

Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos *in vitro*

Pilar Meléndez*, Jorge Díaz*, Edelberto Silva*, Pedro González, Eva Moreno, Pablo Amaya, Numael Serrato y Edgar Sáenz

Resumen

En este trabajo, se desarrollaron bioensayos para la valoración de ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, ampicilina/sulbactam e imipenem/cilastatina. Se pudo establecer un único microorganismo (esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633) para la ejecución del bioensayo. El rango de concentración que tiene la mejor correlación dosis-respuesta es propio de cada antibiótico, al igual que las condiciones del ensayo (pH de la solución de antibiótico, pH de medio de cultivo, tiempo de incubación). Con los bioensayos validados se hizo un estudio de comparación de muestras de productos innovadores, genéricos de marca y genéricos, que dio como resultado que presentan la misma actividad antimicrobiana *in vitro*, además de confirmar que son equivalentes farmacéuticos.

Palabras clave: antibióticos - actividad antimicrobiana - bioensayos

Summary

Comparative study of the antimicrobial activity of several marketed antibiotic drugs for intravenous administration by *in vitro* methods

In this paper, the valuation bioassays for ceftriaxone, cefotaxime, ceftazidime, ampiciline/sulbactam and imipene/cilastatine were developed. Only one microorganism (*Bacillus subtilis* ATCC 66 33 spores) was established to perform the bioassay. The concentration range that has the better correlation doses - answer is characteristic of each antibiotic, like the bioassay conditions (antibiotic solutions pH, media culture pH, incubation time). A comparative study of samples from generic, innovating and trade mark products of these antibiotics, with the validated bioassays, shown that all the samples have the same antimicrobial activity *in vitro*, and confirm that they are pharmaceutical equivalents.

Key words: antibiotics - antimicrobial activity - bioassays

Introducción

En las últimas décadas se ha visto a nivel global, manifestación de resistencia de varios microorganismos patógenos frente a las sustancias anti-

microbianas, que hasta hace algunos años eran sensibles; probablemente debido al uso indiscriminado e irracional de estas sustancias (1,2).

Recibido para evaluación: octubre 20 de 2005
Aceptado para publicación: noviembre 22 de 2005

* Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, AA.14490, Bogotá D.C., Colombia. E-mail: esilvag@unal.edu.co

Según la Organización Mundial de la Salud (1) se debe a diversos factores como son la falta de conocimiento por parte del prescriptor acerca de que es la resistencia a los antimicrobianos, lo cual juega un papel muy importante en la prescripción irracional de antimicrobianos. También está, el diagnóstico inadecuado o enteramente ausente, que da lugar al uso de una gran cantidad de antimicrobianos para combatir “una posible infección”. Adicionalmente, la incorrecta selección del medicamento, dosis/ruta/duración incorrectamente formulados, prescripción en respuesta a la presión de los pacientes, ganancias financieras, respuesta a presiones promocionales, en donde se ha reconocido que para los prescriptores las principales fuentes de información sobre medicamentos son los visitantes médicos o publicaciones comercialmente orientadas.

En Colombia la situación es muy compleja, dado que no existe ningún tipo de mecanismo de control serio para el manejo de sustancias con actividad antimicrobiana, que en su gran mayoría se expenden sin fórmula médica, lo cual se constituye en una bomba de tiempo no solo porque descompensa el equilibrio Costo-Beneficio del Sistema Nacional de Salud a nivel de instituciones prestadoras de salud, sino también que a largo plazo genera un daño muy grave a la salud pública.

A esto se suma la incertidumbre presente por parte de los usuarios, sobre si la calidad de un antimicrobiano genérico sea igual, mayor o menor eficacia que su equivalente con marca registrada o viceversa. Se tiene la creencia que “entre más costoso el producto este es más eficaz” (creencia compartida por algunos prescriptores y dispensadores), que da lugar a uso innecesario de los antibióticos de última generación, que en realidad son más costosos, de mayor espectro, que promueve la selección de microorganismos resistentes a estos medicamentos, y que al final terminan en gastos en exceso, sin beneficio real (1).

Dentro del mito “más costoso más eficaz” se pueden poner los productos innovadores y de marca frente a los genéricos, pues se tiene la creencia de que genérico, por ser más económico, es significado de mala calidad y por ende ineficacia. Para todos los medicamentos (genéricos o de marca) y especialmente los antibióticos, su eficacia y seguridad son cualidades infaltables, dado que en el caso contrario, se pone en riesgo la salud del paciente. Para despejar las dudas, debemos evaluar el comportamiento de estas sustancias tanto *in vitro* como *in vivo* para certificar la idoneidad de los productos empleados para las terapias indicadas.

En cuanto a los grandes usuarios de los antimicrobianos (hospitales en particular) es importante que tengan un marco de referencia con respecto a la calidad de los productos que adquiere, dado que los agentes antimicrobianos se constituyen la mayoría de veces, en un porcentaje considerable dentro del costo total del inventario. Para verificar el desempeño de los antibióticos las instituciones pueden implementar metodologías de análisis que se pueden realizar con la infraestructura presente en cualquier laboratorio de microbiología clínica, que les permitiría corroborar o desmentir las innumerables dudas planteadas.

Para la valoración de antimicrobianos se tiene metodologías referenciadas por los organismos de control y vigilancia. Algunas se evalúan por técnicas instrumentales como la cromatografía líquida de alta eficiencia (ceftazididima, ceftriaxona, cefotaxima, etc.) o mediante el uso de bioensayos con microorganismos (amikacina, vancomicina, penicilina, etc.)(3). Cuando la sustancia a estudiar se valora oficialmente por método instrumental y se desea implementar un bioensayo, se tienen que tomar en consideración factores como la selección del microorganismo, el rango de concentración, el medio de cultivo, la temperatura de incubación, el tiempo de incubación, entre

muchos otros factores que pueden influir sobre el resultado final del bioensayo (4, 5). Por último, una vez establecida la metodología se debe proceder a su validación como técnica bioanalítica para obtener resultados confiables (3, 4).

