

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS ASOCIADOS A MATERIALES POLIMÉRICOS
ANFIFÍLICOS EN CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS

ALEJANDRO ORTIZ QUINTERO

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO PRODUCIDO POR
ANTIBIÓTICOS β -LACTÁMICOS ASOCIADOS A MATERIALES POLIMÉRICOS
ANFIFÍLICOS EN CEPAS BACTERIANAS PRODUCTORAS DE
BETALACTAMASAS

ALEJANDRO ORTIZ QUINTERO

TRABAJO DE GRADO

ASESORES DE INVESTIGACION:
ANDRES FELIPE DAVALOS
CONSTAIN HUGO SALAMANCA MEJIA

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUIMICA FARMACEUTICA
SANTIAGO DE CALI
2013

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	3
RESUMEN:	4
INTRODUCCIÓN:	6
DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:	7
MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE:	9
OBJETIVOS:	19
Objetivo General:	19
Objetivos específicos:	19
METODOLOGÍA:	20
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	25
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS	41

RESUMEN:

El presente estudio evaluó el efecto antimicrobiano ejercido por el antibiótico betalactámico bencilpenicilina asociado a las matrices poliméricas PAM-18Na₂ y PAM-18K₂ en tres cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, 25923 y 43300). Esta investigación explora nuevas estrategias farmacéuticas dirigidas a combatir la resistencia a antibióticos mediada por betalactamasas, a partir de un supuesto efecto bioprotector asociado a los polímeros.

Por medio de la prueba acidimétrica, de la técnica de difusión en disco por límite de zona y la prueba cromogénica, se determinó la producción de enzimas betalactamasas en cada una de las cepas evaluadas. Se pudo establecer que *S. aureus* ATCC 29213 y 43300 son productoras de este tipo de enzimas. Por otro lado, se determinó que la cepa *S. aureus* ATCC 25923 no es productora. Los resultados coinciden con la información suministrada por el CLSI, organismo que utiliza y sugiere estas cepas como controles en varias de sus pruebas.

Posteriormente, se evaluó por medio de la técnica de microdilución en caldo el efecto antimicrobiano producido por el antibiótico penicilina G, solo y en asociación con cada uno de los polímeros, pudiéndose precisar en cada una de las cepas seleccionadas su perfil de susceptibilidad. Los resultados obtenidos demuestran que las tres cepas de *S. aureus* evaluadas son resistentes a la bencilpenicilina sola, de acuerdo a los criterios CLSI. También se pudo observar que los polímeros solos, a las concentraciones evaluadas, no tienen efecto antimicrobiano sobre las cepas objeto de estudio, mientras que los polímeros asociados al antibiótico si incrementan el efecto antimicrobiano en proporción 1:1. Se pudo inferir que este efecto depende tanto de la proporción fármaco – polímero, como de los mecanismos de resistencia propios de cada cepa.

Aunque dicha asociación no hace que las cepas sean susceptibles al antibiótico, según los criterios de la CLSI, si permite establecer, que varios de los tratamientos evaluados, producen una reducción significativa de la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento bacteriano. Por ejemplo cuando se evaluó el efecto antimicrobiano del antibiótico solo, la CIM fue conseguida a una concentración de 2µg/mL, mientras que los tratamientos en los cuales se evaluaron asociaciones fármaco-polímero en proporciones 1:1, la CIM fue conseguida a una concentración de 0,5µg/mL de antibiótico en el 80% de los casos, es decir, ¼ de la concentración necesaria cuando se emplea el antibiótico solo o 75% menos antibiótico. Igualmente se observó disminución en la CIM₁₀₀, que paso de 128µg/mL con el fármaco solo, a 32µg/mL, cuando este se encontraba en asociación con el polímero potásico.

Finalmente el polímero PAM-18 K₂ en proporción 1:1 con el antibiótico, parece ser, que ejerce un efecto bioprotector sobre el antibiótico bencilpenicilina que lo protege de la acción de enzimas betalactamasas. Esto basado en los efectos producidos por la asociación fármaco-polímero sobre la actividad antimicrobiana en las tres cepas.

INTRODUCCIÓN:

A lo largo de la historia, la resistencia bacteriana a los antibióticos ha disminuido la efectividad de las terapias encaminadas a salvar la vida de seres humanos y animales, situación que ha despertado el interés de la comunidad científica mundial. Frente a esta problemática se han propuesto nuevas estrategias, entre ellas la utilización de polímeros que sirvan como vehículos que transportan el fármaco, y a su vez, lo protejan de algunos de los mecanismos de resistencia bacteriana, buscando así, mejorar el uso del tratamiento antibiótico, y disminuir las tasas de morbilidad y mortalidad causadas por las enfermedades infecciosas y todas las consecuencias asociadas a este fenómeno.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal evaluar el efecto antimicrobiano producido por un antibiótico betalactámico asociado a polímeros anfifílicos sobre diferentes cepas de *S. aureus* (ATCC 29213, 25923, 43300). Los polímeros anfifílicos estudiados fueron el PAM-18 Na₂ y el PAM-18 K₂ y el antibiótico Penicilina G sódica.

Staphylococcus aureus fue el organismo seleccionado para realizar esta investigación por ser un patógeno capaz de producir infecciones tanto en humanos como en animales (bovinos), su elevada prevalencia alrededor del mundo y por presentar una alta capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos; elementos que convierten a las enfermedades producidas por este organismo en un problema de salud pública. La penicilina G es un antibiótico natural del grupo de los betalactámicos, escasamente utilizado para tratar enfermedades estafilocócicas debido a la elevada tasa de desarrollo de resistencia. Por otro lado, es utilizada para tratar enfermedades producidas en los animales donde se desarrolla resistencia pero en una tasa más baja que en cepas que infectan humanos.

La metodología propuesta involucró, la realización de pruebas para detectar la producción de enzimas betalactamasas en las cepas utilizadas, y pruebas dirigidas a establecer la concentración mínima inhibitoria (CIM) del antibiótico tanto en presencia como en ausencia de los polímeros, a diferentes proporciones. Finalmente se determinó el efecto antimicrobiano producido por la asociación del polímero con el antibiótico.

Este trabajo se enmarca dentro del macro-proyecto Físicoquímica Farmacéutica, el cual se enfoca en la búsqueda de matrices poliméricas con potencial uso farmacéutico. Este proyecto proporciona información valiosa acerca de un posible vehículo farmacológico que ejerza un efecto bioprotector sobre el antibiótico evaluado.

DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN:

Desde su introducción como método de tratamiento de enfermedades infecciosas, los antibióticos betalactámicos han venido siendo utilizados de manera descontrolada. Esta práctica ha originado que muchos de los microorganismos patógenos hayan desarrollado mecanismos de resistencia, siendo el mediado por enzimas betalactamasas uno de los más reconocidos. Como consecuencia de la resistencia a antibióticos se ha incrementado el fallo en los tratamientos, evento que además de comprometer la vida de los pacientes, causa congestión y sobre costos que perjudican a los hospitales y al sistema general de salud.

Staphylococcus aureus es una bacteria que se encuentra asociada a septicemias y abscesos cutáneos. Este microorganismo es el patógeno más frecuentemente aislado de 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). Este patógeno ha desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos betalactámicos entre otros, y su incidencia ha aumentado significativamente en los últimos años en Europa y Estados Unidos (Naber, 2009).

Para contrarrestar la resistencia bacteriana a antibióticos se han utilizado diferentes estrategias a lo largo de la historia. Entre ellas se destaca, la vehiculización de fármacos betalactámicos en matrices poliméricas anfifílicas que sirven como reservorios protectores, que impiden que las enzimas (betalactamasas) degraden el antibiótico y pueda así, ejercer su acción terapéutica (Arenas Fernández, Mora Arango, Salamanca, & Jaramillo Flórez, 2012).

El presente estudio busca evaluar dos matrices poliméricas anfifílicas como reservorios bioprotectores del fármaco bencilpenicilina sobre diferentes cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a dicho fármaco (resistencia mediada por betalactamasas). Este proyecto tiene relevancia, nacional e internacional, en el área de las ciencias farmacéuticas, debido a que la información derivada de él puede ser utilizada como base para el desarrollo de nuevas formulaciones a partir de fármacos ya estudiados, y combatir la problemática anteriormente mencionada. La resistencia a los antibióticos tiene implicaciones importantes en la salud pública a nivel mundial, por ello se deben realizar estudios que demuestren la eficacia de estrategias novedosas en el entorno farmacéutico para luchar contra ella. Se debe tener en cuenta que son ensayos *in vitro* que sirven para observar el comportamiento del antibiótico, asociado a los polímeros estudiados en presencia

de la bacteria, pero que no están relacionados con la eficacia ni con la efectividad a nivel terapéutico. Esto último debido a que se requieren estudios adicionales que confirmen su aplicación terapéutica.

MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE:

La resistencia se define como la habilidad de un organismo y su progenie de mantener la viabilidad y la tasa de crecimiento, de manera temporal o permanente, bajo condiciones que destruirían o inhibirían el crecimiento de los miembros de la especie en particular. Un microorganismo es resistente cuando no es susceptible a una determinada concentración de agente antibiótico (Cloete, 2003).

A lo largo de la historia, las enfermedades causadas por microorganismos han afectado significativamente a la humanidad. A comienzos de 1940, la situación frente a dichas enfermedades mejoró notablemente gracias a la aparición de la penicilina (Tenover, 2006). Fleming descubrió la penicilina en 1928, y se empezó a utilizar a partir de 1940 como tratamiento para enfermedades tales como sífilis y neumonía. Seis años después, el medicamento perdió su eficacia debido al desarrollo de resistencia al agente penicilínico (Echevarria, J. & Iglesias, D., 2003). La resistencia por parte de las bacterias se desarrolló entonces rápidamente y emergió la necesidad de buscar nuevas estrategias de tratamiento para las enfermedades de tipo infeccioso.

La resistencia a los antibióticos, en la actualidad, es un problema de salud pública que ha causado preocupación a nivel 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 estos, con consecuencias negativas importantes. En las instituciones de salud, cuando falla el tratamiento, se puede comprometer la vida de los pacientes, principalmente aquellos críticamente enfermos y que padecen enfermedades inmunosupresoras (HIV, Diabetes, etc.), pudiendo causar su muerte (Tenover, 2006). La falla en los tratamientos, también implica congestión y hacinamiento que generan sobrecostos al sistema de salud, debido al aumento de la estancia hospitalaria y al sobreuso de grupos diferentes de antibióticos (Tenover, 2006). Por otro lado y no menos importante, la prevalencia de cepas resistentes a los tratamientos farmacológicos aumenta el riesgo de alcanzar niveles epidemiológicos difíciles de controlar (Tenover, 2006).

La resistencia en bacterias ha sido ampliamente estudiada, y constituye uno de los retos más grandes y difíciles de abordar por la comunidad científica. Los organismos unicelulares se adaptan fácilmente al entorno que los multicelulares, una ventaja que les permite resistir condiciones adversas que los destruirían. Debe recordarse que aunque la ciencia cada vez crea nuevas y mejores estrategias para sobrellevar esta problemática mundial, se debe optar por actuar directamente sobre la fuente principal y hacer un mejor control de las infecciones. Entre estas acciones varios autores recomiendan optimizar el uso de antimicrobianos (disminuir las prescripciones que conllevan a errores de medicación, etc), y ejercer buenas prácticas de control de infecciones para que la

resistencia no se difunda (no permitir que un organismo resistente contamine entornos sanos) (Smith & Jarvis, 1999). También es importante obtener registros epidemiológicos, de cada hospital, sobre la aparición de nuevas cepas resistentes, que puedan ser identificadas y confinadas, para evitar su diseminación.

