asociación con el fármaco betalactámico que mitiga la degradación de la ampicilina propiciada por las enzimas β -lactamasas que ésta produce, al actuar como un sistema reservorio que le brinda estabilidad biológica al fármaco; sino que también pueda inferirse de acuerdo al mecanismo adicional de resistencia que posee la cepa de *S. aureus* ATCC 43300 (por modificación de las PBPs o del blanco donde actúa el fármaco), que exista posiblemente, una acción del polímero incrementando la concentración de antibiótico disponible, saturando así las PBPs modificadas y afectando a las PBPs no modificadas presentes en la bacteria, lo que se traduce como un aumento de la actividad del antibiótico. Se podría pensar que la mayor disponibilidad de la ampicilina en el medio aumentaría la afinidad de la diana farmacológica hacia el antibiótico.

8.4 Análisis estadístico mediante el método de Kaplan-Meier

Con los resultados obtenidos de los ensayos de micro-dilución se realizó el análisis de supervivencia de cada una de las cepas de *S. aureus*, en cada uno de los tratamientos a los cuales estuvieron expuestas. El modelo de Kaplan-Meier permitió medir la fracción viviente de una población bacteriana en un intervalo de concentraciones evaluado. De modo, que en el eje X puede encontrarse la probabilidad de que se inhiba el crecimiento de cada una de las cepas de *S. aureus*, siendo 1 la probabilidad de que el 100% de la población presente crecimiento aparente en la placa y 0,2 la probabilidad de que el 20% de la población bacteriana presente crecimiento, mientras que el 80% resulte inhibido por el tratamiento dado. En el eje Y, se aprecia todo el intervalo de concentraciones estudiado para cada tratamiento en las pruebas de micro-dilución en caldo.

Con el análisis estadístico realizado se puede verificar que el polímero PAM-18 Na, no presenta ningún efecto antimicrobiano cuando se evalúa solo en cada una de las cepas de *S. aureus*, ya que en las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier obtenidas se evidencia que la probabilidad de que la población bacteriana presente crecimiento es del 100% (probabilidad de 1) en todo el intervalo de concentraciones evaluadas de PAM-18 Na (Anexo 7).

Por otra parte, se pudo definir a partir del método estadístico no paramétrico que la CMI_{100} obtenida para la cepa ATCC 29213 en presencia de la ampicilina sola fue de 8,0 $\mu\text{g/mL}$, concentración mínima inhibitoria que logra reducirse cuatro veces cuando se expone a la misma cepa al tratamiento con la matriz ampicilina: PAM-18, siendo la CMI_{100} para dicho ensayo de 2,0 $\mu\text{g/mL}$, concentración a la cual el 100% de la población bacteriana ha presentado inhibición del crecimiento (Anexo 7). Se puede apreciar también de la gráfica que a medida que aumenta la

concentración de antibiótico o de antibiótico más polímero la probabilidad de que la población bacteriana logre sobrevivir es menor.

Por último, para la cepa ATCC 43300 se evidenció una CMI_{100} para el tratamiento con la ampicilina trihidratada sola de 32,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que el 100% de los individuos bacterianos lograron inhibirse en el tratamiento con la matriz ampicilina: PAM-18 a una CMI_{100} de 8,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que evidencia un efecto positivo del complejo antibiótico-polímero sobre la cepa de *S. aureus* porque la supervivencia del microorganismo es cada vez más baja a un intervalo de concentraciones menor, en comparación a cuando se evalúa la ampicilina sola (Anexo 7).

9. CONCLUSIONES

- Al estudiar *in vitro* el efecto de la ampicilina trihidratada sobre las cepas de *S. aureus*, se evidenció que la cepa ATCC 25923 es susceptible al antibiótico, mientras que la ATCC 29213 y la ATCC 43300 son resistentes al fármaco betalactámico.
- Al evaluar el efecto *in vitro* del polímero anfifílico PAM-18 Na sobre las cepas de *S. aureus*, se encontró que la matriz polimérica no posee ningún efecto antimicrobiano por si solo a las concentraciones evaluadas.
- La asociación del polímero con el fármaco consigue reducir la concentración de antibiótico (aproximadamente un 75%) necesaria para inhibir el crecimiento de las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y 43300 en comparación al tratamiento realizado con el antibiótico solo.
- El polímero anfifílico PAM-18 Na en proporción 1:1 con el antibiótico parece ejercer un efecto bio-protector sobre la ampicilina que la protege de la acción de enzimas β -lactamasas, aumentando su disponibilidad en el sitio de acción lo que mejora su efecto antimicrobiano.

10. RECOMENDACIONES

- Para obtener resultados cuantitativos que permitan obtener una información más certera del efecto de la matriz de asociación fármaco-polímero sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* evaluadas, se recomienda realizar estudios con un lector de platos (ELISA).
- Se sugiere estudiar el efecto que puede producir la variación de las proporciones de antibiótico y polímero sobre la formación de la matriz de asociación ampicilina: PAM 18 Na, y la estabilidad de la misma al variar la concentración de los componentes. Evaluando proporciones de ambos componentes como por ejemplo: 1:1,5 y 1:2 sobre las diferentes cepas de *S. aureus*.
- Si se quiere realizar estudios posteriores con antibióticos diferentes a la ampicilina, se deben seguir todas las recomendaciones presentes en este trabajo, además de que deben modificarse los factores o condiciones de los ensayos, de acuerdo a los parámetros ofrecidos por el CLSI para el fármaco en cuestión.
- Si se pretende confirmar la meticilino- resistencia en la cepa de *S. aureus* ATCC 43300, se sugiere la realización de una PCR que permita la determinación de elementos genéticos asociados a este tipo de resistencia.
- Se recomienda realizar estudios adicionales que logren dar respuesta al comportamiento bio-protector del complejo antibiótico-polímero sobre las cepas de *S. aureus* para comprender el mecanismo mediante el cual esta matriz funciona como un reservorio que brinda estabilidad biológica.

11. REFERENCIAS

- Abarca, G., & Herrera, M. L. (2002). Betalactamasas: su importancia en la clínica y su detección en el laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 36(1-2), 77-104.
- AlSaimary, I. E. A. (2012). Prevalence of β -lactamase producing and non-producing *Staphylococcus aureus* associated with patients in intensive care unit. *International Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(3), 65-74.
- Arenas Fernández, T., Mora Arango, C. L., Salamanca, C. H., & Jaramillo Flórez, M. C. (2012). Activity of (2E)-3-(2, 3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona in the presence of poli(maleic acid-co-2-vinyl-pyrrolidone) on a β -lactamase producing clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Iatreia*, 25(1), 12–19.
- Berga, A. [et al] P. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus* (Primera.). Barcelona, España: MARGE BOOKS.
- Castellano González, M. J., & Perozo-Mena, A. J. (2010). Mecanismo de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*; Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 18-35.
- Cavaliere, S.J. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. (Coyle, M. B., Ed.). University of Washington: Library of Congress Cataloging-in-Publication Data.
- Clínica, S. E. (2000). SEGURIDAD EN EL LABORATORIO. En R. d. Clínica, *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pág. 6). España.
- Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 277–282. doi:10.1016/S0964-8305(03)00042-8
- CLSI. (2012, enero). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Recuperado a partir de www.clsi.org/
- Echevarria, J., & Iglesias, D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos., 14(4), 195–203.
- Gennaro, I. a. (2003). *Remington Farmacia*. Buenos Aires- Argentina: Panamericana.

Gill, V. J., Manning, C. B., & Ingalls, C. M. (1981). Correlation of penicillin minimum inhibitory concentrations and penicillin zone edge appearance with staphylococcal beta-lactamase production. *Journal of Clinical Microbiology*, 14(4), 437–440.

GIL D de M, M. O. N. I. C. A. (2000). Staphylococcus aureus: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista chilena de infectología*, 17(2), 145-152.

Giner Almaraz, S., Canos Cabedo, M., Rodilla Calvelo, F., & Ferrer Gómez, C. (1996). Valoración de los inhibidores de las betalactamasas. *FARMACIA HOSPITALARIA*, 20, 225-237.

Greca A, La resistencia bacteriana y los nuevos antibióticos. VI Jornadas Internacionales de Medicina Interna–X Jornadas de Medicina Interna del Litoral Argentino Enfermedades Regionales. 2000.

Kfoury, S., Araj G., Recent Developments in β Lactamases and Extended Spectrum β Lactamases, 2003; 327(7425):1209-1213.

Kenneth Connors, G. A. (1986). *Chemical Stability of Pharmaceuticals*. A Handbook for Pharmacists.

Koneman, e. a. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aires- Argentina: Panamericana.

Llarrull, L. I., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2009). Molecular Basis and Phenotype of Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus and Insights into New β -Lactams That Meet the Challenge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(10), 4051–4063. doi:10.1128/AAC.00084-09

Lowy, F. D. (1998). Staphylococcus aureus infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.

Lowy, F. D. (2003a). Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273. doi:10.1172/JCI18535

Medina Landaeta, A. E. (2011). *Resistencia antimicrobiana en aislados de Escherichia coli de conejos tratados por vía oral con diferentes pautas de doxiciclina*. Universidad Complutense de Madrid, Tesis Doctoral.