En cuanto a la validación de los ensayos de valoración por difusión en gel, que es el modelo desarrollado en esta investigación, se tienen que estudiar parámetros como especificidad, sensibilidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad), rango, linealidad, exactitud, robustez, estabilidad y quiralidad (6-9). En el presente trabajo se estudiaron los criterios de rango, linealidad, precisión (repetibilidad), estabilidad y especificidad, dadas las características del estudio y las limitaciones del laboratorio.

La valoración de sustancias antimicrobianas empleando bioensayos con microorganismos es una alternativa viable, confiable, sencilla en su aplicación e interpretación, y desarrollada a un bajo costo. Esta metodología permite hacer valoraciones individuales o comparativas de la actividad antimicrobiana y relacionarla con el contenido o potencia del producto investigado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. En este trabajo nos propusimos desarrollar bioensayos con microorganismos para sustancias como ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, ampicilina sulbactam e imipenem. Las metodologías desarrolladas y validadas se emplearon para realizar un estudio comparativo de productos comerciales de estas sustancias en las que se incluyen el innovador y productos afines de marca o genéricos.

Materiales y Métodos

Microorganismos: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 29737 y 6538p, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25619 y 9027, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 10536, y *Klebsiella pneumoniae* ATCC

10031. Todos los microorganismos fueron activados en caldo Mueller Hinton a 35°C por 24 horas, luego se replica en agar Mueller Hinton para obtener colonias aisladas incubando a 35°C por 24 horas. Con las colonias aisladas se hacen repiques masivos sobre cuñas de agar Mueller Hinton con 1% p/v de glicerol y sobre cajas de agar Mueller Hinton. Los tubos en cuña, luego de incubados, se conservan en refrigeración para tener cultivos de trabajo. De las cajas de agar se cosechan los microorganismos con solución crioprotectora para conservar las cepas a -20°C.

Medio de Cultivo y Reactivos: Agar antibiótico No 1 y No 11 (Merck), Agua peptonada buferizada (Merck), KH₂PO₄ (Merck), K₂HPO₄ (Merck), agua estéril para inyección, estándares USP de ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, ampicilina, sulbactam imipenem, y cilastatina. Productos comerciales de los anteriores antibióticos adquiridos en las farmacias de diferentes hospitales o agentes comercializadores, de la ciudad de Bogotá D. C.

Bioensayo: Inóculo: De los cultivos conservados en cuñas, los microorganismos se repican en agar Mueller Hinton por agotamiento para obtener colonias aisladas. Se toma una colonia y se cultiva en forma masiva sobre agar antibiótico No. 1 y se incuba a 35°C por 24 horas. En el caso de *B. subtilis* el medio es suplementado con MnSO₄ (0.03%) e incubado por al menos 5 días para obtener esporas. Los microorganismos se cosechan con buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0 ± 0.1 estéril. A partir de esta suspensión concentrada de microorganismos se prepara con el mismo buffer una suspensión de 25% de transmitancia medida a 600 nm. Soluciones stock y diluciones de los antibióticos: Ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, se disolvieron en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0 ± 0.1 a una concentración de 1000 µg/mL 0.1 M. El imipenem se disolvió en el mismo buffer pero a una concentración de 3 mcg/mL.

La mezcla ampicilina sulbactam en buffer fosfatos 0.1 M pH 8.0 ± 0.1 a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Ampicilina y 500 $\mu\text{g/mL}$ de Sulbactam. Bioensayo: Colocar de manera equidistante en cajas de petri, de 15 cm de diámetro, diez cilindros de acero de los empleados para la valoración de antibióticos. Verter despaacio 60 mL de agar antibiótico No. 1 fundido ($48 - 50^\circ\text{C}$) estéril, previamente inoculado con 0.600 mL de suspensión de microorganismo (25 %T). Dejar solidificar y con ayuda de una pinza estéril retirar los cilindros de acero. Agregar en los pozuelos formados 0.100 mL de cada una de las diluciones de sustancia antimicrobiana a estudiar. Dejar en predifusión por 30 minutos e incubar las cajas a 35°C el tiempo requerido. Medir los halos de inhibición formados con un calibrador.

Análisis Estadístico (3, 5-7, 10). Las correlaciones entre dosis y respuesta se realizaron mediante el ajuste por mínimos cuadrados. Las pruebas de hipótesis para linealidad y regresión se hicieron por análisis de varianza. La precisión para el mismo día y entre días mediante estadístico t. Todos los cálculos se realizaron haciendo uso de la hoja de cálculo MS Excel® en ambiente MS Windows®.

Resultados y Discusión

En este trabajo se desarrollaron varias técnicas de valoración de potencia de los antibióticos ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima, ampicilina-sulbactam e imipenem. Según la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXV) estos productos se cuantifican por cromatografía líquida de alta eficiencia, por lo tanto el establecimiento de la técnica de valoración y su validación se realizó de acuerdo al siguiente esquema:

- 1- Determinación del microorganismo modelo más adecuado, que permitiera obtener halos de inhibición bien definidos.
- 2- Sistema de concentraciones a trabajar (Rango), para obtener halos de inhibición bien definidos y de un diámetro adecuado.
- 3- Condiciones del ensayo: Tiempo de óptimo de lectura de los halos formados, pH de soluciones, pH del medio de cultivo.

Estas variables fueron evaluadas experimentalmente de forma simultánea, en la medida que se desarrollo cada uno de los pasos exigidos por el ensayo biológico, usando una muestra del antibiótico estándar de referencia.