Existe una amplia variedad de agentes antimicrobianos, que se utilizan en el control de las diferentes infecciones. Estos actúan normalmente mediante alguno de los siguientes mecanismos: (Rang & Dale, 2008; Tenover, 2006):

- Interfieren la síntesis de la pared celular (betalactámicos y glucopéptidos).
- Inhiben la síntesis de proteínas (Macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, estreptograminas y oxazolidinonas).
- Interfieren la síntesis de ácidos nucleicos (Fluoroquinolonas).
- Inhiben vías metabólicas (sulfonamidas y trimetoprim).
- Causan la ruptura de la membrana celular (polimixinas (Chen&Kaye, 2011) y daptomicina).

En el caso particular de la penicilina, esta fue aislada por primera vez por Alexander Fleming en 1928, de un cultivo de *Staphylococcus sp*, contaminado con un hongo llamado *Penicillium sp*, el cual liberaba una sustancia que inhibía el crecimiento bacteriano. La penicilina hace parte de los antibióticos tipo betalactámicos, que actúan interfiriendo la síntesis del peptidoglucano presente en la pared celular de las bacterias (Rang & Dale, 2008; Sussmann, Mattos, & Restrepo, 2011). Para que actúen estos antibióticos es necesario que la bacteria se encuentre en fase de multiplicación, ya que es en este momento cuando se sintetiza la pared celular.

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 solo las células bacterianas (Castellano González & Perozo-Mena, 2010).

Químicamente, las penicilinas contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico, estructura que deriva de la condensación de una molécula de L-valina y una de L-cisteína, para dar lugar al doble anillo característico. También tienen una cadena lateral R, que varía de unas

penicilinas a otras en la posición seis del anillo betalactámico, y que es la que define sus propiedades (Marín, M. & Guidol, F, 2003) Véase la figura 1.

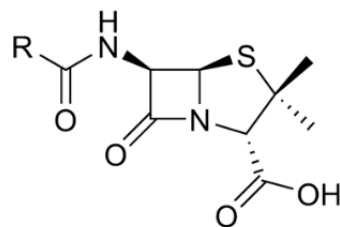


Figura 1: Núcleo Penicilínico Inicial. El sustituyente R es el que ha sido intercambiado para mejorar la eficacia terapéutica obteniendo otros compuestos derivados tales como la ampicilina y amoxicilina.

La penicilina inicialmente obtenida del hongo *Penicillium sp.* es la penicilina G o bencilpenicilina, considerado un fármaco de primera elección para el tratamiento de numerosas infecciones debido a su amplio rango de acción. (Rang & Dale, 2008) Véase figura 2.

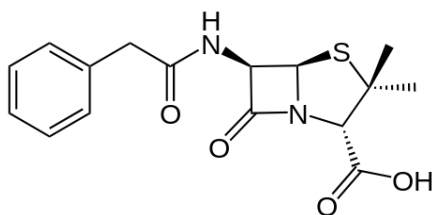


Figura 2: Estructura de la Bencilpenicilina o penicilina G.

Para el tratamiento de cepas bacterianas resistentes, productoras de penicilinasas, es común la utilización de inhibidores de este tipo de enzimas, uno de los más utilizados es el ácido clavulánico. Este compuesto tiene un núcleo similar al ácido penicilínico, pero sustituye en el anillo el átomo de azufre por un átomo de oxígeno, que aumenta la reactividad de la molécula, y proporciona mayor afinidad por las betalactamasas; adicionalmente no posee la cadena lateral (Marín, M. & Guidol, F, 2003) Véase figura 3.

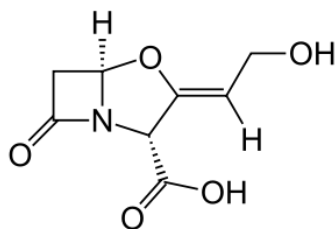


Figura 3: Estructura del Ácido Clavulánico (inhibidor de la penicilinasas)

De forma general, la resistencia se ha clasificado en natural (o intrínseca) y adquirida. La resistencia natural se asocia a mecanismos intrínsecos o propios del

organismo, que no se relacionan con la dosis del antibiótico, por ejemplo, los micoplasmas que no presentan pared celular son resistentes por naturaleza a las penicilinas. La resistencia adquirida se debe principalmente a mutaciones específicas en su material genético (ADN) (denominada por otro autor como evolución vertical (Tenover, 2006)), o a la adquisición de nueva información mediante elementos genéticos implicados como, transposones, integrones y plásmidos (también llamada evolución o transferencia horizontal (Tenover, 2006)) (Sussmann et al., 2011). Estos dos tipos de resistencia pueden, a su vez, presentarse de dos maneras, de forma constitutiva o de forma inducible. La primera implica que la resistencia adquirida funciona en todo momento, a diferencia de la inducible que solo se activa frente a un estímulo que produce su expresión (Smith & Jarvis, 1999).

Los mecanismos de resistencia microbiana se resumen en tres grandes grupos (que pueden ocurrir simultáneamente) (Sussmann et al., 2011; Tenover, 2006; Vignoli, R. & Seija, V., 2006):

- Inactivación enzimática o destrucción del antibiótico: el principal mecanismo de destrucción se obtiene por hidrólisis del antibiótico (p.e. ataque de betalactamasas al anillo betalactámico de las penicilinas), aunque también pueden haber inactivaciones por modificaciones no hidrolíticas como acetilaciones, fosforilaciones que inactivan los aminoglucósidos (Vignoli, R. & Seija, V., 2006).
- Modificación o alteración en el sitio blanco del antibiótico: en este mecanismo se modifican o alteran sitios específicos de la anatomía celular, tales como las subunidades ribosomales 50S o 30S y la pared celular, entre otros (Sussmann et al., 2011).
- Alteraciones o barreras de permeabilidad: en este mecanismo se pueden resaltar dos tipos; el primero asociado a cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, por ejemplo, los Gram-negativos presentan una membrana externa rica en lípidos, que permite excluir moléculas de tipo hidrófilo (Sussmann et al., 2011), así como también, alterar canales aniónicos que limitan la entrada de los antibióticos de tipo hidrófobo, y modificar las porinas que excluirán moléculas según su tamaño (Vignoli, R. & Seija, V., 2006). El segundo se debe fundamentalmente a la existencia de canales de eflujo, donde además de limitar la entrada del antibiótico se disminuye la concentración intracelular y su actividad sobre el sitio de acción (Sussmann et al., 2011).

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 del 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 sp* 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 de patogenicidad, 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).

En la siguiente tabla se encuentran las características bioquímicas y biológicas generales del *Staphylococcus aureus* (Berga, 2009; Lowy, 1998) véase Tabla 1:

Tabla 1: Características generales del genero Staphylococcus.

Familia Micrococcaceae	
Genero <i>Staphylococcus</i>	
• Bacterias esféricas (cocos)	• Inmóviles
• Grampositivas	• No esporulados
• Agrupación típica en racimos	• Crecimiento rápido (18-24h)
• Coagulasa positivos	• Resistentes a condiciones ambientales adversas
• Anaerobios facultativos	• Fermentación manitol
• Pigmentación Dorada	

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 patológico 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).

Las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* son la principal causa de desórdenes de la piel, tejidos blandos, endovasculares, respiratorios, articulaciones y huesos (Lowy, 1998). “Constituye uno de los patógenos más frecuentemente aislados en infecciones sanguíneas, y neumonías” (Perazzi et al., 2010). Se encuentra asociado a septicemias y abscesos cutáneos en pacientes en cuidados intensivos. En este sentido, puede causar tanto infecciones agudas como crónicas, afectando los huesos (Osteomielitis), válvulas del corazón (Endocarditis Infecciosa) o el trato respiratorio (Fibrosis Cística) (Ross Fitzgerald, 2013). Además está asociado a síndrome de shock tóxico (Lowy, 1998).

La transmisión de *Staphylococcus aureus* se da principalmente por contacto directo, piel con piel con un individuo infectado o portador, aunque también puede darse a través del contacto con superficies y objetos contaminados (Chambers & DeLeo, 2009). Son varios los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que un individuo desarrolle infección. Se le atribuye como factor de riesgo de infección nosocomial la colonización nasal (Ross Fitzgerald, 2013).

La bencilpenicilina o penicilina G es ampliamente usada para el tratamiento de la mastitis bovina causada por *Staphylococcus aureus*. A diferencia de las cepas bacterianas que afectan a humanos, las que infectan a los animales no han desarrollado, en gran medida, resistencia a penicilina, aunque en algunos países se observa que aproximadamente el 50% de los aislados son resistentes a Penicilina G (Haveri, Suominen, Rantala, Honkanen-Buzalski, & Pyörälä, 2005). En humanos la resistencia a la penicilina presentada por *Staphylococcus aureus* está por encima del 90%, a diferencia de la resistencia encontrada en bovinos que varía del 10 al 70% dependiendo de la ubicación geográfica (Castellano González & Perozo-Mena, 2010; Lowy, 2003b; Olsen, Christensen, & Aarestrup, 2006).

Para el caso particular de *Staphylococcus sp.*, se han identificado cuatro mecanismos de resistencia antibiótica a betalactámicos (Berga, 2009):

- Inactivación enzimática por medio de betalactamasas (penicilinasas).
- Alteración de las proteínas de unión a penicilinas.
- Alteración en la permeabilidad a los antibióticos, por generación de porinas.
- Bombas de flujo (Huet, Raygada, Mendiratta, Seo, & Kaatz, 2008).

Según Ambler (1980), existen 4 tipos serológicos de betalactamasas en *S. aureus*: A, B, C y D (Vignoli, R. & Seija, V., 2006), inducibles en su mayoría, extracelulares y codificadas en genes localizados en plásmidos. La resistencia a penicilina está asociada principalmente a penicilinasas, un tipo de betalactamasa que puede ser tanto inducible como de producción constitutiva, y localizada a nivel plásmidico

(Castellano González & Perozo-Mena, 2010). Su inducción ocurre a través de una señal, que se activa en presencia del antibiótico (betalactámico), atravesando la membrana y activando un gen represor transcripcional, que desbloquea la producción de la betalactamasa (Castellano González & Perozo-Mena, 2010). La penicilinasasa actúa hidrolizando el anillo betalactámico del antibiótico y formando un derivado inactivo, incapaz de unirse a las PBPs, este derivado se le conoce como ácido penicilóico (Rodríguez et al., 2000).