Microbiology, A. A. f. (1999). *ANTIMICROBIAL RESISTANCE: AN ECOLOGICAL PERSPECTIVE*.

Molina, F. J., Díaz, C. A., Barrera, L., De La Rosa, G., Dennis, R., Dueñas, C., Jaimes, F. (2011). Microbiological profile of infections in the Intensive Care Units of

Colombia (EPISEPSIS Colombia). *Medicina Intensiva (English Edition)*, 35(2), 75–83. doi:10.1016/S2173-5727(11)70011-X

Naber, C. K. (2009). Staphylococcus aureus bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48 Suppl 4, S231–237. doi:10.1086/598189

O'Callaghan, C. H., Morris, A., Kirby, S. M., & Shingler, A. H. (1972). Novel Method for Detection of β -Lactamases by Using a Chromogenic Cephalosporin Substrate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1(4), 283–288. doi:10.1128/AAC.1.4.283.

OMS. (2005). *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*. World Health Organization.

Prior, S., Gamazo, C., Irache, J. M., Merkle, H. P., & Gander, B. (2000). Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections. *International journal of pharmaceutics*, 196(1), 115-125

Quintín Martín, M. T. (2008). *Tratamiento estadístico de datos con SPSS*. Madrid, España: Thomson.

Rang, H. P., & Dale, M. M. (2008). *RANG Y DALE, Farmacología (Sexta.)*. Barcelona, España: Elsevier España. Retrieved from <http://books.google.com.co/books?id=uo7BNGv51woC&printsec=frontcover&dq=pharmacology+rang&hl=es&sa=X&ei=5RmoUK-7Hor49QTgwoCACA&ved=0CDAQ6AEwAg#v=onepage&q=pharmacology%20rang&f=false>

Rice, L. B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *The American journal of medicine*, 119(6), S11-S19.

Rojas Cortés, M. G., Vallejo Díaz, B. M., & Perilla, J. E. (2008). Biopolymers as materials for product development in pharmaceutical applications and biomedical uses. *Ingeniería e Investigación*, 28(1), 57-71.

Ross Fitzgerald, J. (2013). Evolution of Staphylococcus aureus during human colonization and infection. *Infection, Genetics and Evolution*. doi:10.1016/j.meegid.2013.04.020.

Ruszczak, Z., & Friess, W. (2003). Collagen as a carrier for on-site delivery of antibacterial drugs. *Advanced drug delivery reviews*, 55(12), 1679-1698.

Salamanca C. H. (2007). *Estudio de propiedades fisicoquímicas de polieletrólitos aniónicos en solución como potenciales reservorios de sustratos farmacológicos* (Tesis Doctoral). Universidad de Chile, Santiago, Chile. Recuperado a partir de http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/salamanca_c/sources/salamanca_c.pdf.

Sauvage, E., Herman, R., Petrella, S., Duez, C., Bouillenne, F., Frère, J. M., & Charlier, P. (2005). Crystal structure of the Actinomadura R39 DD-peptidase reveals new domains in penicillin-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 31249-31256.

Smith, T. L., & Jarvis, W. R. (1999). Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. *Microbes and Infection*, 1(10), 795–805. doi:10.1016/S1286-4579(99)80082-3

Sussmann, A., Mattos, L., Restrepo, A., (2002). Resistencia bacteriana. *Revista Universitas Médica* 43.

Sussmann, O. A., Mattos, L., & Restrepo, A. (2011). *Resistencia bacteriana*. Extraído el. Retrieved from http://www.edu365.cat/aulanet/comsoc/treballsrecerca/treballs_04_05/suggeriments_04_05/suggeriments_bacteries/documents/resistencia_javeria.pdf

Vaez, H., Tabaraei, A., Abdolvahab, M., & Ezzat, G. (2011). Evaluation of methicillin resistance *Staphylococcus aureus* isolated from patients in Golestan province-north of Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 432–436. doi:10.5897/AJMR10.877

Veterinaria, T. (2012). *Erma Productos Veterinarios*. Recuperado el 07 de 11 de 2013, de <http://www.terapeutiveterinaria.com/antibioticos/betalactamicos/ampicilina>

Vignoli, R., & Seija, V. (2006). Principales mecanismos de resistencia antibiótica. In *Temas de bacteriología y virología médica* (Segunda., pp. 649–662). Oficina del Libro FEFMUR.

Yang, X. F., Zeng, F. D., Zhou, Z. B., Huang, K. X., & Xu, H. B. (2003). In vitro release and antibacterial activity of poly (oleic/linoleic acid dimer: sebacic acid)-gentamicin. *Acta pharmacologica Sinica*, 24(4), 306-310.

Zhang, H. Z., Hackbarth, C. J., Chansky, K. M., & Chambers, H. F. (2001). A Proteolytic Transmembrane Signaling Pathway and Resistance to β -Lactams in *Staphylococci*. *Science*, 291(5510), 1962–1965. doi:10.1126/science.1055144

12. ANEXOS

ANEXO 1: Certificado de Calidad de la ampicilina trihidratada.

CÓDIGO: FC-049	REGISTRO RESULTADO DE MATERIAS PRIMAS	Syntofarma
Función: 02	PAGINA 1 DE 1	
VIGENTE HASTA: NOV/2013		

Laboratorio: Tecnoquímicas	No. de entrada: M12320	
Producto: Ampicilina Trihidrato Polvo	Aprobado (x)	
Lote: F253120	Rechazado ()	
Fecha de Fabricación: Diciembre 2011		
Fecha de vencimiento: Noviembre 2016		
Fecha de reanálisis: Septiembre 2013		
Fabricante: Fersinsa SpA		
Cantidad: 75 Kg		
Especificación: 47000357 (T.Q)		

Ensayo	Especificación	Método	Resultado	Fecha
Descripción	Polvos fino blanco cristalino con olor característico	Organoléptico	Cumple	07-Sep-12
Identificación	IR similar al estándar	USP v	Cumple	11-Sep-12
Solubilidad	Ligeramente soluble en agua. Ligeramente soluble en metanol. Prácticamente insoluble e insoluble en cloroformo	USP v	Cumple	12-Sep-12
Cristalinidad	Cumple con los requisitos	USP v	Cumple	11-Sep-12
Densidad aparente	Mínimo 0,20g/mL	Métodos Generales USP Vigente	0,34g/mL	26-Sep-12
pH Solución 10mg/mL	3,5 - 0,0	USP v	4,57	26-Sep-12
Agua KF	12,0% - 15,0%	USP v	14,4%	14-Sep-12
Impurezas Relacionadas	D-Fenilglicina: Máximo 0,5%	USP v	0,0%	11-Sep-12
	Acido 6-aminopenicilánico: Máximo 0,5%	USP v	0,0%	
	Acido Ampiciloico: Máximo 1,0%	USP v	0,2%	
	Análogo Tiazepina de ampicilina: Máximo 0,3%	USP v	0,1%	
	Isomero 1: Máximo 0,4%	USP v	0,0%	
	Isomero 2: Máximo 0,3%	USP v	0,0%	
	Oligomero 2 de Ampicilina: Máximo 0,6%	USP v	0,0%	
	D-Fenilglicilampicilina: Máximo 0,6%	USP v	0,2%	
	Oligomero 1 de Ampicilina (dímero): Máximo 1,0%	USP v	0,2%	
	Oligomero 1 de ampicilina (trimero): Máximo 0,4%	USP v	0,3%	
Cualquier impureza individual no especificada: Máximo 0,25%	USP v	< 0,25%		
impurezas totales: Máximo 3,0%	USP v	1,05%		
Disolventes Residuales	Cumple con los requisitos	USP v	Cumple	11-Sep-12
Valoración (Ampicilina)	No menos de 900 µg y no más de 1050 µg de Ampicilina por mg. calculado en B.A.	USP v	853,4 µg / mg B.H. 867,1 µg / mg B.A.	12-Sep-12
Valoración (Ampicilina)	No menos de 900 µg y no más de 1050 µg de Ampicilina por mg. calculado en B.A.	FABRICANTE	852,0 µg / mg B.H. 887,0 µg / mg B.A.	15-Dic-11

Observaciones:
 Se anexa Informe de Granulometría
 *Se aprueba con dato de valoración del fabricante

Responsable: Sulay U. Analista de Calidad Fecha: 27 Septiembre 2012	Aprobado por: Q.F. Constanza Ruge Jefe de Calidad Fecha: 28-Sep-12
---	--

ANEXO 2: Procedimiento para el manejo de las cepas de *S. aureus* (ATCC: 43300, 29213 y 25923) y disposición de residuos generados.

ICESI	PROCEDIMIENTO	
	PROCEDIMIENTO PARA EL MANEJO Y LA DISPOSICIÓN DE CEPAS DE <i>S. AUREUS</i> (ATCC: 43300, 29213 y 25923).	PÁGINA: 1 de 8 FECHA DE EMISION: Mayo 29 del 2013.
		FECHA EMISIÓN: N/A

PREPARADO POR:	REVISADO POR:	APROBADO POR:
NOMBRE: Stephany Barajas Jordán y Alejandro Ortiz.	NOMBRE: Andrés Felipe Dávalos	NOMBRE:
FIRMA:	FIRMA:	FIRMA:
CARGO: Estudiantes en investigación.	CARGO: Asesor proyecto de investigación.	
FECHA: Mayo 29 del 2013.	FECHA: Mayo 29 del 2013.	FECHA:

1. OBJETIVO

- 1.1. Definir un procedimiento para la correcta manipulación de cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, 29213, 43300) en el laboratorio 406 L, incluyendo la disposición de los materiales y desechos derivados del trabajo realizado con el material biológico.