Una vez se estandarizaron las variables que influenciaban la respuesta, en el método de difusión en gel, se procedió a validar la Metodología analítica con respecto a los atributos validables para el tipo de muestra: Rango, linealidad, precisión (al nivel de repetibilidad), especificidad y estabilidad

Determinación del Microorganismo

Modelo

Los microorganismos utilizados se seleccionaron teniendo en cuenta los reportes bibliográficos (3, 8) de sensibilidad frente a las moléculas en estudio. Para este ensayo se prepararon diluciones de los diferentes antibióticos entre 1000 y 1.9531 mcg/mL en diluciones seriadas 1:1. Para el imipenem las dosis fueron realizadas a partir de una concentración de 3 mcg/mL . Los criterios de evaluación fueron: halo de inhibición de bordes nítidos, diámetro no superior a 30 - 35 mm, no producir mutantes espontáneos que se manifiestan como formación de colonias independientes dentro de los halos de inhibición, frente a las diferentes diluciones del antibiótico (3, 4).

Ceftriaxona: De las pruebas hechas con *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25938 y

6538p, los mejores resultados en cuanto a los criterios de selección se vieron con esporas de *B. subtilis*. Cuando se hizo este trabajo solo se disponían de estas cepas en el laboratorio (11).

Cefotaxime: Frente a *P. aeruginosa* ATCC 25619 y 9027 se presentaron respuestas bien definidas entre 1000 y 62.5 mcg/mL con halos menores a 25 mm. Con *M. luteus* ATCC 9341 los halos no son medibles por su alta sensibilidad, lo que hace necesarios el uso de diluciones muy altas. Utilizando *S. aureus* ATCC 29737 y 6538p vemos formación de doble halo de 35 mm o 25 mm o menos dependiendo del halo medido. Empleando *E. coli* ATCC 10536 se ven halos definidos, pero de la concentración de 62.5 mcg/mL hacia abajo se observa aparición de colonias dentro del halo de inhibición, indicativo de inducción de mutantes espontáneos de resistencia. Con *K. pneumoniae* ATCC 10031 los halos presentaron bordes difusos que no permiten delimitarlo para una correcta medición. Por último, frente a esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 se logró una respuesta que cumplía con todas las exigencias, por lo que fue seleccionado como modelo biológico para la valoración (12).

Ceftazidima: Empleando *P. aeruginosa* ATCC 25619 y 9027 se presentó doble halo de inhibición y solo hay respuestas hasta las dosis de 32, 25 y 62.5 mcg/mL. Con *M. luteus* ATCC 9341 los halos son de borde difuso y no se pueden medir por la alta sensibilidad del microorganismo, lo que hace necesarios el uso de diluciones muy altas. Utilizando *S. aureus* ATCC 29737 y 6538p vemos formación de doble halo de inhibición lo cual lo hace inapropiado para el ensayo. Empleando *E. coli* ATCC 10536 se ven halos definidos, pero de la concentración de 125 mcg/mL hacia abajo se observa aparición de colonias dentro del halo de inhibición, indicativo de inducción de mutantes espontáneos de resistencia. Con *K. pneumoniae* ATCC 10031 se

presenta doble halo de inhibición, uno externo difuso y otro interno bien definido hasta la concentración de 32.25 mcg/mL. Por último, frente a esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 se logró una respuesta que cumplía con todas las exigencias, por tanto fue seleccionado como modelo biológico para la valoración (15).

Ampicilina/Sulbactam: Utilizando *P. aeruginosa* ATCC 25619 y 9027 se presentó respuesta bien definida entre 1000 y 62.5 mcg/mL con halos menores a 25 mm, lo cual los hace excelentes candidatos como modelos de ensayo. Con *M. luteus* ATCC 9341 los halos no son medibles por su alta sensibilidad, lo que hace necesarios el uso de diluciones muy altas. Utilizando *S. aureus* ATCC 29737 y 6538p vemos formación de doble halo de 35 mm o 25 mm hacia abajo dependiendo del halo medido. Empleando *E. coli* ATCC 10536 se ven halos definidos pero de la concentración de 62.5 mcg/mL hacia abajo se observa aparición de colonias, indicativo de inducción de mutantes espontáneos resistentes. Con *K. pneumoniae* ATCC 10031 los halos presentaron bordes difusos que no permiten delimitarlo para una correcta medición. Por último, frente a esporas de *B. subtilis* ATCC 6633 se logró una respuesta que cumplía con todas las exigencias. Este último es seleccionado modelo biológico para la valoración, por ser un microorganismo más seguro (no patógeno) y de más fácil manipulación y conservación en forma de esporas (13).

Imipenem/Cilastatina: Cuando se utilizó como modelos biológicos *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 29737 y 6538p los halos no son medibles por que todos presentaron una muy alta sensibilidad. El comportamiento de los modelos *E. coli* ATCC 10536 y *K. pneumoniae* ATCC 10031 mejoró presentando halos medibles pero de borde difuso, lo que los hace inapropiados para ser utilizados en una técnica de valoración. Con *P. aeruginosa* ATCC 25619 y

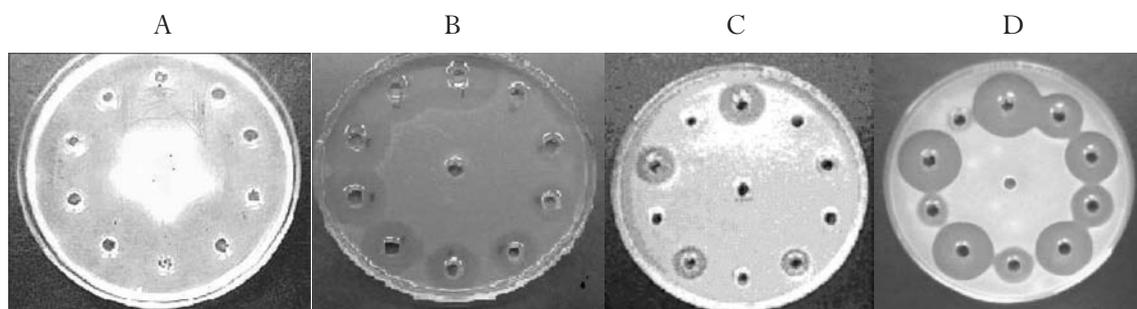


Figura 1. Los ensayos corresponden a imipenem con diluciones seriadas 1:1 desde 3 mcg/mL frente a (A) *M. luteus* ATCC 9341, (B) *E. coli* ATCC 10536, (C) *P. aeruginosa* ATCC 25619, y (D) *B. subtilis* ATCC 6633 (14)