La resistencia a penicilina a finales de los años 50 era tal, que condujo a buscar alternativas a los tratamientos de ese entonces; la introducción de nuevas moléculas estables a penicilinasasa, como las penicilinas semisintéticas fue una de las opciones. Dentro de estas se puede mencionar a la meticilina (Castellano González & Perozo-Mena, 2010). Introducida clínicamente en 1959, fue exitosa en un periodo muy breve de tiempo contra cepas hasta entonces virtualmente intratables. En 1961, dos años después, la primera cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente (MRSA) fue identificada (Smith & Jarvis, 1999) en Inglaterra. Se difundió posteriormente en varios países alcanzando Estados Unidos en 1968 (Echevarria, J. & Iglesias, D., 2003).

Para la cepa MRSA, la resistencia a meticilina se debe a un gen llamado MecA que codifica una proteína alternativa de unión a penicilina llamada PBP2' que es menos afín a todos los Betalactámicos en especial a la meticilina (Berga, 2009; Sussmann et al., 2011; 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 resistentes a penicilinasasa. Dicha resistencia es a menudo heterogénea, es decir, su expresión varía de acuerdo a las condiciones ambientales (Lowy, 1998).

La producción de betalactamasas y de PBP2a está regulada por sistemas proteínicos sensor-transductores y represores similares. 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 betalactamasa y PBP2a respectivamente (Zhang, Hackbarth, Chansky, & Chambers, 2001). La detección de BlaZ y MecA a través de la técnica PCR (por sus siglas en ingles Reacción en cadena de la polimerasa), identifica correctamente las cepas con resistencia heterogénea y es considerado como el "goldstandard" para detectar resistencia a penicilina (producción de betalactamasa) y meticilina (producción de PBP 2a), respectivamente (Castellano González & Perozo-Mena, 2010; Pitkala, Salmikivi, Bredbacka, Myllyniemi, & Koskinen, 2007). El gen BlaZ en *Staphylococcus aureus* que afectan a humanos se encuentra principalmente a nivel plásmidico, 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).

El Subcomité de Pruebas de Sensibilidad a los Antimicrobianos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) revisa datos provenientes de fuentes y estudios diferentes para establecer los métodos o pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, criterios de interpretación y parámetros de control de calidad. Las pruebas de susceptibilidad (o también llamados antibiogramas) estandarizadas por el CLSI para *Staphylococcus aureus* se basan en medir la concentración mínima del antibiótico a la cual se inhibe el crecimiento de una cantidad determinada de bacterias (Concentración Mínima Inhibitoria, CIM). Existen dos métodos generales para medir la CIM: difusión en disco y dilución en caldo, esta última, a su vez, con dos modalidades, la microdilución y la macrodilución (CLSI, 2012).

La prueba de microdilución en caldo (utilizada en el presente estudio), se realiza incubando una cantidad de bacterias definida en diluciones seriadas del antibiótico en una placa de microtitulación de 96 celdillas. La concentración en la cual no exista crecimiento visible de bacterias será la CIM. Posteriormente se interpretarán los resultados y clasificarán las cepas en sensible, intermedio o resistente al agente antibiótico. (Cavaliere, S.J., 2005)

Los criterios de clasificación de los microorganismos según el CLSI son tres según el documento M100-M22: Sensible, que indica que el crecimiento del microorganismo es inhibido a la concentración usualmente alcanzada por el antibiótico en el sitio de acción a la dosis del tratamiento recomendado, Intermedio si la concentración del antibiótico no se encuentra en la zona de resistencia ni de sensibilidad, y resistente, si el crecimiento no se inhibe a dicha concentración alcanzada.

S. aureus es la mayor causa de infecciones nosocomiales en Latinoamérica, y la frecuencia de infecciones en la comunidad en esta región va en aumento. Aunque existen varios centros de investigación que se encargan de la vigilancia de las infecciones causadas por dicho patógeno (entre ellos se encuentran; RESISTNET, ZAAPS, TEST y SENTRY), no se tiene certeza real de la situación actual, debido a que gran parte de la población recibe cuidado médico en pequeños centros de salud que no poseen la infraestructura para brindar aquella información y llevar así un registro epidemiológico (Garza-González & Dowzicky, 2013; Guzmán-Blanco et al., 2009). Es necesario entonces mejorar el registro de la susceptibilidad de aislamientos de *S. aureus* para contribuir a obtener la información necesaria para un control de las infecciones y protocolos de tratamiento efectivos.

En los últimos veinte años, se han reportado varios casos de sepsis y bacteriemias en Norteamérica y Europa lo que es muy preocupante. En Colombia los contagios se presentan principalmente en la comunidad más que en los hospitales (Arenas Fernández et al., 2012). Un estudio realizado entre el 2004 y el 2010 con aislamientos de *Staphylococcus aureus* en Latinoamérica, obtuvo que el 46,9% del total (3126) de los aislados se identificaron como MRSA. En el mismo estudio se obtuvo que el 37,1% de los 445 aislados en Colombia fueron MRSA, observando

que el año 2006 presentó el porcentaje más alto de MRSA (Garza-González & Dowzicky, 2013).

En Colombia, de acuerdo a un sub-estudio prospectivo de cohortes realizado en diez hospitales a nivel nacional durante seis meses, y con la participación de la Clínica Valle del Lili y el Hospital Universitario del Valle de Cali, se obtuvo que la prevalencia de *Staphylococcus aureus* implicados en sepsis en sangre y pulmón en unidades de cuidados intensivos (UCI), fue mayor que la de otros patógenos. Su prevalencia en pulmón en pacientes en UCI fue del 32,4%, seguido por *Klebsiella pneumoniae* (17,6%). En sangre ocupó el segundo lugar con 13,5% después de *Klebsiella pneumoniae* con 15,7% (Molina et al., 2011).

Varias estrategias han sido propuestas para mejorar la eficacia de los tratamientos de las enfermedades infecciosas. En la actualidad se adelantan investigaciones en las siguientes áreas (Abeylath & Turos, 2008):

- Investigación en nuevos fármacos con potencial antibiótico (derivados Betalactámicos estables a penicilinas).
- Prodrogas betalactámicas (inhibidores de penicilinas como el ácido clavulánico unido a penicilina G).
- Vehículos farmacológicos (denominados como “drug delivery system”) que mejoren tanto la farmacocinética, como la farmacodinamia y en consecuencia la eficacia terapéutica, tales como: microcápsulas o microesferas, liposomas, hidrogeles, nano partículas (dimensiones entre 1 y 1000nm), este último de interés para el presente estudio (Abeylath & Turos, 2008).

Los polielectrolitos son sistemas moleculares que poseen una región cargada en la cadena principal polimérica, llamado también poliiones. Según la carga se clasifican como catiónicos o aniónicos, y según su composición de monómeros, en homopolímeros o copolímeros (presente estudio). Los copolímeros son los que están formados por dos unidades monoméricas diferentes que se encuentran organizados de manera aleatoria, alternante o en bloque. A estos compuestos se les puede adicionar cadenas hidrofóbicas que le provean carácter anfipático, pudiéndose comportar de manera similar a los surfactantes simples ya conocidos. En solución estos polímeros se reorganizan en dos conformaciones; de tipo extendida, y en forma de ovillo estadístico o aleatorio (importante en el presente estudio). Se formará entonces una matriz donde coexisten un micro entorno apolar y uno polarmente cargado. La polaridad de ese microentorno hidrofóbico depende de la cadena lateral del polímero. Cuando estas cadenas poliméricas (con su entorno hidrofóbico) se organizan y se asocian entre sí, tienden a formar una agregación molecular conocida como micela polimérica, se forma una pseudofase que puede vehiculizar compuestos hidrófobos (Salamanca C. H., 2007). A medida que se hace más larga la cadena alquílica (lateral) aumenta la estabilidad de la

micela polimérica (Salamanca C. H., Barraza, R. G., Acevedo, B., & Olea, A. F., 2007).

Se ha reportado que los vehículos farmacológicos, han mejorado las características fisicoquímicas de los fármacos ya existentes, ejerciendo un efecto bioprotector en agregados macromoleculares formados por especies poliméricas anfífilas. Este efecto bioprotector consiste en una barrera física que ejerce la matriz polimérica sobre las enzimas, evitando, por ejemplo la degradación del fármaco en el caso de las betalactamasas (Arenas Fernández et al., 2012).

El presente trabajo utilizó dos polímeros derivados del anhídrido maleico en forma de sales. El Poli(acidomaleico-18C), en sus dos formas salinas, potásica (PAM-18C K₂) y sódica (PAM-18C Na₂). Véase figura 4.

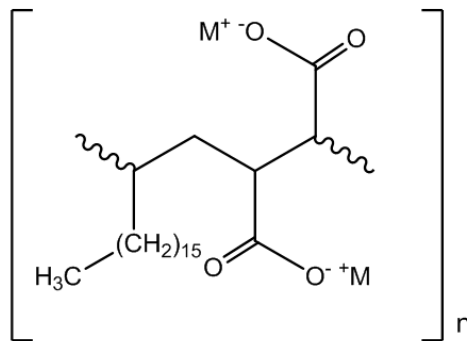


Figura 4: Esquema del monómero de la matriz polimérica PAM-18C con Na y K y una cadena lateral formada por 18 átomos de carbono.

Se evaluó el efecto, *in vitro*, que tienen dichos polímeros sobre el crecimiento de tres cepas de *Staphylococcus aureus* al vehiculizar la penicilina G (bencilpenicilina) a su sitio de acción. Para ello se utilizaron pruebas de susceptibilidad según los estándares del CLSI.

OBJETIVOS:

Objetivo General:

Evaluar el efecto antimicrobiano producido por la asociación de las matrices poliméricas PAM-18 Na₂ y PAM-18 K₂ al antibiótico bencilpenicilina sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.

Objetivos específicos:

- Determinar la presencia de enzimas betalactamasas en tres cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, 25923 y 43300) según los estándares CLSI.
- Evaluar el efecto antimicrobiano producido por el antibiótico bencilpenicilina en las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.
- Evaluar el efecto antimicrobiano producido por los polímeros anfifílicos PAM-18 Na₂ y PAM-18 K₂ en las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.
- Evaluar la actividad antimicrobiana ejercida por el antibiótico bencilpenicilina cuando se asocia a los polímeros anfifílicos PAM-18 Na₂ y PAM-18 K₂ en las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.

METODOLOGÍA:

Esta investigación fue realizada en los laboratorios de Microbiología y fisicoquímica farmacéutica de la Universidad Icesi de la Ciudad de Cali. La metodología propuesta buscó evaluar el efecto antimicrobiano producido por la asociación de matrices poliméricas anfifílicas al antibiótico bencilpenicilina sobre tres cepas de *Staphylococcus aureus*.

Las matrices poliméricas evaluadas fueron las formas salinas (dipotásica y disódica) del Poli (ácido maleico-alt-octadeceno); polielectrolito que ha sido objeto de estudio del grupo de investigación en fisicoquímica farmacéutica de la Universidad Icesi, debido a sus potenciales usos farmacéuticos.

Las cepas bacterianas utilizadas en la investigación fueron todas cepas ATCC, sugeridas por el CLSI en el documento M07-A8 de Enero de 2009. Las cepas fueron seleccionadas teniendo en cuenta la presencia/ausencia de diferentes mecanismos de resistencia (ver tabla 1) frente a los cuales se evaluó el efecto antimicrobiano producido por el antibiótico asociado a los distintos polímeros.

Tabla 2: Cepas bacterianas utilizadas en la investigación.