2. ALCANCE

- 2.1. Este procedimiento busca garantizar la seguridad de los estudiantes investigadores, profesores, directivos, tutores, personal de aseo y de

disposición de desechos; así como toda aquella persona que esté autorizada para ingresar y trabajar en el laboratorio 406 L de la Universidad Icesi.

3. RESPONSABILIDAD Y AUTORIDAD

- 3.1. El personal de operación y las personas autorizadas para ingresar a este laboratorio (406 L) deben tener previo conocimiento de este procedimiento y deben seguir las indicaciones aquí descritas.
- 3.2. El personal autorizado para ingresar a esta área debe verificar que este protocolo sea debidamente cumplido por los estudiantes investigadores y tutores.
- 3.3. El ingreso de personal al lugar de manipulación de las cepas (durante actividades asociadas al proyecto) debe ser controlado, y únicamente las personas autorizadas (tutores y estudiantes investigadores) podrán acceder a este espacio (CSB ref. 17370) 406 L).
- 3.4. Los estudiantes investigadores deben usar y portar adecuadamente los implementos de seguridad recomendados para el manejo de cepas bacterianas de nivel de riesgo II.
- 3.5. Todo el personal debe estar informado de la utilización de las cepas de *S. aureus* anteriormente descritas, especialmente en los momentos cuando éstas son manipuladas.

4. DEFINICIONES

Las cepas de *Staphylococcus aureus* a manipular en este espacio físico (406L), son definidas en la literatura como un patógeno de nivel de riesgo II, cuya descripción se encuentra a continuación:

- 4.1. **Grupo de riesgo nivel II (riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo):** Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado (Manual de seguridad de la ONU, 2006).

El manejo de las cepas bacterianas se puede dar en una instalación de seguridad o nivel de contención tipo II, que cuenta con las siguientes características:

- 4.2. **Nivel Bioseguridad II:** adecuado para el trabajo o manipulación de agentes que representan un peligro moderado para el personal y el medio ambiente.

Se diferencia de los laboratorios de Nivel de Bioseguridad I en:

- El personal de laboratorio tiene entrenamiento en el manejo de este tipo de agentes patógenos y es supervisado por personal competente.
- El acceso al laboratorio está restringido cuando se está realizando el trabajo.
- Todos los procedimientos en los que puedan crearse aerosoles o salpicaduras se llevan a cabo en una cabina de seguridad biológica u otro equipo de contención física.

A continuación se describen las consideraciones necesarias para un espacio físico destinado a la manipulación de microorganismos de nivel de riesgo II, se muestran algunas de las características del Laboratorio 406 L, entre las cuales se encuentra la disposición de una cabina de seguridad biológica, y técnicas microbiológicas adecuadas (TMA):

4.3 Relación de los grupos microbiológicos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas de laboratorio y los equipos:

Cuadro 2. Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE BIOSEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades
4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas (Véase la parte IV del presente manual). CSB: cámara de seguridad biológica.

4.4. Personal y vestuario: para asegurar la protección del personal, éste debe utilizar los implementos de seguridad recomendados, como lo son: gorros y tapabocas desechables. Las prendas después de ser usadas deben ser

lavadas y desinfectadas.

4.5. Manipulación de desechos: Se considera desecho todo aquello que debe descartarse. En los laboratorios, la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones estrechamente relacionadas. En el trabajo cotidiano, son pocos los materiales contaminados que se deben retirar del laboratorio o destruir. La mayor parte de la cristalería, los instrumentos y la ropa del laboratorio vuelve a utilizarse o se recicla. El principio básico es que todo el material infeccioso ha de ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio.

5. MATERIALES

5.1. IMPLEMENTOS DE SEGURIDAD RECOMENDADOS:

Bata de laboratorio (preferiblemente anti-fluidos) y de manga larga.

Guantes de látex o nitrilo.

Gorro.

Tapabocas (material desechable).

Gafas de seguridad.

Zapatos cerrados (Que no exista exposición de la piel).

Pantalones largos (Que no exista exposición de la piel).

5.2. EQUIPOS

Cabina de seguridad biológica.

Mesones de laboratorio.

Autoclave.

Mecheros para la esterilización continua de los instrumentos.

Caneca roja para el desecho del material biológico (exclusiva).

Etiqueta en la caneca roja que de información sobre la identidad de las cepas.

5.3. DESINFECTANTES

Etanol al 70%

Hipoclorito de sodio al 0,5%

6. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

6.1. CONSIDERACIONES GENERALES: IMPLEMENTOS DE SEGURIDAD RECOMENDADOS

6.1.1. Se usará en todo momento la bata para el trabajo en el laboratorio.

- 6.1.2. Se usarán guantes protectores para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con las cepas de *Staphylococcus aureus*. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
- 6.1.3. El personal deberá lavarse las manos después de manipular todo el material contaminado, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
- 6.1.4. Estará prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo, cafeterías, oficinas, biblioteca, salas para el personal y baños.
- 6.1.5. En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
- 6.1.6. Estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
- 6.1.7. La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios que la ropa de calle.

6.2. HIGIENE Y SANITIZACIÓN

- 6.2.1. Se realizará la sanitización del personal antes y después del trabajo de laboratorio.
- 6.2.2. Al comenzar las labores, verificar la existencia de desinfectantes y antisépticos, tales como el hipoclorito de sodio al 0.5% y etanol al 70%.
- 6.2.3. Antes de comenzar a trabajar se debe realizar la higiene completa del personal. Para la limpieza, se realizará el lavado de antebrazos y manos con agua y jabón líquido. Se formará espuma abundante con el jabón y se frotarán bien las manos, durante un mínimo de 10 segundos, se aclararán en agua limpia y se secarán con una toalla de papel.
- 6.2.4. Se sanitizarán las manos, es decir, se aplicará etanol al 70% sobre toda la superficie de las manos y se dejará secar.
- 6.2.5. Para la higiene en la Cámara de Seguridad Biológica (CSB) tipo II, se sanitizará toda la superficie dentro de la cámara con toalla absorbente y etanol al 70%.
- 6.2.6. La sanitización de la cámara se debe realizar en una sola dirección, tratando de no repasar la toalla dos veces por el mismo lugar.
- 6.2.7. Al ingresar las manos del personal a la cámara se debe aplicar etanol al 70%, para evitar la contaminación cruzada.
- 6.2.8. Cuando se manipulen las cepas directamente o elementos potencialmente infectados dentro de la cámara, se sanitizarán las manos siempre, cuando se retiren.
- 6.2.9. Toda la superficie del material que ingrese a la cámara deberá ser sanitizado antes y después.

6.3. CONSIDERACIONES GENERALES: CAMARA DE SEGURIDAD BIOLÓGICA TIPO II

- 6.3.1. La cámara de bioseguridad no debe utilizarse si no funciona correctamente.
- 6.3.2. La ventana de vidrio transparente no debe abrirse mientras se está utilizando la cámara.
- 6.3.3. Los aparatos y materiales introducidos en la cámara deben reducirse al mínimo y no deben bloquear la circulación del aire en la cámara de distribución trasera.
- 6.3.4. Se utilizarán mecheros dentro de la cámara para incinerar a necesidad cada que se utilice una asa metálica.
- 6.3.5. Todo el trabajo debe hacerse en la zona media y posterior de la superficie de trabajo y ser visible a través de la ventana.
- 6.3.6. El paso de personas por detrás del trabajador debe reducirse al mínimo.
- 6.3.7. El trabajador no debe alterar el flujo de aire al sacar y volver a introducir repetidas veces los brazos, ni generar movimientos bruscos con ellos.
- 6.3.8. Las rejillas de aire no deben estar bloqueadas con papeles, pipetas u otros materiales, pues con ello se perturba el flujo de aire y puede provocarse la contaminación del material y la exposición del trabajador.
- 6.3.9. La superficie de la CSB deberá limpiarse con una toalla absorbente que contenga un desinfectante apropiado una vez terminado el trabajo y al final del día de acuerdo a los numerales del 6.2.7 al 6.2.10.
- 6.3.10. El ventilador de la cámara se encenderá al menos 5 minutos antes de empezar el trabajo y debe seguir funcionando al menos durante 5 minutos después de concluido el trabajo.
- 6.3.11. Nunca se introducirán papeles en las CSB.

6.4. PROTOCOLO PARA EL TRABAJO EN EL LABORATORIO 406 L

- 6.4.1. Al iniciar las labores dentro del laboratorio se deben tener en cuenta las consideraciones generales del numeral 6.1 y el procedimiento descrito de higiene y sanitización descrito en el apartado 6.2.
- 6.4.2. Tanto para trabajar directamente con las cepas como para el material que pueda ser potencialmente contaminado por ellas, se debe realizar todo bajo Cámara de Seguridad Biológica Tipo II.
- 6.4.3. Para el trabajo dentro de la cámara se deben tener en cuenta las consideraciones generales del trabajo en CSB del numeral 6.3.
- 6.4.4. Las cepas de *Staphylococcus aureus* se encuentran en crio-conservación (viales Eppendorf) en el refrigerador del primer piso a -80°C, panel 01, por lo tanto siempre que se vayan a utilizar, se deben

retirar de manera cuidadosa, introducirlas en tubos Fálcon de 15 o 50 ml, cerrados con hielo en su interior, y transportarlas hasta el laboratorio en nevera de icopor evitando movimientos bruscos que posibiliten las caídas, rompimientos, golpes y derrame del contenido de los viales con el microorganismo.