9027 hubo respuesta hasta la cuarta dilución, con halos bien definidos. Esto quiere decir que se requieren dosis de mayor concentración. Como en los casos anteriores con *B. subtilis* ATCC 6633 se logró una respuesta que cumplía con todas las exigencias, por lo que fue seleccionado como modelo biológico para la valoración. Adicionalmente, desde el punto de vista de la bioseguridad del operario el *B. subtilis* es un microorganismo más apropiado (14). En la figura 1 vemos el porque *B. subtilis* fue el microorganismo elegido para el desarrollo de la valoración de los antibióticos en estudio.

De aquí se puede confirmar la importancia de realizar una acertada selección de modelo microbiano para obtener la respuesta adecuada: halos bien definidos, de diámetros no superiores a 30-35 mm y un adecuado balance dosis respuesta que más adelante se evaluará. Se esperaba en primera instancia definir un modelo microbiano por antibiótico, sin embargo los resultados nos permitieron ajustar las evaluaciones por un solo

modelo, el *B. subtilis* ATCC 6633, que para efectos prácticos, permite a un laboratorio economía en recursos y esfuerzos para establecer métodos microbiológicos. Otra inquietud sería la posibilidad de problemas difusionales de los antibióticos en el medio de cultivo. En los ensayos con *M. luteus* se vio claramente que se obtenían respuestas enormes lo que indica de un lado la alta sensibilidad del microorganismo, pero de otra parte que el antibiótico difunde casi libremente.

Determinación de pH, Tiempo de Lectura y Rango de Concentración (11-15)

Se examinaron 10 dosis desde 1000 mcg/mL hasta 1,9531 (Tabla 1) obtenidas en diluciones seriadas 1:1. Adicionalmente se evaluó el efecto del pH del medio de cultivo y el tiempo de incubación para realizar la lectura de los halos.

Ceftriaxona (11): El estándar es disuelto en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.0 y el pH del medio

Tabla 1. Rango de concentraciones

(1)	(2)	C(3)	C(4)	C(5)	C(6)	C(7)	(8)	(9)	(10)
1000	500	250	125	62.5	32.25	15.625	7.8125	3.906	1.9531
µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL						

Para el ensayo de Imipenem C1 es de 3 mcg/mL.

Tabla 2. Ajuste por el método de mínimos cuadrados sobre los valores de tres réplicas del ensayo biológico, con el patrón de Ceftriaxona sódica.

Rango de concentración		Ecuación		R ²
Desde	Hasta	Pendiente	Intercepto	
C1	C9	0.3413	1.3339	0.9958
C1	C8	0.3255	1.4174	0.9972
C1	C7	0.3103	1.5017	0.9991
C2	C9	0.3436	1.3273	0.9941
C2	C8	0.3232	1.4256	0.9959
C2	C7	0.3009	1.5384	0.9997
C3	C9	0.3542	1.2980	0.9930
C3	C8	0.3300	1.4038	0.9943
C3	C7	0.2999	1.5421	0.9995

de ensayo es 6.5 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Merck®). Se encontró que incubar el ensayo por 24 horas da lugar a sobrecrecimiento en el borde de los halos dando malformaciones de estos, lo que impide la correcta determinación de su diámetro. Haciendo inspección visual cada dos horas en las primeras 12 horas y luego cada hora, se encontró que el tiempo óptimo de lectura es de 12 a 13 horas. Para la determinación del rango, las respuestas fueron evaluadas por ajuste de mínimos cuadrados. En la Tabla 2 se observa como los rangos C2 - C7 y C3 - C7 son los que presentan la mejor correlación, seleccionando el último rango que corresponde a 5 niveles de concentración.

Cefotaxima (12): Para este estudio se realizaron ensayos a pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 del medio de cultivo de ensayo. Las respuestas se estudian por el método de ajuste por mínimos cuadrados. Adicionalmente se determina el tiempo óptimo de lectura por inspección visual. En la Tabla 3 vemos como el pH disminuye el tiempo de incubación necesario para obtener halos bien definidos pero modifica intercepto, pendiente y R².

Como no se presentan diferencias significativas entre las pendientes y los interceptos de los gráficos se optó por el ensayo a pH 7.5 pues requiere menos tiempo con resultados similares. Es de notar que a pH 8.0 se ve una disminución del intercepto lo cual indica halos más pequeños es decir menor actividad, debido

Tabla 3. Efecto del pH sobre la correlación dosis respuesta y el tiempo de incubación.

pH	Pendiente	Intercepto	R ²	Tiempo de incubación (h)
6.5	3.8681	12.548	0.9982	12-14
7.0	3.8529	12.442	0.9984	8
7.5	3.915	12.044	0.9963	7
8.0	3.8544	11.582	0.997	6

probablemente a un fenómeno de hidrólisis de la molécula asociado a pH (16).

El estudio de las respuestas por método de ajuste de mínimos cuadrados nos permitió determinar que el rango más apropiado para el ensayo es el de C5 a C9 (Tabla 4).

Ceftazidima (15): Las condiciones del ensayo fueron similares que para la ceftriaxona. De la misma manera, se encontró que incubar el ensayo por 24 horas da lugar a sobrecrecimiento en el borde de los halos dando malformaciones de estos, lo que impide la correcta determinación de su diámetro. Haciendo inspección visual cada dos horas las primeras 12 horas y luego cada hora, se encontró que el tiempo óptimo de lectura es de 13 a 14 horas. Cambiando el pH del medio, encontramos que a pH 6.0 al

parecer hay crecimiento lento y formación de halos difusos, y a pH 8.0 se ven halos muy bien definidos pero de menor diámetro producto de la inestabilidad de la molécula en esas condiciones. Por lo que se decidió dejar las condiciones iniciales.