Microorganismo	Características
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<ul style="list-style-type: none">• Betalactamasa negativo• MecA negativo.
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<ul style="list-style-type: none">• Betalactamasa Positivo.• MecA negativo.
<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<ul style="list-style-type: none">• MecA positivo.

Las cepas *S. aureus* ATCC 25923 y 29213 fueron donadas por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM). Microbiologics Inc.® fue el proveedor de la cepa *S. aureus* ATCC 43300. El estándar secundario utilizado de bencilpenicilina sódica tenía una potencia de 1622 Unidades/mg, fecha de vencimiento = 30/08/2013 y lote 18194 proveniente de Tecnoquímicas.

Procurando cumplir los objetivos planteados la metodología propuesta fue dividida en cuatro fases:

Fase 1: Preparación de insumos, materiales de laboratorio y adaptación de pruebas y procedimientos operativos para el manejo seguro de las cepas seleccionadas.

Para realizar un manejo SEGURO de las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, 25923 Y 43300) utilizadas en la investigación, y de los residuos generados en la misma, se desarrolló un procedimiento operativo estándar el cual se encuentra en el anexo 1. Este se realizó con el fin de evitar al máximo la posible contaminación o diseminación del microorganismo. *S. aureus* es clasificado según el manual de bioseguridad de la OMS como nivel de riesgo dos el cual debe mantenerse bajo un marco de buenas prácticas de laboratorio que aseguren un nivel de bioseguridad dos (OMS, 2005). El protocolo fue realizado de acuerdo a dicho manual y se siguieron sus instrucciones durante la realización de los ensayos de laboratorio.

También fue elaborada una guía de laboratorio, en la cual se describen detalladamente todos los protocolos realizados durante la experimentación. Esta guía se encuentra en el anexo 2. Para la realización de la guía se utilizaron los estándares del CLSI, y se adaptaron a las condiciones del laboratorio. Con esta guía se deja por escrito como se realizaron las pruebas, facilitando su realización en investigaciones posteriores.

Fase 2: Pruebas de detección de producción de enzimas betalactamasas.

Para detectar la producción de betalactamasas se realizaron tres tipos de pruebas:

La prueba acidimétrica en tubo, descrita por Rodríguez y colaboradores (Rodríguez et al., 2000) y por Livermore y Brown (Livermore & Brown, 2001) se fundamenta en el cambio del pH del medio debido a la formación del ácido penicilóico a causa de la hidrólisis de la penicilina G producida por la enzima. Se realizaron cinco réplicas de este procedimiento.

La segunda prueba fue la de difusión en disco límite de zona, 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). Esta prueba se basa en la formación de un halo alrededor de un disco impregnado con el antibiótico en una placa con agar Mueller-Hinton inoculada con el microorganismo, observándose diferencia en el halo formado alrededor de una cepa productora y una no productora de la enzima. Si el halo se encuentra bien definido indica producción de betalactamasa, si se observa un crecimiento gradual en dicha zona, es decir, un halo con forma difusa indica la no producción de la enzima (Gill et al., 1981). Se realizaron ocho réplicas de este procedimiento para validar los resultados.

La última prueba descrita por O' Callaghan en 1972, consistió en utilizar discos impregnados con la enzima Nitrocefín, una cefalosporina cromogénica que,

cuando el enlace amida de su anillo betalactámico es hidrolizado por una betalactamasa, cambia de color amarillo a rojo, lo cual indica producción de betalactamasas (O'Callaghan, Morris, Kirby, & Shingler, 1972). Se realizó utilizando discos de nitrocefin comerciales que fueron inoculados con la bacteria y agua estéril, verificando el cambio de color hasta la hora después de la inoculación, si cambiaba de amarillo a rojo indicaba producción de la enzima si quedaba de color amarillo evidenciaba la no producción de betalactamasa. Esta prueba es utilizada frecuentemente en estudios actuales y de manera rutinaria en laboratorios clínicos, debido a su alta especificidad y confiabilidad además de su practicidad demostrada (Haveri et al., 2005; Livermore & Brown, 2001; Pitkala et al., 2007).

Fase 3: Pruebas de microdilución en caldo (evaluación de la Concentración Inhibitoria Mínima CIM).

Fueron evaluadas todas las combinaciones entre el fármaco, los polímeros y las cepas de *S. aureus* seleccionadas (*tratamientos*) véase *tabla 3*.

Tabla 3. Componentes de los tratamientos evaluados en el estudio sobre las cepas en estudio *S. aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.

Ensayo	Componentes (tratamiento)	Proporción de los componentes
1	Bencilpenicilina	-
2	PAM-18 Na ₂	-
3	PAM-18 K ₂	-
4	Bencilpenicilina + PAM-18 Na ₂	1:1
5	Bencilpenicilina + PAM-18 K ₂	1:1
6	Bencilpenicilina + PAM-18 Na ₂	1:1,5
7	Bencilpenicilina + PAM-18 K ₂	1:1,5
8	Bencilpenicilina + PAM-18 Na ₂	1:2
9	Bencilpenicilina + PAM-18 K ₂	1:2

Nueve tratamientos en total con 16 réplicas cada uno. Se inocularon las placas con concentraciones sucesivas de antibiótico (Entre 0 y 512 µg/mL) y fijas de microorganismo (5×10^5 UFC/mL Aprox.), se incubaron de 16 a 20 horas,

posteriormente fueron interpretadas (ver preparación en Anexo 2). La lectura se realizó, tomando como positivo para crecimiento, la formación de un precipitado 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 no formación del precipitado y la no presencia de turbidez en el pozo, cada placa incluía un control positivo en el cual era inoculada la bacteria en caldo Mueller-Hinton (MH) y un control negativo con el tratamiento a una concentración a la cual no se evidencie crecimiento de la bacteria (1024 µg/mL), y el control de un pozo con caldo MH y antibiótico solo o con caldo MH mas antibiótico más polímero dependiendo del tratamiento sin presencia de bacteria. La concentración mínima inhibitoria (CIM) se tomó como la menor concentración de antibiótico, polímero o polímero más antibiótico evaluada, que inhibió el crecimiento del microorganismo.

La prueba de microdilución en caldo se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos estandarizados del CLSI. El protocolo detallado fue tomado del documento del CLSI, M07-A8 de Enero de 2009. Se realizaron 16 réplicas por cada combinación para disminuir la variabilidad de los resultados. En el siguiente esquema se describe de manera general la prueba de microdilución en caldo, estandarizada por el CLSI.

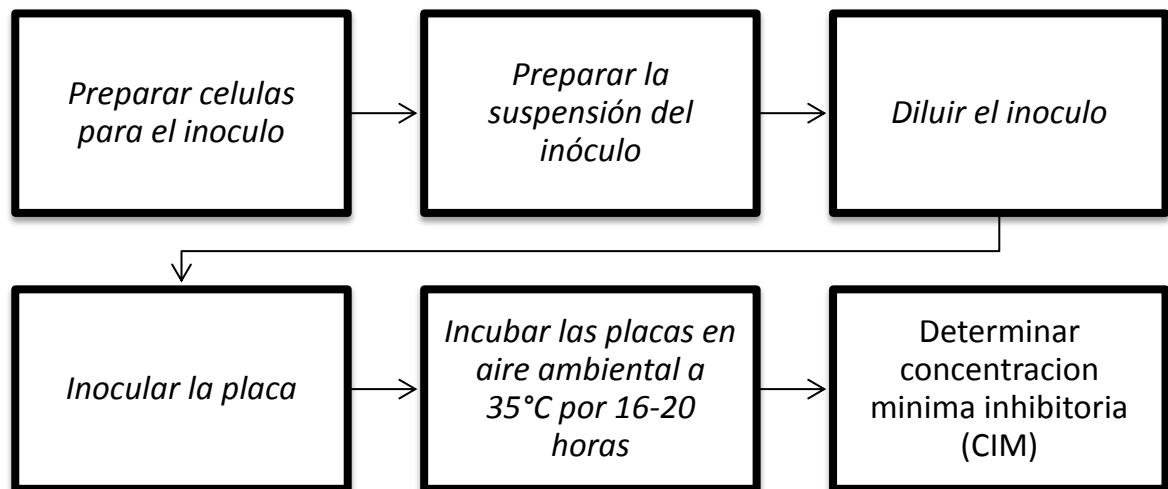


Figura 5: Esquema del método de dilución en caldo según estándares CLSI.

Fase 4: Análisis estadístico de resultados. Realizado a partir del método no paramétrico para la determinación de la función de supervivencia de Kaplan Meier. La CIM 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 80% (o aproximadamente ese valor) se definirá

como CIM₈₀, si es del 100% será CIM₁₀₀. Con base en estos valores se pudo establecer si existe un efecto negativo o positivo de cada tratamiento con respecto al antibiótico solo (patrón de comparación). El efecto negativo indica la disminución de la CIM, es decir que se necesitó menor concentración de antibiótico para inhibir el crecimiento de la bacteria con respecto al patrón de comparación (CIM del antibiótico solo). El efecto positivo indica que se necesitó mayor concentración de antibiótico para inhibir el crecimiento de la bacteria con respecto al patrón de comparación (CIM antibiótico solo). Las CIM's de referencia fueron seleccionadas debido a la practicidad y la certeza de la información que brindan, facilitando la observación del efecto conseguido por cada tratamiento. Una CIM₁₀₀ significa que un tratamiento particular consiguió inhibir el crecimiento de la bacteria en el 100% de las réplicas realizadas de este tratamiento. En varios casos no fue posible apreciar una CIM₁₀₀, atribuible a posibles errores experimentales que se mencionaran más adelante, así que para establecer, con una alta probabilidad, el efecto de cada tratamiento se seleccionó la CIM₈₀.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Evaluación de la producción de enzimas B-lactamasas

- Prueba Acidimétrica.

Con las adaptaciones de la metodología reportada se realizó la prueba acidimétrica, los resultados no fueron concluyentes posiblemente porque la concentración de penicilina G en solución sugerida para la prueba era de $1.000.000 \frac{\text{unidades}}{\text{mL}}$. Bajo estas condiciones cada ensayo tomaría máximo 15 minutos para obtener el resultado (positivo por el cambio de color o negativo por ningún cambio). Esta condición no se cumplió debido a la utilización de un estándar secundario (donación de Tecnoquímicas) de bencilpenicilina sódica con una actividad antibiótica de $1622 \frac{\text{Unidades}}{\text{mg}}$ que al ser disuelto (100mg/mL) solo alcanzo una concentración de $162200 \frac{\text{Unidades}}{\text{mL}}$, aproximadamente seis veces menos que la concentración sugerida por Livermore y Brown en 2001, sin embargo, la prueba fue realizada bajo estas condiciones intentando evaluar su comportamiento y su posible utilización como ensayo preliminar en la detección de producción de betalactamasas por cada una de las cepas, puesto que es una prueba simple, rápida y económica. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 4: Prueba acidimétrica para las cepas Sa 29213, 25923 y 43300. El signo “+” representa cambio de color después de 90 minutos, es decir, es productor de betalactamasa y el “-” indica que no hubo cambio, es decir, que no es productor de betalactamasa.