- 6.4.5. Al momento de llegar al laboratorio se deben ingresar rápidamente los tubos fálcon a la CSB, para evitar posibles contaminaciones.
- 6.4.6. Los tubos fálcon se abren dentro de la CSB, donde se extrae cada cepa (tubo Eppendorf), estos se abrirán sólo cuando sea necesario. A partir de ese momento no se deben retirar materiales de la CSB, ya que existe una exposición directa con el agente bacteriano.
- 6.4.7. La puerta de ingreso a la CSB (ref.17370) del laboratorio permanecerá cerrada durante el desarrollo de los procedimientos y como mínimo cinco minutos después de haber terminado los mismos.
- 6.4.8. Se dispondrá de todos los insumos necesarios para cada procedimiento desde el inicio en la CSB, para minimizar los recorridos que puedan generar diseminación del agente biológico.

6.5. PROTOCOLO PARA EL MANEJO DE DESECHOS

- 6.5.1. Todo insumo utilizado dentro de la CSB y que haga parte de cada procedimiento de trabajo se manejará como residuo biológico potencialmente peligroso.
- 6.5.2. Se dispondrá de una bolsa roja para el desecho de los materiales utilizados durante los procedimientos, la cual se rotulará con la etiqueta.



PELIGRO BIOLÓGICO
Manipulación solo por personal autorizado
Nivel de bioseguridad: _____
Investigador encargado: _____
En caso de emergencia comuníquese con, _____ al celular, _____
Fecha de Generación de residuos: __/__/__.
Residuos generados por: _____

- 6.5.3. El material de vidrio utilizado, así como las puntas de micropipeta que hayan o no tenido contacto directo con el agente, deben tener un

tratamiento especial antes de ser reutilizados. Estos desechos deben ser esterilizados en autoclave y posteriormente lavados (si se desean reciclar).

- 6.5.4. El material desechable tales como cajas de Petri, guantes, filtros de membrana etc., se deben inactivar en autoclave o incinerar. No reutilizar.
- 6.5.5. El material que se utilizó para la manipulación de las cepas será rotulado con la siguiente nomenclatura: Iniciales del microorganismo (SA) seguido de la palabra ATCC y su correspondiente número (43300, 29213 y 25923), la fecha de su utilización y las iniciales de las personas encargadas (AOQ, Alejandro Ortiz Quintero, SBJ, Stephany Barajas Jordán). Todo separado por un guión a media altura. Por ejemplo, SA ATCC 43300 – 29/05/2013 – AOQ.

6.6. **PARA EL INGRESO AL LABORATORIO 406L LAS PERSONAS DEBERÁN:**

- 6.6.1. Utilizar los implementos de seguridad recomendados (apartado 6.1.)
- 6.6.2. Quitarse todo tipo de accesorios: reloj, pulseras, anillos, aretes.
- 6.6.3. Colocarse las prendas de seguridad destinadas para el personal.
- 6.6.4. En caso de tener el cabello largo recogerlo o usar gorro.
- 6.6.5. No utilizar maquillaje.
- 6.6.6. No ingresar al área alimentos, bebidas o medicamentos puesto que podría desencadenar una contaminación cruzada con las cepas a trabajar de *S. aureus*.
- 6.6.7. Retirar las prendas de seguridad al finalizar el trabajo en el laboratorio, guardar las mismas en un bolsa plástica hermética para evitar contaminar otros elementos. Realizar un proceso de lavado y desinfección de las prendas de laboratorio para evitar la diseminación del microorganismo, usando agentes desinfectantes (hipoclorito de sodio).

7. **REFERENCIAS**

- 7.1. Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. World Health Organization.
- 7.2. Chosewood, L. C., & Wilson, D. E. (2009). *Biosafety in microbiological and biomedical laboratories*. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health.

8. **ANEXOS: No Aplica.**

ANEXO 3: Hoja de seguridad de las cepas bacterianas liofilizadas.

0360K *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 25923™* KWIK-STIK



Biosafety Level: 2

6 self-contained units of a single organism

recommended for CAMP Test

Important note: This product is not intended for use with Cepheid® GeneXpert systems, please see catalog # 0360MSSA.

0365P *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 29213™* KWIK-STIK



Biosafety Level: 2

2 self-contained units of a single organism

0852P *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC® 43300™* KWIK-STIK



Biosafety Level: 2

2 self-contained units of a single organism

Methicillin resistant, mec A positive

Ficha de información de seguridad del material (Material Safety Data Sheet)



MSDS.244



Preparaciones de microorganismos liofilizados

Sección 1: Información general

Producto: preparaciones de microorganismos liofilizados
Fabricante: Microbiologics, Inc.
Teléfono: 320-253-1640
Dirección: 200 Cooper Avenue North
St. Cloud, Minnesota 56303

Sección 2: Composición

Cada pélet cilíndrico liofilizado contiene una población pura o mixta de microorganismos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los microorganismos como pertenecientes al Grupo de riesgo 1 o 2. Estos microorganismos pueden causar infecciones en seres humanos, pueden suponer un peligro para el personal de laboratorio. No obstante, su propagación a la comunidad es poco probable. La exposición a estos microorganismos en el laboratorio rara vez produce infecciones. La prevención efectiva y el tratamiento son de fácil acceso.

Sección 3: Información sobre los riesgos

Fisioquímicos: no aplicable
Sanitarios: riesgo de infección
Medioambientales: no aplicable

Sección 4: Medidas de primeros auxilios

Oculares: evitar el contacto con los ojos. Si se produce el contacto con los ojos, lavar con abundante agua y buscar atención médica inmediatamente.
Cutáneos: no irritante. Si se produce el contacto con la piel, lavar con una solución biocida apropiada.
Inhalatorios: evitar la producción de pulverizaciones. Si se produce la inhalación, trasladarse a una zona de aire fresco y solicitar asesoramiento médico.
Ingestión: evitar el contacto mano-boca. En caso de ingestión, solicite asesoramiento médico.

Sección 5: Medidas contra incendios

No aplicable

Sección 6: Medidas en caso de emisiones accidentales

En caso de vertido accidental, contener el material derramado y comunicarlo de manera inmediata al personal que se encuentre cerca del incidente. Descontaminar el vertido empapando el material vertido con un desinfectante adecuado. Dejar pasar el tiempo suficiente para la actividad biocida del desinfectante según las instrucciones de uso del fabricante. Limpiar la zona y el material con toallas o pañuelos de papel desechables. Las toallas y pañuelos que contienen microorganismos se deben tratar como material de riesgo biológico.

Sección 7: Manipulación y almacenamiento

La preparación de microorganismos liofilizados debe almacenarse a 2-8 °C en el envase sellado original. Estos dispositivos contienen microorganismos viables que, en determinadas circunstancias, provocan

MSDS.244.SPAN Revisión B
Fecha de publicación: 18 MAY 2012

Página 1 de 3

Ficha de información de seguridad del material (Material Safety Data Sheet)



MSDS.244

enfermedades. Se deben emplear técnicas apropiadas para evitar la exposición y el contacto con cualquier cultivo de microorganismos. El laboratorio de microbiología debe estar equipado y contar con instalaciones para recibir, procesar, mantener, almacenar y eliminar materiales de riesgo biológico. El personal del laboratorio de microbiología que utilice estos dispositivos debe estar capacitado, tener experiencia y demostrar competencia para procesar, mantener, almacenar y eliminar material de riesgo biológico.

Sección 8: Controles de exposición. Protección personal

Se deben cumplir y seguir las buenas prácticas de laboratorio en todo momento. El uso de cabinas de seguridad biológica, la prevención de pulverizaciones y el uso de guantes, delantales impermeables y otra ropa protectora lo deben dictaminar los procedimientos operativos estándares de cada laboratorio.

Sección 9: Propiedades físicas y químicas

Material inerte, inodoro y seco.

Sección 10: Estabilidad y reactividad

Si se almacenan según las especificaciones, las preparaciones de microorganismos liofilizados son estables hasta el último día del mes que figura en la fecha de caducidad. El periodo de almacenamiento no afecta al riesgo de infecciones.

Sección 11: Información toxicológica

No aplicable

Sección 12: Información ecológica

No aplicable

Sección 13: Eliminación del producto

El material liofilizado y el cultivo posterior de estos microorganismos en medios de cultivo se consideran materiales de riesgo biológico. Existen agencias y normativas que regulan la eliminación de todos los materiales de riesgo biológico. Todos los laboratorios deben conocer la eliminación apropiada de los materiales de riesgo biológico y cumplir con ella.

Sección 14: Información sobre transporte

Consulte las normativas nacionales e internacionales con respecto a los sistemas de transporte de materiales de riesgo biológico. **Clasificación de la ONU:** UN3373 sustancia biológica, categoría B y UN2814, sustancias infecciosas que afectan a seres humanos para múltiples números de catalogación microbiológica.