El rango más apropiado para el ensayo se determinó mediante el estudio de las respuestas por método de ajuste de mínimos cuadrados. Las concentraciones van desde 2000 mcg/mL (C1) hasta 3.906 mcg/mL (C10) en diluciones seriadas 1:1. Encontramos que el rango de C2 a C6 nos da la mejor correlación dosis respuesta, como se puede observar en la Tabla 5.

Ampicilina/Sulbactam: Al realizar el estudio del efecto del pH (6.5 - 8.5) sobre la respuesta y el tiempo de lectura se encontró que a pH 8.0

Tabla 4. Ajuste por el método de mínimos cuadrados sobre los valores de tres réplicas del ensayo biológico, con el patrón de Cefotaxima Sódica.

Rango de concentración		Ecuación		
Desde	Hasta	Pendiente	Intercepto	R ²
C1	C9	3.5497	13.3550	0.9961
C1	C5	3.2980	14.7940	0.9900
C2	C6	3.5199	13.7250	0.9975
C3	C7	3.4742	13.9010	0.9978
C4	C8	3.5482	13.5150	0.9961
C5	C9	3.8681	12.5840	0.9982

Tabla 5. Ajuste por el método de mínimos cuadrados sobre los valores de tres réplicas del ensayo biológico, con el patrón de Ceftazidima Sódica.

Rango de concentración		Ecuación		
Desde	Hasta	Pendiente	Intercepto	R ²
C1	C7	4.9987	5.1724	0.9910
C1	C5	4.8805	5.0478	0.9986
C2	C6	4.9179	5.3773	0.9991
C3	C7	4.8842	5.1049	0.9982

se obtenía la mejor respuesta en un tiempo más corto, 8 horas para pH 8.0, mientras que a pH 6.5 se requieren 18 horas. Por lo tanto, se decidió utilizar para el ensayo agar antibiótico No. 11 diluir el patrón en buffer fosfatos 0.1 M pH 8.0. Aunque no es el pH de mayor estabilidad (16), el trabajar a pH cercano al de máxima estabilidad de la molécula (entre 5.0 y 6.5) hace que el microorganismo de trabajo seleccionado responda más lentamente, aumentando los tiempos de lectura y su sensibilidad al antibiótico, lo que aumentaría el tamaño de los halos formados y que obligaría a realizar un mayor número de diluciones o pesar una menor cantidad del patrón y por lo tanto se aumentan los errores de tipo sistemático.

Se observó que el rango de concentraciones de la Ampicilina/Sulbactam, en donde se puede trabajar con un alto grado de correlación de las variables, fue aquel que se estipuló a partir de concentración 5 a la concentración 9 del sistema de diluciones, en donde el coeficiente de correlación da un valor de $R^2 = 0.9994$ (Ajuste por mínimos cuadrados), como se puede observar en la Tabla 6.

Imipenem/Cilastatina: Para determinar el efecto del pH sobre la respuesta se realizaron ensayos a pH 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0 del medio de cultivo de ensayo. Las respuestas se estudian por el método de ajuste por mínimos cuadrados. Se determinó el tiempo óptimo de lectura por inspección visual. En la Tabla 7 se observa como el pH disminuye el tiempo de incubación necesario para obtener halos bien definidos pero modifica el intercepto, y la R^2 .

Los ensayos realizados a valores de pH superiores a 6.5 y los interceptos de las rectas generadas a estos valores, se encuentran por debajo del valor obtenido para el ensayo al pH de mayor estabilidad (pH 6.5) (16), indicando que los halos de inhibición se redujeron sustancialmente con respecto a los medidos en los ensayos biológicos, realizados en agar antibiótico No. 1, el cual según su ficha técnica presenta un pH de 6.5 ± 0.2 . Por lo tanto, la molécula presentó hidrólisis básica en el pH trabajado, disminuyendo la respuesta del antibiótico.

El rango de concentración que permitió trabajar con la mayor correlación es el comprendido entre C1 y C5, como se puede observar en la Tabla 8.

Tabla 6. Ajuste por el método de mínimos cuadrados sobre los valores de tres réplicas del ensayo biológico, con el patrón de Ampicilina/Sulbactam.

Rango de concentración		Ecuación		
Desde	Hasta	Pendiente	Intercepto	R^2
C1	C5	2.5450	17.8966	0.9993
C2	C6	2.5973	17.6180	0.9992
C3	C7	2.6591	17.2959	0.9981
C4	C8	2.7956	16.7816	0.9984
C5	C9	2.9755	16.2383	0.9994
C6	C10	2.9622	16.3089	0.9992
C1	C10	2.7547	16.7375	0.9984
C2	C9	2.7716	16.7373	0.9981
C3	C8	2.7256	16.9903	0.9982

Tabla 7. Efecto del pH sobre la correlación dosis respuesta y el tiempo de incubación.

pH	Pendiente	Intercepto	R ²	Tiempo de incubación (h)
6.5	4.91	13.95	0.9991	10
7.0	4.97	11.38	0.9956	8
7.5	5.12	10.97	0.9917	7
8.0	4.64	10.79	0.9977	6

Tabla 8 Ajuste por el método de mínimos cuadrados sobre los valores de tres réplicas del ensayo biológico, con el patrón de Imipenem/Cilastatina.

Rango de concentración		Ecuación		
Desde	Hasta	Pendiente	Intercepto	R ²
C1	C7	4.7389	3.4410	0.9991
C1	C5	4.9047	2.6668	0.9996
C2	C6	4.7390	3.3308	0.9995
C3	C7	4.6313	3.7248	0.9988

En general para cada tipo de antibiótico la relación dosis respuesta es única, pues esta depende de la sensibilidad manifestada por microorganismo frente a la sustancia evaluada.