Prueba Acidimétrica						
Repeticiones	R	R2	R3	R4	R5	Porcentaje (%)
<i>S. aureus 29213</i>	+	-	-	+	+	60%
<i>S. aureus 25923</i>	-	+	+	-	-	40%
<i>S. aureus 43300</i>	-	-	-	+	-	20%

Se observó cambio de color en todas las cepas, *S. aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300, los porcentajes fueron 60, 40 y 20% respectivamente, del total de los ensayos realizados.

El cambio de color se presentó 90 minutos después de la inoculación de la bacteria (ver registro fotográfico del cambio de color después de los 90 minutos en anexo 3), aproximadamente seis veces más del tiempo requerido por la prueba (15 minutos) propuesta por Livermore y Brown (Livermore& Brown, 2001).

Esta prueba fue realizada utilizando una solución de bencilpenicilina a una concentración seis veces menor a la propuesta por Livermore y Brown, esta posiblemente sea la causa de la alteración en los tiempos de lectura de la misma y de la variabilidad de los resultados. Por este motivo se planteó la realización de la prueba de límite de zona para evaluar la producción de betalactamasas en las cepas seleccionadas.

- Prueba límite de zona:

Los resultados obtenidos en la prueba límite de zona son los siguientes (véase tabla 5):

Tabla 5: Prueba Zona Limite para las cepas Sa 29213, 25923 y 43300. El signo “+” representa un halo delimitado completamente (betalactamasa positivo) y el “-” indica un halo con crecimiento gradual o difuminado (Betalactamasa negativo).

Prueba Zona Limite									
Repeticiones	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Porcentaje (%)
<i>S. aureus</i> 29213	+	+	+	+	+	+	+	+	100%
<i>S. aureus</i> 25923	-	-	-	-	-	-	-	-	0%
<i>S. aureus</i> 43300	+	+	+	+	+	+	+	+	100%

Se observa que la cepa de *S. Aureus* ATCC 25923 presenta crecimiento difuso en el halo, es decir, no se observa un borde definido sino crecimiento gradual en la zona de inhibición, diferente a lo observado en las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y 43300 donde se puede apreciar un halo totalmente definido. Estos resultados ratifican las características de cada una de las cepas utilizadas, pues un halo definido (*S. aureus* ATCC 29213 y 43300) es indicativo de resistencia por producción de la enzima, mientras que la formación de un halo difuso como el observado en *S. aureus* ATCC 25923 permite inferir la no producción de betalactamasas (Gill et al., 1981). La cepa *S. aureus* ATCC 25923 demostró no ser productora de la enzima, así como se encontró en la literatura, (su resistencia

al antibiótico se debe a otros mecanismos tales como bombas de eflujo y porinas). Por otro lado, se demostró que el mecanismo de resistencia de la *S. aureus* ATCC 43300, además de la presencia de PBPs mutantes provenientes del gen *MecA* (gen de resistencia a meticilina MRSA), también se debe a la producción de enzimas betalactamasas. Los resultados corroboran la identidad de las cepas utilizadas.

Se realizó una última prueba con el fin validar a los resultados obtenidos en las pruebas anteriores. La prueba cromogénica se realizó a las tres cepas objeto de estudio, obteniendo los resultados consignados en la tabla 6.

Tabla 6: Resultados prueba cromogénica con discos de Nitrocefina comerciales sobre las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.

Cepa de <i>S. aureus</i>	Resultado
ATCC 29213	Cambio de color de amarillo a rojo intenso
ATCC 25923	No se presentó cambio de color
ATCC 43300	Cambio de color de amarillo a rojo débil

Los resultados anteriores indican que la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 corresponde a la productora de betalactamasas, la *S. aureus* ATCC 25923 no es productora y la *S. aureus* ATCC 43300 produce betalactamasas, aunque según el color observado se puede inferir que lo hace en menor proporción que la cepa de *S. aureus* ATCC 29213. Esta prueba corrobora los resultados de la prueba límite de zona y ofrece alta confiabilidad sobre la identidad de las cepas usadas en el presente estudio.

Prueba de microdilución en caldo:

En esta fase las pruebas se realizaron e interpretaron bajo el supuesto de que el polímero se encuentra bien disperso en el medio acuoso utilizado, que también se encuentra asociado al antibiótico de manera efectiva y que es estable durante el tiempo en que se desarrollan las pruebas. Este supuesto se realizó teniendo en cuenta el enfoque y el alcance mismo del proyecto.

Se realizaron los nueve tratamientos definidos en la metodología, los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas (véase tabla 7, 8 y 9).

Tabla 7: Resultados prueba de microdilución en caldo para *S. aureus* 29213. A la ausencia de crecimiento observable se le asignó el valor de uno (1) y a la presencia el valor de cero (0), sumando cada punto se obtuvo la cantidad de réplicas con inhibición de crecimiento.

		<i>S. aureus</i> 29213									
		Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)									
		0	0,0625	0,125	0,25	0,5	2	8	32	128	512
	Replicas	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tratamientos	Penicilina G	0	0	0	0	0	13	14	11	10	11
	PAM18Na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PAM18K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PAM18Na+PG 1.1	0	0	0	0	13	7	12	14	16	16
	PAM18K+PG 1.1	0	0	0	0	13	16	15	15	16	16
	PAM18Na+PG 1,5.1	0	0	0	0	1	13	9	15	15	14
	PAM18K+PG 1,5.1	0	0	0	0	0	7	12	15	16	16
	PAM18Na+PG 2.1	0	0	0	0	0	13	13	13	16	9
PAM18K+PG 2.1	0	0	0	0	0	9	9	12	16	16	

En la tabla se observan los resultados para la cepa *S. aureus* ATCC 29213 donde se puede apreciar que a medida que se aumenta la concentración de antibiótico en cada tratamiento, se observa un incremento en el porcentaje de inhibición, es decir, el número de réplicas que presenta inhibición aumenta a medida que se incrementa la concentración de antibiótico. Se observa que a partir del tratamiento del antibiótico solo a $2\mu\text{g/mL}$ se comienza a observar inhibición del crecimiento. En contraste, las concentraciones evaluadas de cada tratamiento con polímero solo, no tienen efecto sobre el crecimiento de la bacteria, y todas las réplicas en todas las concentraciones presentaron crecimiento bacteriano, es decir, que los polímeros no inhiben por si solos el crecimiento bacteriano de cada una de las cepas evaluadas. Algunos tratamientos arrojan datos atípicos, donde a mayor concentración de antibiótico se disminuye ligeramente el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano. Estos datos atípicos son atribuibles a errores procedimentales puntuales posiblemente asociados al experimentador.

Para el análisis estadístico se planteó dar un valor uno (1) para la respuesta de inhibición del crecimiento (ausencia de crecimiento) ya que el modelo propone medir la probabilidad de inhibición o muerte de la bacteria y de esta manera observar cómo disminuye su probabilidad de sobrevivir con cada tratamiento (determinando la CIM_{80} y CIM_{100}).

Tabla 8: Resultados prueba de microdilución en caldo para *S. aureus* 25923. A la ausencia de crecimiento observable se le asignó el valor de uno (1) y a la presencia el valor de cero (0), sumando cada punto se obtuvo la cantidad de réplicas con crecimiento.

		<i>S. aureus</i> 25923										
		Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)										
		0	0,0625	0,125	0,25	0,5	2	8	32	128	512	
	Replicas	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Tratamientos	Penicilina G	0	0	0	0	0	13	13	11	16	14	
	PAM18Na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PAM18K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PAM18Na+PG 1.1	0	0	0	0	10	12	10	13	15	16	
	PAM18K+PG 1.1	0	0	0	0	0	13	13	15	16	16	
	PAM18Na+PG 1,5.1	0	0	0	0	0	10	10	16	16	16	
	PAM18K+PG 1,5.1	0	0	0	0	0	1	12	13	16	16	
	PAM18Na+PG 2.1	0	0	0	0	0	9	11	16	16	16	
	PAM18K+PG 2.1	0	0	0	0	0	6	8	6	16	16	

En la anterior tabla se muestran los resultados para la cepa *S. aureus* ATCC 25923. Se puede observar como a medida que aumenta la concentración de antibiótico en cada tratamiento, se observa un incremento en su tasa de inhibición, es decir, el número de réplicas que presenta inhibición incrementa a medida que aumenta la concentración del tratamiento. Se observa que a partir del tratamiento del antibiótico solo a $2\mu\text{g/mL}$ se comienza a observar inhibición del crecimiento. En contraste, las concentraciones evaluadas de cada tratamiento con polímero solo, no tienen efecto sobre el crecimiento de la bacteria, y todas las réplicas en todas las concentraciones presentaron crecimiento bacteriano, es decir, que los polímeros no inhiben por si solos el crecimiento bacteriano de cada una de las cepas evaluadas. Se presentaron de igual forma datos atípicos que en los ensayos para la cepa *S. aureus* ATCC 29213 atribuibles a errores del experimentador.

Este resultado fue inesperado debido a que este comportamiento indica que la cepa es resistente al antibiótico, incluso podría ser más resistente que la cepa *S. aureus* ATCC 29213, lo que no concuerda con la literatura. La cepa *S. aureus* ATCC 29213 presenta un mecanismo de resistencia particular (betalactamasas), pero también presenta los mecanismos exhibidos por la cepa *S. aureus* ATCC 25923, por lo tanto, se supondría, debería ser más resistente. De igual forma se atribuyen estos resultados atípicos a errores procedimentales.

Sin embargo, con esta información se realizó el posterior análisis de los resultados finales.

Tabla 9: Resultados prueba de microdilución en caldo para *S. aureus* 43300. A la ausencia de crecimiento observable se le asignó el valor de uno (1) y a la presencia el valor de cero (0), sumando cada punto se obtuvo la cantidad de réplicas con crecimiento.

		<i>S. aureus</i> 43300										
		Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)										
		0	0,0625	0,125	0,25	0,5	2	8	32	128	512	
	Replicas	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
Tratamientos	Penicilina G	0	0	0	0	0	0	0	0	10	14	
	PAM18Na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PAM18K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	PAM18Na+PG 1.1	0	0	0	0	0	0	0	11	14	16	
	PAM18K+PG 1.1	0	0	0	0	0	0	0	13	15	16	
	PAM18Na+PG 1,5.1	0	0	0	0	0	0	0	11	16	12	
	PAM18K+PG 1,5.1	0	0	0	0	0	0	0	11	11	15	
	PAM18Na+PG 2.1	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	
PAM18K+PG 2.1	0	0	0	0	0	0	0	12	12	15		

En la tabla 9 al igual que en los ensayos anteriores con las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y 25923, se observa que los polímeros por si solos a las concentraciones evaluadas no tienen efecto antimicrobiano sobre el crecimiento bacteriano de la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (en todas las concentraciones y en todas las réplicas presentaron crecimiento bacteriano visible). Con dicha tabla también se puede evidenciar que en todos los tratamientos, las concentraciones de antibiótico a las cuales se comienza a observar la inhibición del crecimiento bacteriano de la cepa *S. aureus* 43300 son mayores a requeridas por las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y 25923. Se muestra para el tratamiento del antibiótico solo, únicamente a partir de la concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$ se comienza a observar inhibición de crecimiento, mientras que para los tratamientos en los cuales los polímeros se asocian al antibiótico, la concentración de este último que causa efectos inhibitorios sobre el crecimiento de la cepa se reduce a 32 $\mu\text{g/mL}$, es decir 75% menos antibiótico respecto al tratamiento control (antibiótico solo), en otras palabras una $\frac{1}{4}$ parte. También se observan valores atípicos atribuibles a errores de experimentación.