Sección 15: Información normativa

No figura en la lista.

Sección 16: Otras informaciones

Según nuestro leal saber y entender, la información que aquí se recoge es precisa. Microbiologics Inc. no se responsabiliza de la exactitud ni de la integridad de la información aquí recogida.



PELIGRO BIOLÓGICO

**ACCESO RESTRINGIDO. SOLO PERSONAL
AUTORIZADO.**

Proyecto de investigación con agente biológico

Nivel de riesgo: _____.

Investigador Encargado: _____

En caso de emergencia llame a: _____ al
celular _____.

Etapas del proceso: _____.

Fecha: __/__/____

ANEXO 4: Preparación de insumos necesarios para las pruebas de laboratorio:

Anexo 4.1: preparación de agar nutritivo marca Merck® (solubilidad de 20g/L): De acuerdo a las instrucciones del proveedor se pesaron 4,0 g del agar en polvo en una balanza analítica y se disolvieron en 200 mL de agua des-ionizada (la mezcla se preparó en un frasco Shott de capacidad de 500 mL). Se utilizó calentamiento y agitación constante, usando una plancha de calentamiento y un magneto, hasta ebullición. El agar preparado se esterilizó por autoclave a 121°C/ 15 min, una vez esterilizado se vertió el agar líquido (45-50°C) en cajas Petri estériles, se dejaron enfriar y se conservaron a 4°C.

Nota: Este procedimiento se realizó en el cuarto de medios de cultivo del primer piso del edificio L de la Universidad Icesi, utilizando el autoclave para el ciclo de esterilización y la cabina de flujo laminar para servir el agar nutritivo en las placas. Los medios de cultivo fueron utilizados en un intervalo de 2 semanas desde el momento de su preparación, para garantizar la calidad de las mismas éstas eran elaboradas cada que se requerían.

Anexo 4.2: preparación del caldo nutritivo marca Merck® (solubilidad de 20g/L): según las indicaciones del proveedor se pesaron 4,0 g del caldo nutritivo en polvo en una balanza analítica y se disolvieron en 200 mL de agua des-ionizada (la mezcla se preparó en un frasco Shott de capacidad de 500 mL). Se utilizó calentamiento y agitación constante, usando una plancha de calentamiento y un magneto, hasta ebullición. El caldo nutritivo preparado se esterilizó por autoclave a 121°C/ 15 min, una vez esterilizado se dejó enfriar y se conservó en la nevera de medios a 4°C.

Anexo 4.3: preparación del caldo Mueller Hinton marca Scharlau® (solubilidad 21g/L) y ajuste de cationes (entre 20-25mg/mL de Ca²⁺ y de 10-12,5 mg/mL de Mg²⁺): Se realizó la preparación de las soluciones madre para el ajuste de cationes, Ca²⁺ y Mg²⁺. Para la solución de cloruro de magnesio se pesaron 8,36 g de MgCl₂.6H₂O en su estado sólido en una balanza analítica marca Radwag AS 220, y se llevaron a un balón aforado de 100 mL donde se disolvieron con 100 mL de agua des-ionizada. Para facilitar el proceso de mezcla, la solución anterior se llevó al ultrasonido a 40°C /15 min. Para la solución de cloruro de calcio se pesaron 3,68 g de CaCl₂.2H₂O en estado sólido, los cuales se transvasaron a un balón aforado de 100 mL, disolviendo y completando a volumen con agua des-ionizada (tipo 2); de igual forma la solución de cloruro de calcio se llevó al ultrasonido por 15 minutos. Posteriormente, se esterilizaron las soluciones utilizando una jeringa estéril y un filtro de membrana de tamaño de poro de 0,22 micras, con el objetivo de eliminar cualquier agente contaminante o interferente. Las soluciones esterilizadas, se conservaron en tubos fálcon de 50 mL en la nevera a -20°C.

Posteriormente, se llevó a cabo la preparación de 200 mL del caldo Mueller Hinton, para lo cual se pesaron 4,2 g del caldo en polvo deshidratado en una balanza analítica y se disolvieron en 200 mL de agua des-ionizada (tipo 2) en un frasco Shott de 500 mL; para facilitar el proceso de mezcla se utilizó una agitación magnética constante (aproximadamente por 30 min). Luego, se esterilizó el caldo Mueller Hinton por autoclave a 121°C/15 min, una vez listo se dejó enfriar y se conservó a 4°C en la nevera de medios de cultivo.

Finalmente, se realizó el ajuste de cationes al caldo MH previamente preparado, para lo cual se retiraron de la nevera las soluciones madre de los cationes, Ca²⁺ y Mg²⁺, y la del caldo MH, éstas se dejaron a temperatura ambiente mientras adoptaban la misma temperatura y se llevaron a la cabina de seguridad biológica (CSB) del Laboratorio 406L. Para lo cual, se tomaron 240 µL de la solución de cloruro de magnesio y 420 µL de la solución de cloruro de calcio, y se agregaron al caldo MH utilizando micropipetas y puntas estériles. Para garantizar la homogeneidad de los componentes de mezcla, se agitó la misma en el vortex; al final se rotuló el caldo Mueller Hinton con ajuste de cationes como CMHCA y se conservó a 4°C en la nevera de medios de cultivo, hasta su utilización.

Anexo 4.4: crio-conservación de cepas bacterianas de *S. aureus* ATCC 25923, 29213 y 4330: Se tomaron las cepas obtenidas por el proveedor Microbiologics Inc®, las cuales se encontraban en un vial plástico con su respectivo hisopo estéril. Seguidamente, se tomó uno inóculo de cada una de ellas y se sembró en placas Petri que contenían agar nutritivo utilizando un asa bacteriológica. El cultivo realizado para cada una de las cepas se llevó a la incubadora a 37°C/ 18 horas. Posteriormente, se cogieron los cultivos frescos de cada una de las cepas de *S.aureus* y se sembró cantidad suficiente de colonias de cada una de las cepas en 40 mL de caldo nutritivo (hasta observar turbidez) usando un asa bacteriológica; esto se llevó a la incubadora a 37°C por 24 horas.

Después, se agregaron 10 mL de glicerol a cada cultivo líquido y se homogenizó usando el vortex por 2 minutos. Posteriormente, se vertió la mezcla en tubos eppendorff con tapa-rosca (de a 1 mL) usando micropipeta. Finalmente, se rotularon y organizaron los tubos en cajas de crio-conservación que fueron etiquetadas y conservadas a -80°C en la nevera del cuarto frío del primer piso del edificio L.

Nota: Este procedimiento fue llevado a cabo en el Laboratorio 406L de la Universidad Icesi, haciendo uso de la cabina de bioseguridad ubicada en dicha instalación.

Anexo 4.5: preparación de las soluciones antibiótico, polímero y del complejo fármaco-polímero para las pruebas de micro-dilución en caldo:

Anexo 4.5.1: preparación solución de ampicilina de 2048 µg/mL: Para la elaboración de esta solución antibiótica, se pesaron 0,2054 g de ampicilina trihidrato en estado sólido en una balanza analítica marca Radwag AS 220 y se llevaron a un balón aforado de 100 mL, en donde se disolvió el estándar de ampicilina con 100 mL de agua des-ionizada (agua tipo 2). Posteriormente, se llevó la solución al ultrasonido durante 15 minutos a 25°C para facilitar el proceso de solubilización; sin embargo, el fármaco presenta una solubilidad en agua de 1g /90 mL de agua a 25°C, lo que facilitó el proceso de solubilización. Después, se realizó la esterilización de la solución antibiótica usando una jeringa estéril y filtros de membrana de tamaño de poro de 0,22 micras, con el objetivo de eliminar cualquier agente contaminante o interferente. La solución esterilizada se rotuló como solución madre de ampicilina de 2048 µg/mL.

Finalmente, se tomó la solución madre y a partir de ella se prepararon diluciones seriadas de la solución antibiótica a concentraciones de 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 64 µg/mL, 16 µg/mL, 4 µg/mL, 1 µg/mL, 0,7 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,125 µg/mL en tubos Fálcon de 15 mL agregando con la micropipeta siempre un volumen determinado de la solución antibiótica y de agua estéril, y mezclando en vortex por 2 minutos. Los tubos fálcon conteniendo las soluciones seriadas fueron rotulados y conservados a -20° C.

Anexo 4.5.2: preparación de la solución polimérica de PAM-18 Na de 1024 µg/mL: Para la elaboración de la solución polimérica, se pesaron 0,1024 g del poli(ácido-maleico-alt-octadeceno) en su forma salina, sódica en estado sólido y previamente liofilizada en una balanza analítica marca Radwag AS 220 y se llevaron a un balón aforado de 100 mL, en donde se dispersó el polímero anfifílico en 100 mL de agua des-ionizada (agua tipo 2). Posteriormente, se llevó la mezcla anterior al ultrasonido durante 35 minutos a 70°C para facilitar el proceso de solubilización. Una vez que se obtuvo una solución traslúcida, ésta se llevó al autoclave a un ciclo de esterilización de 121°C por 15 minutos. La solución esterilizada se rotuló como solución madre de PAM-18 Na de 1024 µg/mL.