Linealidad (11-15)

Se define como la capacidad del método, dentro de un rango determinado, de obtener resultados (respuestas instrumentales) que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra. Por el método estadístico de ajuste de mínimos cuadrados se puede definir la correlación como un modelo matemático lineal ($Y = mX + b$), cuyos parámetros, nivel de correlación (R^2), la pendiente (m) y el intercepto (b), son caracterizables. Para lo anterior se deben estudiar al menos cinco niveles de concentración. Adicionalmente, este modelo debe tener distribución normal en las poblaciones de datos, homocedasticidad y monotonía (3,6-8).

Para todos los antibióticos se realizaron los diferentes análisis estadísticos que conformaron la linealidad del modelo como se aprecia en la Tabla 9.

Al comparar los valores experimentales y teóricos de t , observamos que los valores experimentales son superiores, por lo cual se deduce que la recta, no pasa por el origen del plano cartesiano; los valores de y cambian cuando los de x cambian, lo cual indica que al cambiar la concentración cambian los diámetros de los halos de inhibición, además existe una correlación entre dichos valores.

El análisis de varianza de las características de linealidad permitió corroborar que no existe, un desvío significativo de la linealidad en las respuestas halladas dentro de cada uno de los niveles de concentración usados. Por otra parte el mismo análisis mostró que las respuestas instrumentales (Halos de inhibición) obtenidas entre los distintos niveles de concentración del antibiótico, eran significativamente diferentes,

Tabla 9. Resultados de las pruebas de hipótesis para la linealidad

Prueba	Hipotesis	T. experimental					T. teórico
		Ceftriaxona	Cefotaxime	Ceftazidime	Ampicilina	Imipenem	
Pendiente	Ho: m = 0 Ho: m ≠ 0	31.5	37.6	4.51	64.36	34.54	2.16
Intercepto	Ho: b = 0 Ho: b ≠ 0	10.03	11.254	88.20	66.28	84.20	2.16
Correlacion	Ho: R = 0 Ho: R ≠ 0	18.93	61.31	61.35	66.28	84.24	2.16

Tabla 10. Análisis de varianza para la regresión (ANOVA).

Prueba de hipótesis	T. experimental					T. teórico
	Ceftriaxona	Cefotaxime	Ceftazidime	Ampicilina	Imipenem	
Regresión	827.8	7605.9	5989.4	4214.2	5939.1	4.96
Linealidad	0.2855	2.0653	3.1516	0.8237	0.4740	3.711

lo que nos indica que existe regresión (valores muy próximos a uno) ya que la respuesta instrumental no solo debió a los posibles errores (aleatorios y sistemáticos), sino al efecto directo de las concentraciones del antibiótico.

Precisión (11-15)

La precisión se trabajó a tres niveles, sin embargo, a nivel experimental solo pudo evaluarse

a un nivel, siendo éste el menos limitante ya que los otros dos niveles exigen mayores requerimientos físicos y humanos. Pese a lo anterior la precisión del método de análisis logró evaluarse a partir de la reproducibilidad la cual fue evaluada en los ensayos del mismo día y entre días.

El valor de los F calculados en el análisis estadístico del coeficiente de variación arrojó como resultados que no hay variación en los ensayos, tanto en los hechos el mismo día como los realizados entre días (ver Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Análisis de varianza para las concentraciones de los ensayos en el mismo día.

Concentración	T. experimental					T. teórico
	Ceftriaxona	Cefotaxime	Ceftazidime	Ampicilina	Imipenem	
C1	0.394	0.4414	1.211	0.36	0.1205	5.1433
C2	0.486	0.0375	0.8182	0.18	1.2900	5.1433
C3	0.521	0.3544	0.0303	0.04	0.5806	5.1433
C4	0.337	0.9819	0.0476	2.18	0.1011	5.1433
C5	0.463	0.5714	1.6087	9.45	0.0125	5.1433

Tabla 12. Análisis de varianza para las concentraciones de los ensayos entre días.

Concentración	T. experimental					T. teórico
	Ceftriaxona	Cefotaxime	Ceftazidime	Ampicilina	Imipenem	
C1	0.392	1.0811	0.4399	0.0008	0.7059	4.9646
C2	0.570	0.0254	0.2381	0.0076	0.0816	4.9646
C3	0.414	0.7962	0.0239	0.0012	1.2895	4.9646
C4	0.571	0.9863	0.0562	0.0570	0.3962	4.9646
C5	0.434	0.3137	0.2663	0.0663	1.0000	4.9646

Estos resultados nos indican, que la metodología seguida, tiene un alto grado de repetibilidad, y que los ensayos pueden realizarse, tanto el mismo día, como entre días, sin que existan diferencias en los resultados obtenidos.

Estabilidad (11-15)

Para este estudio, alícuotas de las soluciones stock estándar de los diferentes antibióticos preparadas en dos solventes diferentes (agua para inyección y buffer fosfatos 0.1 M), se sometieron a condiciones de estrés térmico (18°C y 37°C), a diferentes intervalos de tiempo y ejecutando con ellas el ensayo biológico. Si la molécula es estable se deben mantener sin diferencias

significativas la pendiente y el intercepto de las curvas generadas bajo cada tratamiento. Una disminución en el valor del intercepto muestra pérdida de actividad, por que con la misma dosis (aparentemente) se obtiene menor respuesta.

Ceftriaxona. En esta molécula el efecto mayor de inestabilidad de da por temperatura pues con agua o buffer el comportamiento es similar a la misma temperatura. De acuerdo con el análisis estadístico las variaciones están dentro de los límites de confianza, de modo que la molécula durante las primeras 24 horas, que es el tiempo en el que se desarrolla el ensayo, se mantiene estable, como se puede ver en la Figura 2. También, se vio que la molécula es estable una semana en refrigeración y un mes en congelación a -4°C.