Como ya se comentó, para el análisis estadístico se planteó dar un valor uno (1) para la respuesta de inhibición del crecimiento (ausencia de crecimiento) ya que el modelo propone medir la probabilidad de inhibición o muerte de la bacteria y de esta manera observar cómo disminuye su probabilidad de sobrevivir con cada tratamiento (determinando la CIM_{80} y CIM_{100}).

Según los resultados observados en los ensayos de microdilución en caldo (Tablas 7, 8 y 9) los dos polímeros estudiados (solos) no producen inhibición alguna, sobre las cepas objeto de estudio, en las concentraciones evaluadas, es decir, se demuestra que los polímeros solos no tienen efecto antimicrobiano en las concentraciones utilizadas sobre ninguna de las cepas, por lo cual el crecimiento bacteriano depende únicamente del efecto producido por la asociación del

polímero con el fármaco, el cual se puede fijar fácilmente al establecer el efecto del antibiótico solo.

De los resultados obtenidos se aprecia en algunos casos, que a medida que se aumenta la concentración de antibiótico o antibiótico más polímero, varía la tendencia de la inhibición del crecimiento. Lo anterior puede ser atribuido a errores de procedimiento durante el desarrollo de los ensayos. Entre los posibles errores se pueden mencionar la inoculación de la bacteria en un tiempo mayor al establecido en el manual de la CLSI, que puede ocasionar cambios en la concentración del inóculo presente en el medio afectando su viabilidad, lo que origina la variación de los resultados de una réplica a otra. Las fluctuaciones de las tendencias de la CIM obtenidas en los tratamientos donde las concentraciones de antibiótico o antibiótico más polímero son mayores también pueden ser atribuidas a la preparación manual del inóculo (se inoculaban las placas con micropipeta de un solo canal en el menor tiempo posible), debido a que este procedimiento genera algún grado de variabilidad, pero que es inherente al proceso. Otra posible causa de error pudo ser la no consecución de una dispersión completa de los polímeros, el antibiótico o su combinación en la mezcla final (homogenización incompleta al ser inoculada la placa), por lo que no se tendría un sistema, uniforme que afectaría la precisión del ensayo. Por último, se debe tener en cuenta que es un procedimiento manual y extenso que exige una gran capacidad de concentración y que puede implicar equivocaciones propias del experimentador.

Con los resultados obtenidos se realizó el análisis de supervivencia de cada una de las cepas en cada uno de los tratamientos a los cuales fue enfrentada, para ello se utilizó el método estadístico no paramétrico de Kaplan Meier. El modelo es utilizado comúnmente para medir la fracción viviente de una población definida de sujetos en una cierta cantidad de tiempo después de que se aplica un tratamiento (Goel, Khanna, & Kishore, 2010). En este caso la variable independiente (tiempo) se puede intercambiar por el rango de concentraciones evaluado, debido a que es independiente de los ensayos. Este método permite incluir los errores mencionados anteriormente y obtener la probabilidad de supervivencia (o de inhibición) de la bacteria a una concentración aproximada. Se obtiene el producto de las probabilidades de inhibición obtenidas, de cada concentración estudiada y finalmente se grafica una curva de estos valores (eje Y) contra cada concentración (eje X), obteniendo las siguientes graficas (ver fig. 6, 7 y 8).

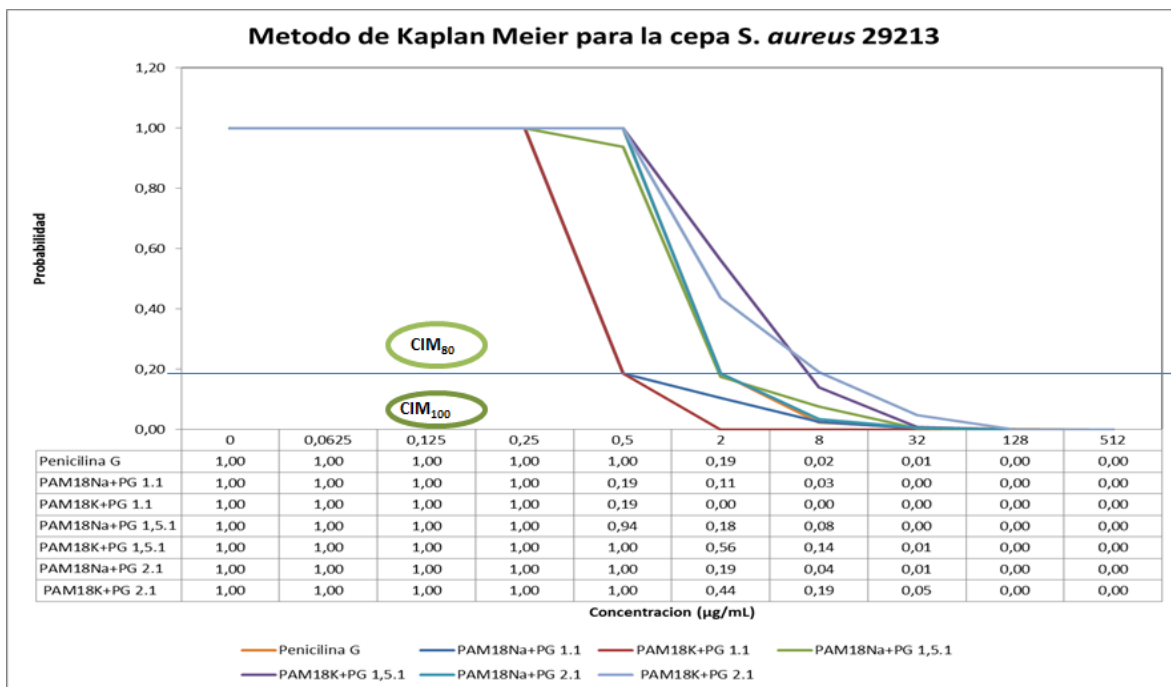


Figura 6: Método Kaplan Meier para la cepa *S. aureus* 29213. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.

La grafica permite apreciar como a medida que aumenta la concentración de antibiótico o antibiótico más polímero la probabilidad de suceder el evento (sobrevivir) es menor. En la gráfica (Figura 6) se puede observar como la cepa *S. aureus* ATCC 29213 (betalactamasa positivo) cuando es enfrentada al antibiótico solo (penicilina G), la probabilidad de sobrevivir disminuye drásticamente (de 1,0 a 0,19, es decir, del 100% al 19%) a una concentración de $2\mu\text{g/mL}$, es decir, que se tiene una probabilidad de 0,81 (o del 80%, CIM₈₀) de alcanzar la inhibición de la bacteria a dicha concentración. También se observa que a una concentración de $128\mu\text{g/mL}$ se alcanza un 100% (CIM₁₀₀) de probabilidad de inhibir el crecimiento bacteriano. Estas CIM's fueron consideradas las iniciales y el patrón de comparación de cada tratamiento. Según los criterios del CLSI una cepa de *Staphylococcus spp.* es sensible a la bencilpenicilina si la CIM es menor o igual que $0,12\mu\text{g/mL}$, y es resistente si la CIM es igual o mayor a $0,25\mu\text{g/mL}$, por lo tanto la cepa *S. aureus* ATCC 29213 es resistente a la penicilina G, que asociado a los resultados obtenidos en las pruebas de producción de betalactamasas, se puede inferir que su mecanismo de resistencia (producción de betalactamasa) funciona eficazmente.

Observando las curvas de los tratamientos del antibiótico asociado a los dos polímeros en proporción 1:1 (PAM-18Na₂+PG 1.1 y PAM-18K₂+PG 1.1) se presenta una disminución clara de la CIM₈₀ de $2\mu\text{g/mL}$ a $0,5\mu\text{g/mL}$ de antibiótico, es decir, una concentración aproximadamente cuatro veces menor, a la conseguida con el antibiótico solo. La CIM₁₀₀ de estos tratamientos también

presenta una reducción de 128µg/mL a solo 32µg/mL de antibiótico con el polímero sódico y de 128µg/mL a 2µg/mL con el polímero potásico. El tratamiento tiene un efecto negativo en las CIM's iniciales, estas CIM's demuestran que los dos polímeros disminuyen la resistencia de la bacteria pero no la convierten en sensible (según los criterios CLSI) en la proporción evaluada. Se puede inferir que la asociación de los polímeros al antibiótico, a una proporción 1 a 1 polímero – antibiótico, aumentan el efecto antimicrobiano sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

Por otro lado, un fenómeno observable en la gráfica anterior es la tendencia de la CIM, cuando se incrementa la proporción del polímero potásico con respecto al antibiótico, se observa que a medida que aumenta dicha proporción disminuye el efecto inhibitorio del antibiótico, es decir, la CIM se consigue a concentraciones más altas de antibiótico. En las dos proporciones evaluadas (PAM-18K₂+PG 1,5:1 y PAM-18K₂+PG 2:1) se observa un aumento de la CIM₈₀ respecto al antibiótico solo, tratamiento tomado patrón de comparación, es decir, la CIM₈₀ se alcanza a una concentración mayor de antibiótico, en otras palabras la actividad antibiótica disminuyó. La CIM₁₀₀ en este caso no sufre cambios. Además de los posibles errores de laboratorio, este hecho puede atribuirse a que el polímero potásico se asocia muy fuertemente al antibiótico a una mayor proporción, haciendo que esté se encuentre menos disponible en el medio, disminuyendo así su actividad.

Los resultados obtenidos en los tratamientos con el polímero sódico, empleando mayor proporción del polímero con respecto al antibiótico (PAM-18Na₂+PG 1,5:1 y PAM-18Na₂+PG 2:1), no mostraron efecto observable sobre la CIM de comparación, por lo que se puede deducir que el polímero sódico en dichas proporciones (2:1 y 1,5:1) parecen tener menor afinidad por el antibiótico, lo que se traduce en una reducción de la actividad de este último respecto al patrón de comparación (antibiótico solo).

Lo anterior permite inferir que los polímeros sódicos a mayor proporción posiblemente no formen la pseudofase, o que lo están haciendo de forma parcial, ocasionando que no se produzca una asociación completa, y se limite o aisle la acción del antibiótico sobre la bacteria.