Finalmente, se tomó la solución madre y a partir de ella se prepararon diluciones seriadas de la solución polimérica a concentraciones de 512 µg/mL, 384 µg/mL, 256 µg/mL, 64 µg/mL, 16 µg/mL, 4 µg/mL, 1 µg/mL, 0,7 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,125 µg/mL en tubos Fálcon de 15 mL agregando con la micropipeta siempre un volumen determinado de la solución polimérica y de agua estéril, y mezclando en vortex por 2 minutos. Los tubos fálcon conteniendo las soluciones seriadas fueron rotulados y conservados a -20° C.

Nota: Para preparar las diluciones seriadas de solución polimérica de PAM-18 Na, se utilizaron 50 mL de la solución madre preparada previamente de 1024 µg/mL, los 50 mL restantes se utilizaron para la preparación de la solución ampicilina: PAM-18 Na 1:1, cuya preparación se describe posteriormente.

Anexo 4.5.3: preparación de los sistemas de mezcla ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1 de 1024 µg/mL:

Primero, se realizó la elaboración de la solución antibiótica, para lo cual se pesaron 0,1027 g de ampicilina trihidrato en una balanza analítica marca Radwag AS 220 y se llevaron a un balón aforado de 100 mL, en donde se disolvió el estándar de ampicilina con 100 mL de agua des-ionizada (agua tipo 2). Posteriormente, se llevó la solución a agitación por ultrasonido durante 15 minutos a 25°C para facilitar el proceso de solubilización. Después, se realizó la esterilización de la solución antibiótica usando una jeringa estéril y filtros de membrana de tamaño de poro de 0,22 micras, con el objetivo de eliminar cualquier agente contaminante o interferente. La solución esterilizada se rotuló como solución madre de ampicilina de 1024 µg/mL.

Antes de proceder con la preparación de los sistemas de mezcla ampicilina: PAM-18 Na, y debido a los antecedentes de inestabilidad química que se reportan para fármacos de tipo beta-lactámico en medios acuosos, se procedió a evaluar la estabilidad de la ampicilina a las condiciones de estudio, para lo cual se determinó la integridad del espectro ultravioleta de dicho fármaco durante el día 1, 2 y 3 desde el momento en el cual fue preparada la solución madre de ampicilina de 1024 µg/mL. De este modo, se encontró que no hay cambios en el espectro a dichos intervalos de tiempo, indicando que a las condiciones de trabajo implementadas ésta es estable químicamente (Ver anexo 5). También, se determinó el pH de la solución madre de ampicilina de 1024 µg/mL y se encontró que el fármaco obtuvo valores de pH que mueven dentro del intervalo de estabilidad (observar anexo 5).

Posteriormente, se tomó un frasco Shott de 250 mL y se agregaron en el mismo 50 mL de la solución de ampicilina preparada previamente de 1024 µg/mL, y 50 mL de la solución polimérica de PAM-18 Na de 1024 µg/mL utilizando probetas volumétricas. Luego, dicha mezcla se llevó al vortex por 5 minutos para garantizar la interacción entre los componentes, y se obtuvo la solución ampicilina: PAM-18 Na 1:1 de 1024 µg/mL.

Finalmente, se tomó la solución madre de ampicilina: PAM-18 Na 1:1 de 1024 µg/mL y a partir de ella se prepararon diluciones seriadas a concentraciones de 512 µg/mL, 384 µg/mL, 256 µg/mL, 64 µg/mL, 16 µg/mL, 4 µg/mL, 1 µg/mL, 0,7 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL y 0,125 µg/mL en tubos fálcon de 15 mL agregando con la micropipeta siempre un volumen determinado de la solución antibiótico-

polímero y de agua estéril, y mezclando en vortex por 2 minutos. Los tubos Fálcon conteniendo las soluciones seriadas fueron rotulados y conservados a -20° C.

Anexo 4.6: Procedimiento detallado de la prueba de difusión en disco límite de zona.

Esta prueba se llevó a cabo tomando cultivos frescos de cada una de las cepas de *S. aureus* (ATCC 25923, 29213 y 43300), de los cuales se tomaron cierta cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) y se llevaron a tubos fálcon de 50 mL que contenían una solución salina estéril de NaCl al 0,85%; preparando una suspensión de inóculo de Mc Farland que fue medida en el espectrofotómetro UV a 625 nm, y cuya absorbancia debía ser de 0,086 a 0,090. Luego, de obtener una lectura de cada suspensión bacteriana en dicho intervalo, se tomó con un hisopo de algodón estéril un inóculo de cada cepa (*S. aureus* ATCC 25923, 29213 y 43300), respectivamente y se sembró en las placas de agar Mueller- Hinton. Posteriormente, se dejaron secar por cerca de 5 minutos y haciendo uso de pinzas metálicas estériles se dispensaron de a dos discos de ampicilina de 10 µg en cada placa de agar MH, asegurando que los mismos quedaran en contacto directo con el medio de cultivo (Cavaliere, 2005). Luego, se rotuló cada placa con el nombre respectivo de la cepa y se llevó a la incubadora a 37°C por 18 horas. Una vez cumplido dicho intervalo se retiraron las placas de la incubadora y se midieron las zonas de inhibición obtenidas usando un calibrador.

ANEXO 5: Estudio de la estabilidad de la ampicilina trihidratada bajo las condiciones de experimentación:

Anexo 5.1: metodología implementada

Se evaluó la estabilidad de la solución de ampicilina trihidratada ante las condiciones experimentales, por medio de mediciones del pH de las soluciones y de su respectiva lectura en el espectrofotómetro en el día 1, 2 y 3. Para esto, se tomó una muestra de la solución de ampicilina trihidratada de 1024 µg/mL (recién preparada) y se leyó su absorbancia en el UV utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800, tomando como blanco el agua purificada y des-ionizada usada para la preparación de la misma. Posteriormente, se tomó el pH característico de la solución el mismo día de su preparación (día 1) y luego se determinó el pH de la solución polimérica de concentración de 1024 µg/mL (día 1). Finalmente, se tomaron ambas soluciones y se almacenaron en la nevera a 3°C.

En el día 2, se retiraron las soluciones de antibiótico y de polímero de la nevera, y se dejó que ambas alcanzaran la temperatura ambiente. Después, se midió el pH de ambas soluciones, y se preparó la solución antibiótico más polímero a la cual también se le realizó dicha medición. Finalmente, en el día 2 se realizó la lectura de la solución de ampicilina trihidratada en el espectrofotómetro haciendo un barrido de 400 nm a 200 nm, para garantizar la no degradación del fármaco bajo las condiciones de almacenamiento.

Por último, se realizó una lectura final de la solución antibiótica en el día 3 haciendo uso del espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 y se leyó el pH de la solución de ampicilina trihidratada para evaluar su estabilidad.

Anexo 5.2: resultados obtenidos

De acuerdo, a lo reportado en la bibliografía la solubilidad de la ampicilina en agua es de 1,0 g disuelto en cerca de 90 mL, y su pH de máxima estabilidad es de 5,8 (Kenneth. C, Gordon. A, Valentino. S, 1986). Sin embargo, un intervalo de pH óptimo de estabilidad de este antibiótico betalactámico en medio acuoso varía aproximadamente de 4,0 – 6,8. Al realizar las mediciones usando el pH-metro se obtuvieron valores de pH para la ampicilina en solución de 4,85; 4,76 y 4,72 en el día 1, 2 y 3 de experimentación, respectivamente. Indicando este parámetro que el fármaco en medio acuoso a una concentración de 1024 µg/mL, es estable, ya que toma valores que se ajustan al intervalo en el cual la estabilidad es óptima.

Por otra parte, la solución polimérica de 1024 µg/mL, presentó un pH en el día 1 de 9,30 y en el día 2 de 9,29 los cuales son característicos para este compuesto al

encontrarse el sistema polimérico en su forma salina sódica. También, se obtuvo en el día 2 un pH de 7,03 para el sistema de mezcla ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1 de 1024 µg/mL.

Por último, cabe decir que de las mediciones realizadas a través de espectrofotometría UV para la ampicilina, no se observó ningún patrón de inestabilidad química del fármaco que indicará algún tipo de degradación del compuesto bajo las condiciones de almacenamiento y de trabajo en el laboratorio, dicho comportamiento puede evidenciarse en los espectros obtenidos.

Overlay Spectrum Graph Report

27/11/2013 12:20:54 p.m.