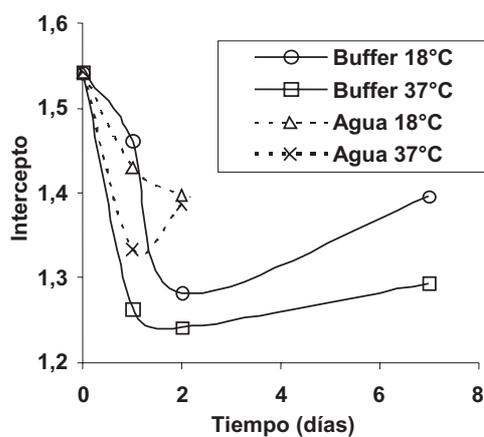


Figura 2. Estabilidad de Ceftriaxona.

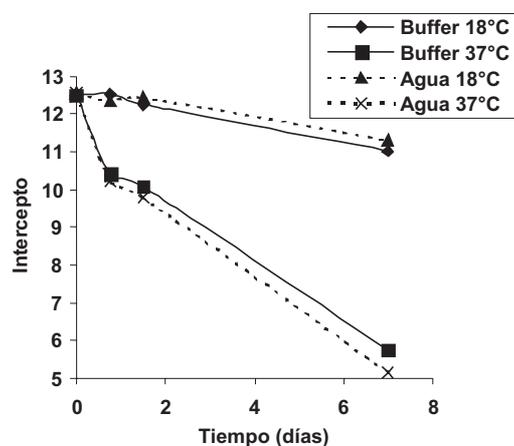


Figura 3. Estabilidad de Cefotaxima.

Cefotaxime. Al igual que con la ceftriaxona, el efecto mayor se debe a la acción de la temperatura tiene una acción más fuerte como se ve en la Figura 3. No obstante el efecto de la temperatura sobre la estabilidad del activo, para el caso del ensayo, este fenómeno no afecta la respuesta en el ensayo, porque este se realiza con un periodo total de máximo 9 horas, y el fenómeno se ve a las 18 horas, por lo tanto la respuesta del ensayo se debe a la presencia del activo. La molécula es estable un mes en congelación, y una semana en refrigeración.

Ceftazidima. Como se ve en la Figura 4 esta es una molécula relativamente estable, pues durante las primeras 24 horas no se ve un efecto importante de la temperatura y el vehículo sobre la estabilidad de la molécula, que a partir del día dos es notorio, siendo la variable más importante la temperatura, no así el vehículo. Con este resultado podemos decir que las respuesta del ensayo se deben al activo colocado dado que el ensayo se realiza un periodo de 16 horas. En refrigeración y congelación se comporta igual que la cefotaxima.

Ampicilina/Sulbactam. En esta molécula el efecto más importante se debe al vehículo pues, el buffer fosfatos pH 8 la actividad de la

molécula se ve comprometida, pues tenemos menor respuesta que en agua. Para efectos de la metodología de valoración se demostró que a pH 8 aunque se disminuye la sensibilidad se ganó en reproducibilidad, precisión y en una disminución importante en el tiempo de incubación para obtener una respuesta más estable y reproducible. La recomendación es realizar los ensayos en el menor tiempo posible y no realizar demasiados montajes a un mismo tiempo. La molécula es estable por 12 horas en buffer fosfatos pH 8 congelada a -4°C .

Imipenem. Como en el caso de la Ampicilina la actividad del imipenem se ve afectada por el pH del vehículo. Sin embargo, es una molécula muy inestable, por lo que aquí es crítico el tiempo de puesta del ensayo microbiológico. Por lo tanto este se debe realizar en menos de 1 hora para que la inestabilidad de la molécula no influya en la respuesta instrumental (halo de inhibición). Se encontró, que la molécula es estable por una semana a -4°C .

Adicionalmente, estos estudios de estabilidad nos permiten obtener una información importante para la subdosificación de estos productos. Una vez preparados, los productos comienzan su deterioro, y es razonable saber cuanto tiempo y en que

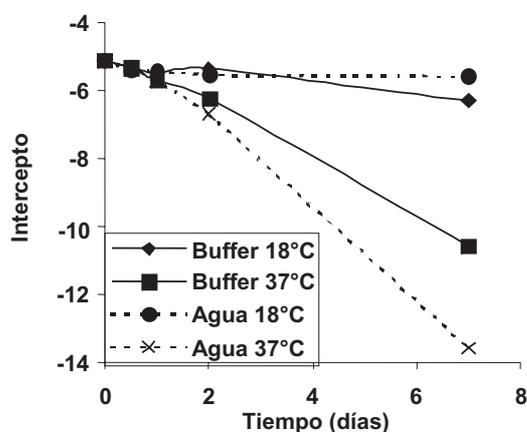


Figura 4. Estabilidad de Ceftazidima.

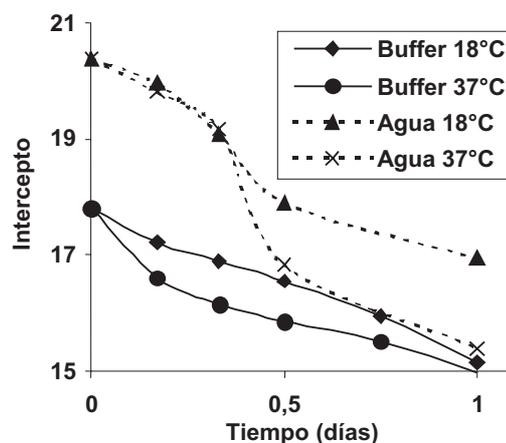


Figura 5. Estabilidad de Ampicilina/Sulbactam.

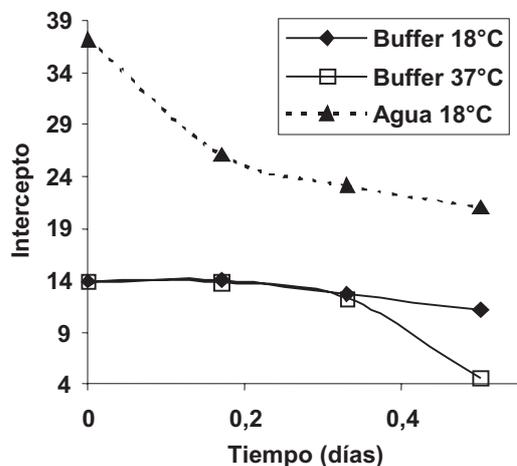


Figura 6. Estabilidad de Imipenem.

condiciones se pueden almacenar para poder ser utilizados con seguridad cuando deben ser administrados en cantidades menores que las que se obtienen una vez reconstituido el producto, evento frecuente en pediatría.