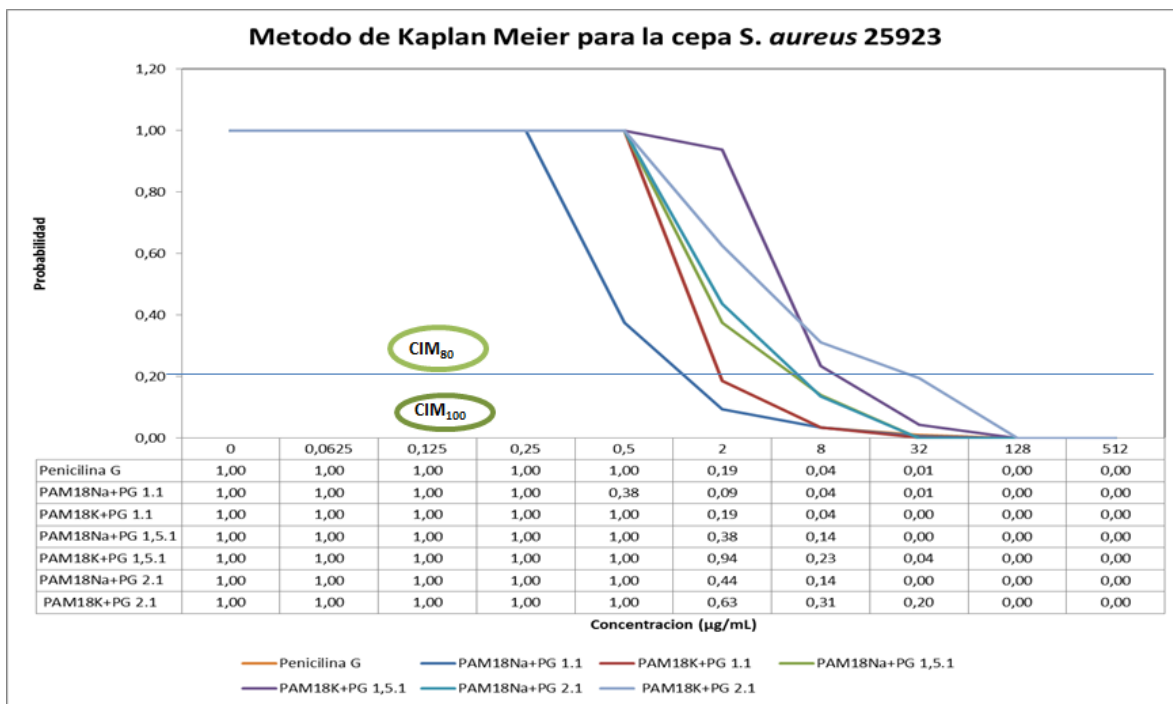


Figura 7: Método Kaplan Meier para la cepa *S. aureus* 25923. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.

Según la gráfica (Figura 7) la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 presenta una CIM₈₀ de 2 $\mu\text{g/mL}$ y una CIM₁₀₀ de 128 $\mu\text{g/mL}$ para el antibiótico solo (resistente según criterios CLSI). Estos valores coinciden con los observados en *S. aureus* ATCC 29213, lo que indica que aunque no produce la enzima, la bacteria es capaz de resistir el ataque del antibiótico, posiblemente por medio de mecanismos diferentes de resistencia (bombas de flujo y porinas) (Berga, 2009; Huet et al., 2008). Estos valores se tomaron como patrón de comparación para los demás tratamientos en esta cepa.

En este caso se observan valores similares de CIM₈₀ y CIM₁₀₀ para el tratamiento del antibiótico asociado al polímero potásico en proporción 1:1 (PAM-18K₂+PG 1.1) con respecto al tratamiento con antibiótico solo (2 $\mu\text{g/mL}$ y 128 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente), lo que significa que, al parecer, el polímero potásico no potencia la acción antimicrobiana de la bencilpenicilina. En contraste cuando se emplea el polímero sódico en proporción 1:1 (PAM-18Na₂+PG 1.1) se puede percibir un efecto. En este tratamiento se puede destacar que aunque no se determina la CIM₈₀ de forma exacta, si se puede establecer la CIM₆₀ y CIM₉₀, que corresponden a 0,5 y 2 $\mu\text{g/mL}$ de antibiótico respectivamente, por lo tanto el valor de la CIM₈₀ se encuentra entre estas dos concentraciones, lo que significa que existe un efecto del tratamiento, disminuye la CIM con respecto al patrón así que aumenta la actividad del antibiótico de este tratamiento con respecto al antibiótico solo. La CIM₁₀₀ disminuye de 128 $\mu\text{g/mL}$ a 32 $\mu\text{g/mL}$, un cambio evidente en la concentración de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento, es decir

aumenta la actividad del antibiótico de este tratamiento con respecto al antibiótico solo.

En el tratamiento del polímero sódico con antibiótico en proporción 1,5:1 (PAM-18Na₂+PG 1,5.1) igual que en el tratamiento anterior no se puede determinar la CIM₈₀, pero se puede establecer la CIM₆₀ que corresponde a 2µg/mL y la CIM₉₅ que corresponde a 8µg/mL, lo que indica que la CIM₈₀ es mayor a 2µg/mL y menor a 8µg/mL. Lo anterior sugiere un efecto positivo del tratamiento, es decir, disminución de la actividad del antibiótico respecto al antibiótico solo. Para el polímero potásico en la misma proporción (PAM-18K₂+PG 1,5.1) se evidencia una CIM₈₀ de 8µg/ml, esto indica un efecto del tratamiento que disminuye la actividad del antibiótico respecto al antibiótico solo. La CIM₁₀₀ no permitió comparar los efectos al encontrarse algunos valores atípicos posiblemente asociados a errores del experimentador como los que se mencionaron anteriormente.

Por último se presenta que el polímero sódico - antibiótico en proporción 2:1 (PAM-18Na₂+PG 2.1) expone valores de CIM₆₀ y CIM₉₅ entre 2 y 8µg/mL lo que advierte que la CIM₈₀ se encuentra por encima de 2µg/mL y por lo tanto exhibe un aumento de la CIM y con ello una disminución de la actividad antimicrobiana con respecto al patrón (antibiótico solo). El polímero potásico en la misma proporción (PAM-18K₂+PG 2.1) produjo una CIM₈₀ de 32µg/mL lo que muestra un aumento en la CIM importante y una alta disminución de la actividad antimicrobiana con respecto al patrón.

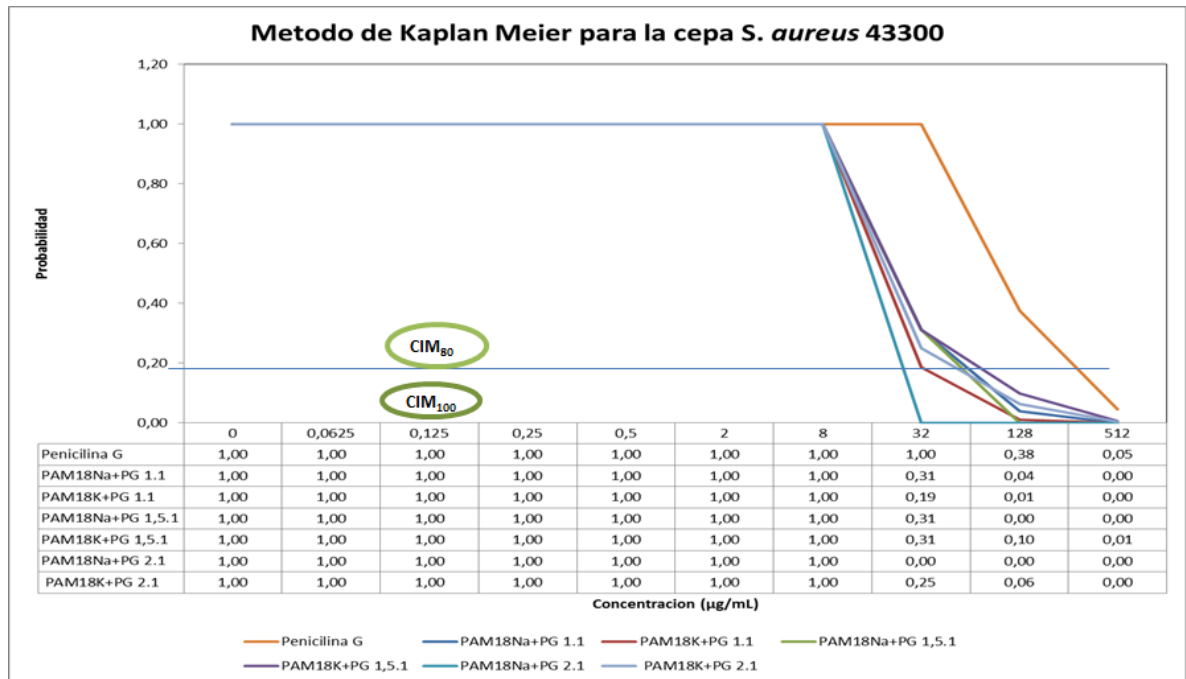


Figura 8: Método Kaplan Meier para la cepa *S. aureus* ATCC 43300. Donde en el eje Y se encuentra la probabilidad que va de cero a uno, y en el eje X las concentraciones de cada tratamiento estudiadas.

En la gráfica anterior (Figura 8) se nota una diferencia clara en las tendencias que exhiben los tratamientos en los cuales se asocia el antibiótico al polímero, con respecto al tratamiento con bencilpenicilina sola. En este último se producen las CIM₈₀ y CIM₁₀₀ a mayores concentraciones de antibiótico, que cuando el antibiótico se asocia al polímero. Cuantitativamente el valor de CIM₈₀ del antibiótico solo se encuentra entre 128µg/mL y 512µg/mL, mientras que los valores de los demás tratamientos se encuentran por debajo de 128µg/mL lo cual indica claramente una disminución de la CIM₈₀ y un aumento de la actividad antibiótica con respecto al patrón, producido por la asociación del polímero (se necesita menos antibiótico - polímero para alcanzar la misma probabilidad de inhibición del 80%). La CIM₁₀₀ del antibiótico solo en esta cepa es mayor a 512µg/mL, por lo tanto es mayor a todos los demás valores de CIM₁₀₀ de los tratamientos donde se asocia el polímero y el antibiótico.

Para analizar la información en conjunto de una forma más precisa sobre los resultados finales los datos obtenidos se organizaron y se compilaron en la siguiente tabla (Tabla 10) y se amplía en el anexo 4.

Tabla 10: Datos obtenidos de la prueba de microdilución en caldo para las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, 25923 Y 43300. Donde el signo “-” significa que la CIM disminuyo (con respecto al antibiótico solo), el “+” que la CIM aumento (con respecto al antibiótico solo) y la “N” sin efecto (la CIM no tuvo cambio). El N/A muestra que no se observó efecto sobre la CIM.

Tratamiento	Efecto en la cepa <i>S. aureus</i>					
	29213		25923		43300	
CIM	80	100	80	100	80	100
PAM18Na+PG 1.1	-	-	-	-	-	-
PAM18K+PG 1.1	-	-	N	N	-	-
PAM18Na+PG 1,5.1	N	N	+	N/A	-	-
PAM18K+PG 1,5.1	+	N	+	N/A	-	-
PAM18Na+PG 2.1	N	N	+	N/A	-	-
PAM18K+PG 2.1	+	N	+	N/A	-	-

En La tabla anterior (Tabla 10) se muestra el efecto de cada tratamiento en cada CIM seleccionada (CIM₈₀ y CIM₁₀₀). Las cepas evaluadas (*S. aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300) exhibieron una disminución de la CIM, es decir, se requiere una menor concentración de antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano cuando se utiliza el polímero PAM-18Na₂ asociado al antibiótico, a una proporción 1:1, que cuando se utiliza el antibiótico solo. Al parecer la asociación del polímero con el antibiótico aumenta la actividad de este último. Las tres cepas bacterianas presentan diferentes mecanismos de resistencia, sin embargo, este tratamiento produce un efecto similar en todas tres, por lo tanto se puede inferir que dicho efecto esta posiblemente relacionado con la disponibilidad del fármaco debido a la asociación con el polímero.