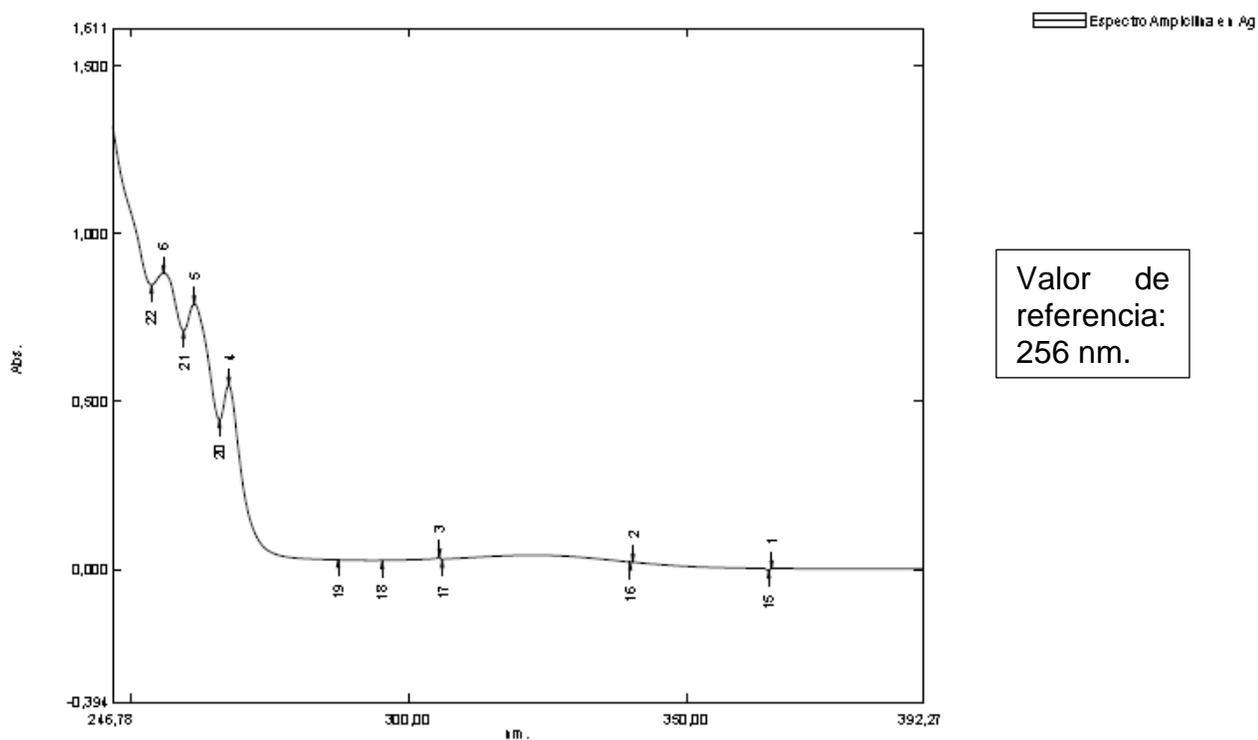


Figura 200: Espectro UV de la ampicilina. Día 1 del estudio de estabilidad.

Overlay Spectrum Graph Report

27/11/2013 12:22:07 p.m.

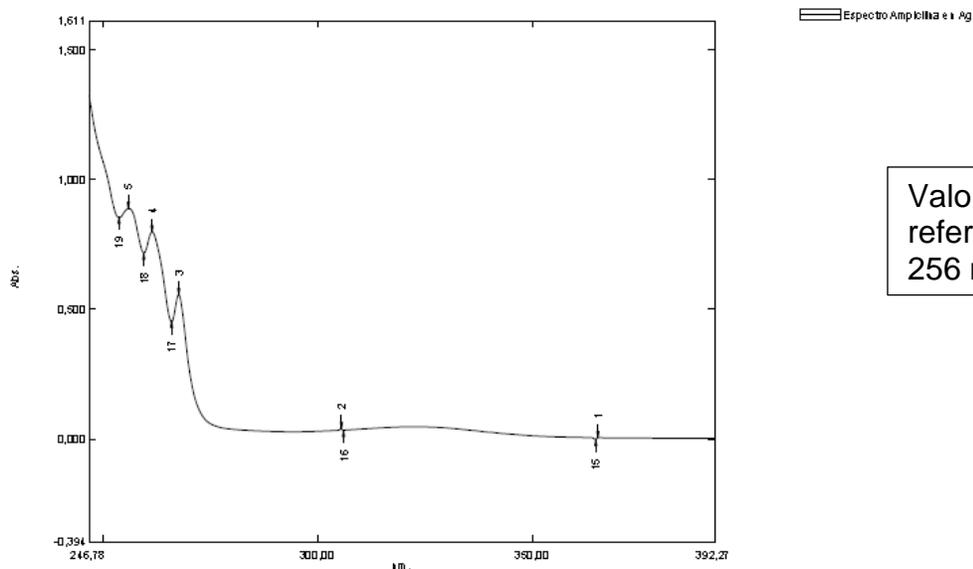


Figura 211: Espectro UV de la ampicilina. Día 2 del estudio de estabilidad.

Overlay Spectrum Graph Report

28/11/2013 11:52:07 a.m.

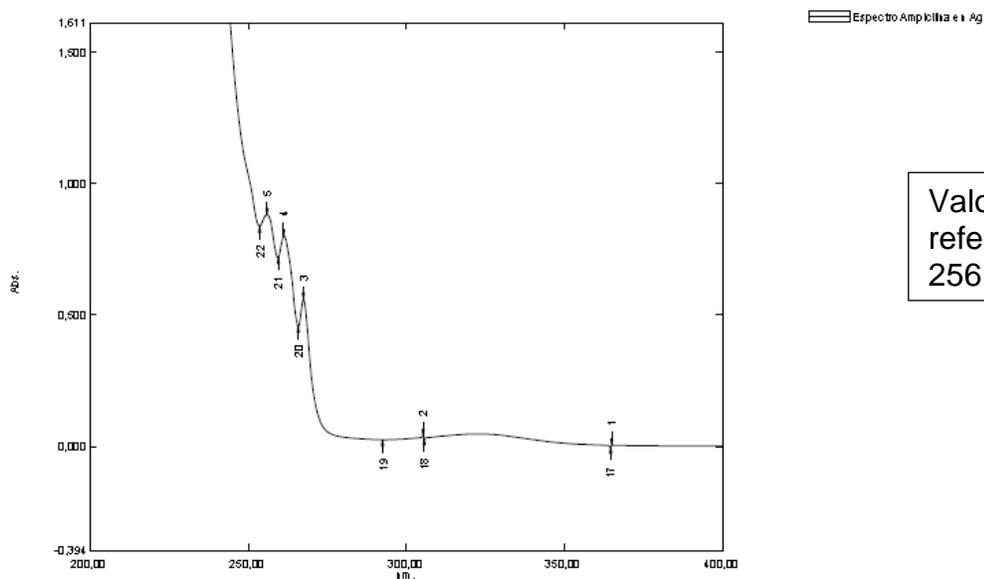


Figura 222: Espectro UV de la ampicilina. Día 3 del estudio de estabilidad.

Overlay Spectrum Graph Report

28/11/2013 11:52:56 a.m.

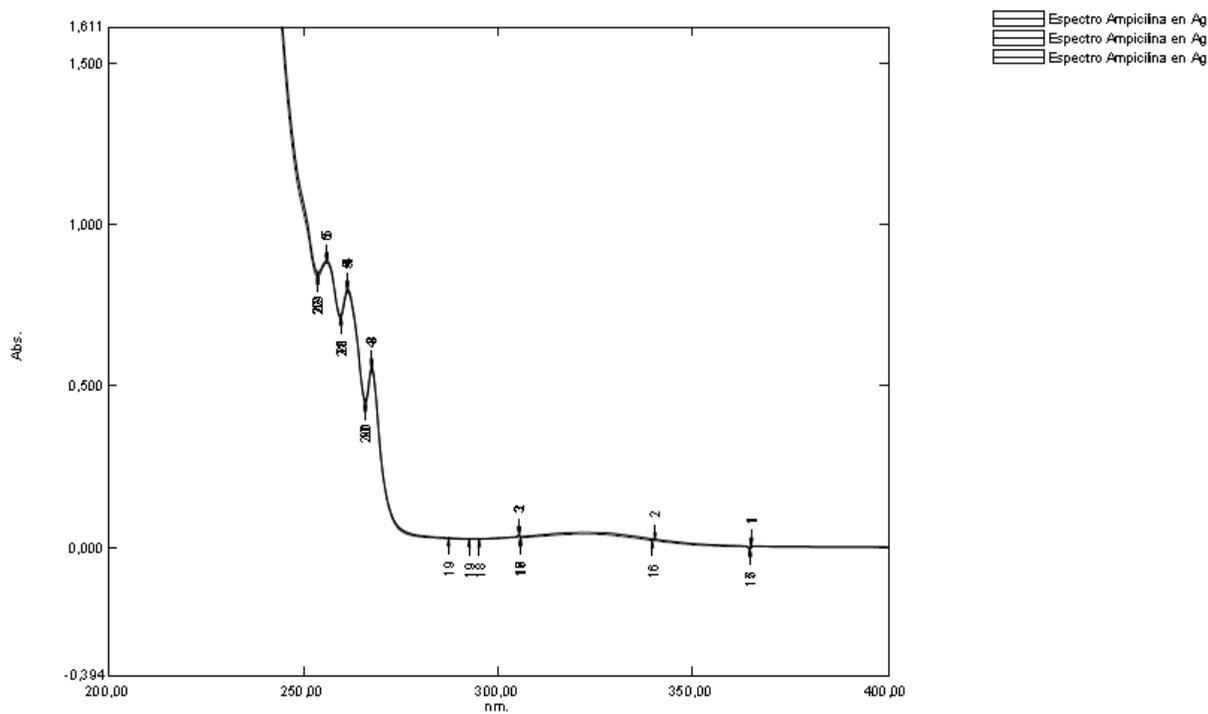


Figura 233: Espectro UV de la ampicilina. Día 1, 2 y 3 del estudio de estabilidad.

ANEXO 6: Resultados obtenidos para cada ensayo de la prueba de micro-dilución en caldo:

Anexo 6.1 Resultados ensayo antibiótico + bacteria

Tabla 6: Resultados para la prueba de micro-dilución en caldo para las cepas de *S. aureus* evaluadas en presencia de ampicilina. El valor de cero (0) indica que la réplica o tratamiento realizado presentó inhibición del crecimiento, y los valores numéricos registrados indican la cantidad de réplicas (de las 24 realizadas) que tuvieron un crecimiento observable.

Concentración ampicilina trihidratada (µg/mL)	0,0625	0,125	0,25	0,35	0,5	2	8	32	128	256	512	Control (+) Sólo Inoculo
Cepa ATCC 25923: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	3	0	0	0	0	0	0	0	0	24
Cepa ATCC 29213: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	24	2	0	0	0	0	24
Cepa ATCC 43300: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	24	24	0	0	0	0	24

Anexo 6.2: Resultados ensayo polímero anfifílico + bacteria:

Tabla 7: Resultados para la prueba de micro-dilución en caldo para las cepas de *S. aureus* evaluadas en presencia del PAM-18 Na. Los valores numéricos registrados indican la cantidad de réplicas (de las 24 realizadas) que tuvieron un crecimiento observable en la placa.

Concentración PAM 18 Na (µg/mL)	0,0625	0,125	0,25	0,35	0,5	2	8	32	128	192	256	Control (+) Sólo Inoculo
Cepa ATCC 25923: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Cepa ATCC 29213: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
Cepa ATCC 43300: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24

Anexo 6.3: Resultados ensayo antibiótico + polímero + bacteria:

Tabla 8: Resultados obtenidos de la prueba de micro-dilución en caldo para las cepas de *S. aureus* evaluadas en presencia de la matriz de asociación ampicilina: PAM-18 Na en proporción 1:1. Donde, El valor de cero (0) indica que la réplica o tratamiento realizado presentó inhibición del crecimiento a dicha concentración, y los valores numéricos registrados indican la cantidad de réplicas (de las 24 realizadas) que tuvieron un crecimiento observable en la placa.

Concentración ampicilina: PAM 18 Na ($\mu\text{g/mL}$) en proporción 1:1	0,0625	0,125	0,25	0,35	0,5	2	8	32	128	192	256	Control (+)sólo Inoculo
Cepa ATCC 25923: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24
Cepa ATCC 29213: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	0	0	0	0	0	0	24
Cepa ATCC 43300: Número de réplicas que presentaron crecimiento:	24	24	24	24	24	24	0	0	0	0	0	24

Anexo 7. Análisis estadísticos de los datos. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier.

Cepa ATCC 29213

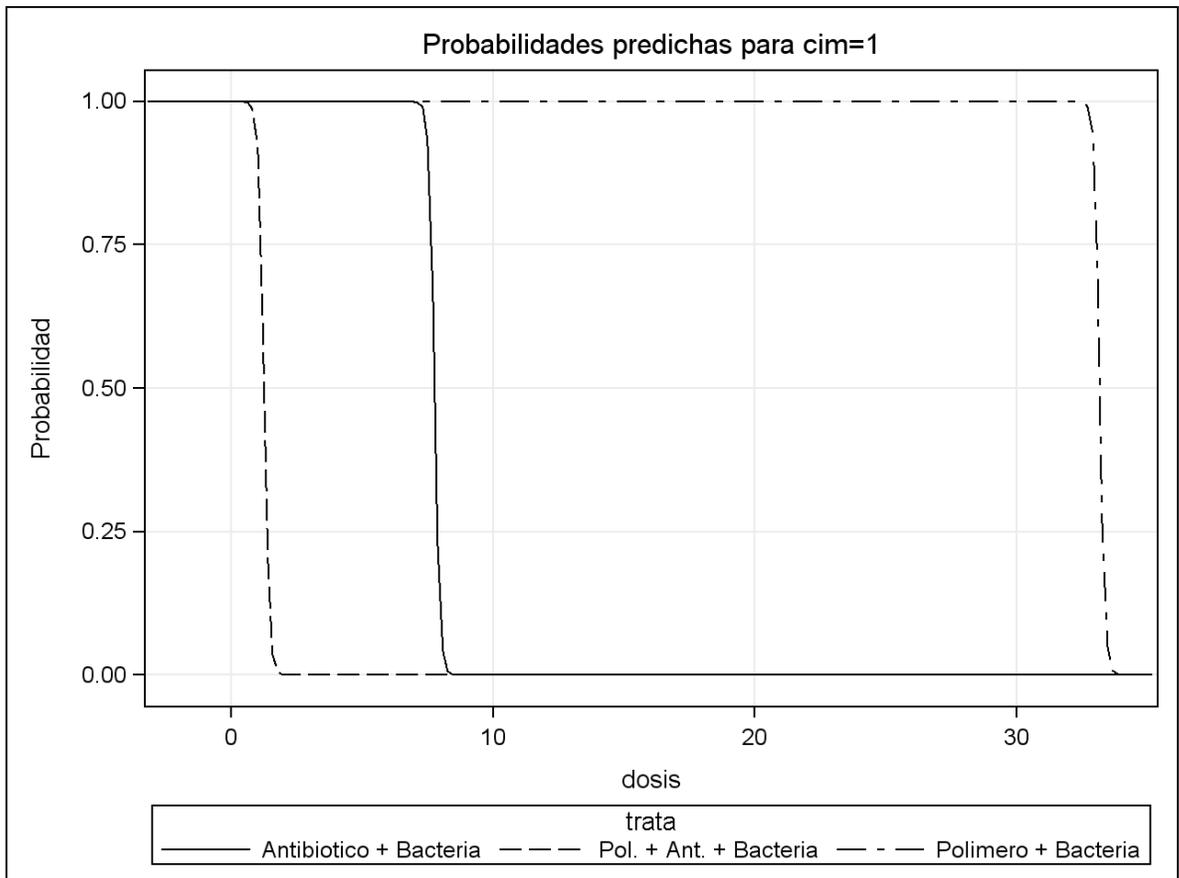


Figura 24: Método de Kaplan-Meier para los diferentes ensayos realizados en la prueba de micro-dilución en caldo sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.

Cepa ATCC 43300

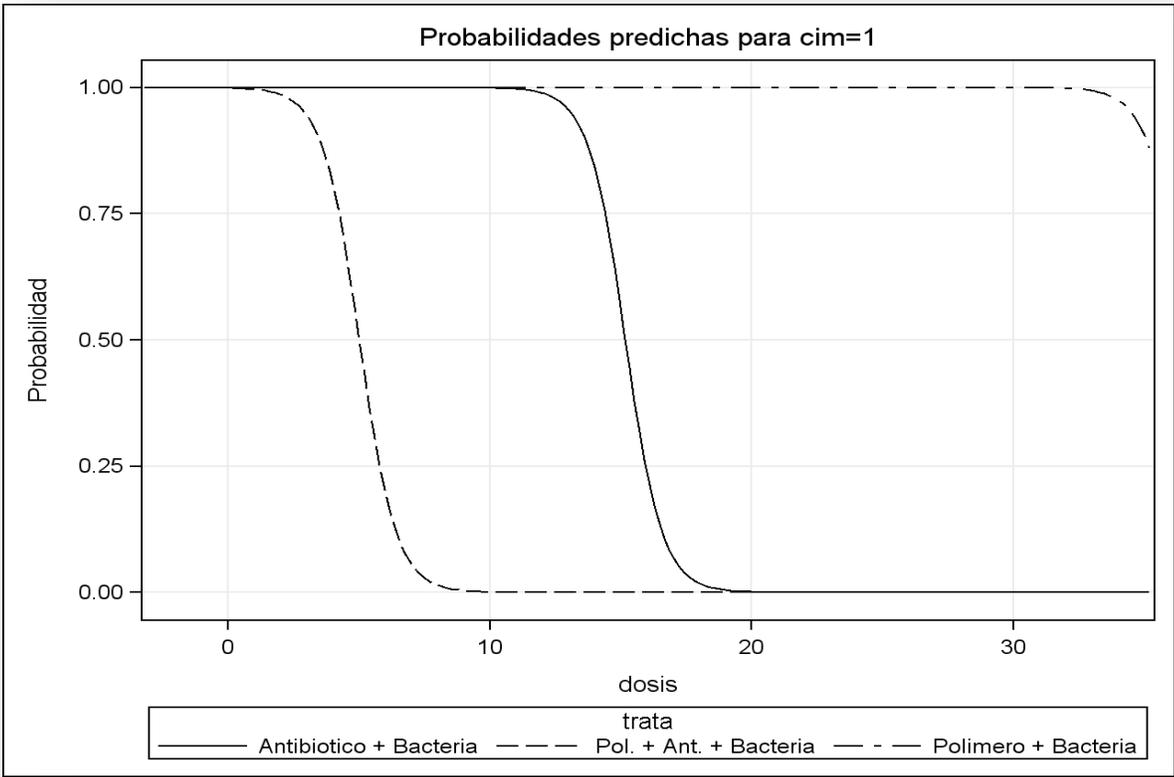


Figura 255: Método de Kaplan-Meier para los diferentes ensayos realizados en la prueba de micro-dilución en caldo sobre las cepas de *S. aureus* estudiadas. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.