En la tabla también se permite visualizar que para el segundo tratamiento con el polímero potásico y el fármaco en proporción 1:1 se produjo una disminución de la CIM, es decir, se requiere una menor concentración de antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano cuando se utiliza el polímero PAM 18K y el antibiótico, a una proporción 1:1, que cuando se utiliza el antibiótico solo. Al parecer la asociación del polímero con el antibiótico aumenta la actividad de este último en las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y 43300. Sin embargo, en la cepa betalactamasa negativo (*S. aureus* ATCC 25923) no se evidencia un efecto sobre la CIM, es decir, la concentración de antibiótico requerida para inhibir el crecimiento bacteriano en el tratamiento antibiótico- polímero potásico (proporción 1:1) es la misma que requirió cuando se enfrentó la bacteria al antibiótico solo. A partir de esto se podría decir que el polímero potásico aumenta la disponibilidad del antibiótico protegiéndolo de la acción de las enzimas betalactamasas debido a que solo se observa efecto sobre la actividad del fármaco en las cepas betalactamasa positivos (*S. aureus* ATCC 29213 y 43300) y no en la cepa donde se encuentran ausentes dichas enzimas. En la cepa *S. aureus* ATCC 25923, como los mecanismos de resistencia están asociados a procesos diferentes a la producción de la enzima, el polímero no potencia el efecto del fármaco, es decir, la disponibilidad del antibiótico será la misma cuando este se utiliza solo y cuando se combina con el polímero potásico. Lo que sucede posiblemente en la cepa *S. aureus* ATCC 43300 (donde además posee un mecanismo adicional al de las enzimas) es que debido a que el polímero reduce o inhibe la acción de las betalactamasas, se incrementa la concentración de antibiótico disponible, saturando las PBP's modificadas y afectando las PBP's no modificadas presentes en la bacteria, lo que se traduce en un aumento de la actividad del antibiótico (Llarrull et al., 2009).

Los dos polímeros a las proporciones 1,5:1 y 2:1 posiblemente reducen la disponibilidad del antibiótico, y por ende su tasa de penetración, lo que se traduce en una reducción de su actividad en las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y 25923. Para explicar los resultados conseguidos en la cepa *S. aureus* ATCC 43300, donde se aprecia un aumento de la actividad del antibiótico al asociarse al polímero en estas proporciones, se sugiere la realización de nuevas investigaciones dirigidas a esclarecer el mecanismo de interacción fármaco - polímero y a su vez la interacción del complejo con la bacteria, y dar así una justificación precisa de este comportamiento. En el cuadro comparativo del anexo 4 se puede apreciar un resumen de los resultados encontrados y el análisis realizado para cada uno de ellos.

Los polímeros anfífilicos estudiados (PAM-18 K₂ y Na₂) si tienen efecto sobre la actividad antimicrobiana del antibiótico betalactámico cuando se encuentran asociados, y este efecto depende tanto de la proporción fármaco – polímero como de los mecanismos de resistencia presentes en la bacteria. El efecto encontrado en la proporción 1:1 del polímero sódico permite inferir que no es dependiente de los mecanismos de resistencia bacterianos, si no de la disponibilidad del fármaco

de acuerdo a la asociación con el polímero. En contraste el efecto evidenciado con el polímero potásico, al parecer si depende del mecanismo de resistencia proferido por la producción de enzimas betalactamasas y de la disponibilidad del fármaco. Sin embargo es necesario conocer el mecanismo de asociación exacto de los polímeros con el antibiótico penicilina G para poder justificar correctamente cada uno de los resultados obtenidos.

En la práctica el hecho de que el polímero disminuya la CIM de un antibiótico y por lo tanto aumente su actividad se puede tomar como un pequeño, pero importante aporte en pro de mejorar la capacidad de combatir enfermedades infecciosas, aunque no se debe olvidar que, según la CLSI, el efecto producido por la interacción fármaco – polímero evidente no convierte a la bacteria en susceptible al antibiótico.

CONCLUSIONES

- La prueba límite de zona y la prueba cromogénica son pruebas útiles y sencillas para determinar la producción de enzimas Betalactamasas. Por medio de estas pruebas se determinó la producción de enzimas betalactamasas en la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 y 43300.
- A través de la técnica de microdilución en caldo se cuantificó la actividad antimicrobiana de la bencilpenicilina en las cepas utilizadas. Se determinó que las tres cepas ATCC 25923, 29213 y 43300 son resistentes al antibiótico.
- Por medio de la técnica de microdilución en caldo se comprobó que los polímeros PAM-18Na₂ y PAM-18K₂ solos no tienen efecto antimicrobiano a las concentraciones evaluadas sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300.

La asociación de los polímeros anfifílicos (PAM-18 Na₂ y PAM-18 K₂) a la bencilpenicilina afecta de diferentes formas su actividad antimicrobiana en las cepas de *S. aureus* ATCC 29213, 25923 y 43300, dichos efectos dependen de la proporción fármaco – polímero y de los mecanismos de resistencia de la bacteria.

- Los polímeros PAM-18 K₂ en proporción 1:1 con la bencilpenicilina potencia su actividad antimicrobiana, posiblemente ejerce un efecto bioprotector, que evita la acción de enzimas betalactamasas, y aumenta su disponibilidad en el sitio de acción.
- El incremento de la proporción fármaco – polímero modifica su mecanismo de asociación y por lo tanto, disminuye la capacidad de protección del antibiótico.
- La asociación fármaco – polímero aunque no convierte en susceptibles a las cepas de *S. aureus* evaluadas (ATCC 29213, 25923 y 43300), en algunas de las proporciones evaluadas se observa como potencia notablemente el efecto antimicrobiano de la bencilpenicilina.

RECOMENDACIONES

- La prueba acidimétrica debe realizarse bajo unas condiciones específicas para que ofrezca resultados confiables. La técnica no brindó resultados precisos debido a que no se pudieron utilizar los mismos parámetros de los ensayos reportados en la literatura.
- El modelo estadístico no paramétrico de Kaplan Meier es un método que permite analizar los resultados obtenidos en la prueba de microdilución de una manera práctica incluyendo los posibles errores experimentales.
- Para incrementar el porcentaje de certeza de los resultados se recomienda realizar los ensayos con un número de réplicas mayor, de esta manera podría deducirse mayor información del universo estudiado.

Se recomienda realizar estudios adicionales que permitan conocer de forma precisa el mecanismo de asociación de los polímeros al antibiótico, para así poder explicar el efecto producido por este complejo.

- Realizar estudios de estabilidad del complejo fármaco - polímero en el medio acuoso utilizado bajo las condiciones de la técnica de microdilución en caldo para poder dar una respuesta más precisa de los mecanismos involucrados en los resultados obtenidos.
- Determinar la capacidad de formación de la pseudofase, formada por los polímeros en las diferentes proporciones, con el antibiótico.
- Determinar el efecto fisicoquímico - biológico que pueda ejercer el contra-ion de la sal polimérica sobre el desempeño de esta interacción.

REFERENCIAS

- Abeylath, S. C., & Turos, E. (2008). Drug delivery approaches to overcome bacterial resistance to beta-lactam antibiotics. *Expert opinion on drug delivery*, 5(9), 931–949. doi:10.1517/17425247.5.9.931
- 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.
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of Resistance: *Staphylococcus aureus* in the Antibiotic Era. *Nature reviews. Microbiology*, 7(9), 629–641. doi:10.1038/nrmicro2200

- Chen, L. F., & Kaye, D. (2011). Current Use for Old Antibacterial Agents: Polymyxins, Rifamycins, and Aminoglycosides. *Medical Clinics of North America*, 95(4), 819–842. doi:10.1016/j.mcna.2011.03.007
- 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 ESTANDARDS INSTITUTE. Retrieved from 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.
- Garza-González, E., & Dowzicky, M. J. (2013). Changes in Staphylococcus aureus susceptibility across Latin America between 2004 and 2010. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 17(1), 13–19. doi:10.1016/j.bjid.2012.08.017
- 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.
- Goel, M. K., Khanna, P., & Kishore, J. (2010). Understanding survival analysis: Kaplan-Meier estimate. *International Journal of Ayurveda Research*, 1(4), 274–278. doi:10.4103/0974-7788.76794

- Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Isturiz, R., Alvarez, C., Bavestrello, L., Gotuzzo, E., ... Seas, C. (2009). Epidemiology of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(4), 304–308. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.06.005
- Haveri, M., Suominen, S., Rantala, L., Honkanen-Buzalski, T., & Pyörälä, S. (2005). Comparison of phenotypic and genotypic detection of penicillin G resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infection. *Veterinary Microbiology*, 106(1–2), 97–102. doi:10.1016/j.vetmic.2004.12.015
- Huet, A. A., Raygada, J. L., Mendiratta, K., Seo, S. M., & Kaatz, G. W. (2008). Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple in vitro exposures to biocides and dyes. *Microbiology*, 154(10), 3144–3153. doi:10.1099/mic.0.2008/021188-0
- Livermore, D. M., & Brown, D. F. J. (2001). Detection of β -lactamase-mediated resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl 1), 59–64. doi:10.1093/jac/48.suppl_1.59
- 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. doi:10.1056/NEJM199808203390806

- Lowy, F. D. (2003a). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273. doi:10.1172/JCI18535
- Lowy, F. D. (2003b). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273. doi:10.1172/JCI200318535
- Marín, M., & Guidol, F. (2003). Antibióticos betalactámicos. *01*, 21, 42–55.
- 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
- Olsen, J. E., Christensen, H., & Aarestrup, F. M. (2006). Diversity and evolution of bla_Z from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(3), 450–460. doi:10.1093/jac/dki492

- OMS. (2005). *Manual De Bioseguridad En El Laboratorio*. World Health Organization.
- Perazzi, B., Camacho, M., Bombicino, K., Flores, Z., Vay, C., & Famiglietti, A. (2010). Staphylococcus aureus: nuevos y antiguos antimicrobianos. *Revista argentina de microbiología*, 42(3), 199–202.
- Pitkala, A., Salmikivi, L., Bredbacka, P., Myllyniemi, A.-L., & Koskinen, M. T. (2007). Comparison of Tests for Detection of β -Lactamase-Producing Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(6), 2031–2033. doi:10.1128/JCM.00621-07
- 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>
- Rodríguez, J. A. G., Rafael Cantón, J. Elías Sánchez, M^a Luisa Gomez-Lus, Luis Martínez Martínez, Carmen Rodríguez-Avial, & Jordi Vila. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Retrieved from <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/>
- 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

- 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. Retrieved from http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2007/salamanca_c/sources/salamanca_c.pdf
- Salamanca C. H., Barraza, R. G., Acevedo, B., & Olea, A. F. (2007). Hydrophobically modified polyelectrolytes as potential drugs reservoirs of n-alkyl-nitroimidazoles. *J. Chil. Chem. Soc.*, 52(1), 1115–1119. doi:10.4067/S0717-97072007000100014
- 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, 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
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6, Supplement 1), S3–S10. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011
- 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

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.

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