Especificidad (11-15)

Se desarrolló la metodología de análisis con los productos de degradación obtenidos a partir de muestras comerciales de los antibióticos sometidas a condiciones de estrés térmico, durante varios días (20 días a 50° C). Con ninguno de los antibióticos se produjo alguna clase de respuesta instrumental, lo que conlleva a reafirmar que las respuestas instrumentales obtenidas son específicas para la molécula íntegra. Es decir, que los subproductos de degradación no tiene actividad biológica que pueda interferir con la respuesta del ensayo.

Valoración de Muestras Comerciales

Para la valoración de muestras comerciales, se decidió adquirirlas en establecimientos públicos (droguerías hospitalarias) con la intención de analizar su potencia, de la forma más real y tal y como tiene cabida en el público, entre las que tenemos marcas registradas y productos genéricos.

Tabla 13. Contenido relativo de muestras comerciales de Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftazidima, Ampicilina/Sulbactam e Imipenem.

Muestra	Ceftriaxona	Cefotaxima	Ceftazidima	Ampicilina sulbactam	Imipenem
M1	110.1	105.4	92.2	101.2	113.7
M2	114.6	108.6	91.8	102.6	111.6
M3	114.6	114.1	99.8	96.2	111.4
M4	115.0	112.5	110.9	96.2	115.0
M5	109.9	90.1	101.4	101.2	
M6	110.2	92.1	93.7	107.8	
M7	114.6	108.9	98.0	99.4	
M8		111.5		106.5	
M9		92.1		106.5	
M10		113.2		101.2	
M11		112.4		95.0	
M12		113.9		100.0	
M13		91.4		96.7	

Para determinar si los productos son equivalentes farmacéuticos se tendrá en cuenta que el contenido determinado con el ensayo microbiológico este dentro de la especificación asignada por la USP 27 que para todos los antibióticos es de 90 a 115 % del contenido etiquetado.

De la tabla anterior se puede concluir que las muestras analizadas en este estudio son equivalentes farmacéuticos. Solo resta anotar que para imipenem solo se analiza el producto innovador puesto que no existen productos genéricos de este antibiótico en particular.

Se puede decir como conclusión final que el análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia, que se emplea para cuantificar el contenido de antibióticos en muestras comerciales, puede ser perfectamente realizada con un ensayo microbiológico, el cual sería una alternativa económica para laboratorios de microbiología de hospitales, que no cuentan con una fuerte capacidad económica para adquirir los equipos requeridos para el análisis cromatográfico. El ensayo biológico también se puede adaptar de manera económica y eficiente para el análisis de muestras biológicas, como las que se generan durante estudios de farmacocinética y farmacodinamia, que se realizan en modelos animales o de seres humanos. De manera adicional, la industria farmacéutica puede utilizar estas metodologías como herramientas alternativas al análisis instrumental, cuando este no es accesible o presenta fallas sistemáticas. También como herramienta comparativa.

Sería muy importante que la parte final de este trabajo (evaluación de muestras comerciales) se ampliara involucrando todos los productos innovadores genéricos de marca y genéricos, para conocer si los productos que se comercializan en el país son desde el punto de vista de este bioensayo *in vitro* tienen la misma actividad antimicrobiana podría decirse que equivalentes

terapéuticos *in vitro*, y se confirma que son equivalentes farmacéuticos.

El siguiente paso que es realizar un trabajo similar pero esta vez involucrando cepas de origen hospitalario con el fin de hacer estudios comparativos de determinación de Concentraciones Mínimas Inhibitorias y Concentraciones Mínimas Letales con la misma filosofía, involucrando productos genéricos, innovadores y de marca.

Agradecimientos

El grupo de investigadores agradece a la empresa Vitrofarma S.A. su valiosa colaboración mediante la financiación del proyecto formalizada con el convenio de apoyo a la investigación firmado entre Vitrofarma S. A. y la Universidad Nacional de Colombia.

Bibliografía

1. World Health Organization. Communicable disease surveillance and response containing. Antimicrobial resistance: Review of the literature and report of a WHO workshop on the development of a global strategy for the containment of antimicrobial resistance. Geneva, Switzerland, 4-5 February 1999.
2. Centers for disease control and prevention, food and drug administration, national institutes of health. a public health action plan to combat antimicrobial resistance. Dirección WEB: <http://www.cdc.gov/drugresistance/actionplan/index.htm>
3. The United States Pharmacopeia. 25th ed., "Biological test and assays", Rockville MD, 2001. pp. 358, 1883-1889 .
4. W. Hewitt, "Microbiological assay: an introduction to quantitative principles and

- evaluation". Academic Press, New York, 1977. pp. 17-42.
5. V. Lorian, "Antibiotics in laboratory medicine", William & Wilkins, New York, 1996.
 6. ICH. "Quality of biotechnological products: stability testing of biotechnological/biological products", International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, on 30 November 1995, ICH steering committee European union, Japan and USA.
 7. ICH. "Text on validation of analytical procedures Q2A", International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, on 6 November 1996, ICH steering committee European union, Japan and USA.
 8. ICH. "Validation of analytical procedures: methodology Q2B", International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, on 27 October 1994, ICH steering committee European union, Japan and USA.
 9. W.W. Davis y T.R. Stout, Disc plate method of microbiological antibiotic assay: factors influencing variability and error, *Appl. Microbiol.*, **22**, 659 (1976).
 10. G.D. Stell y H. Torrie, "Bioestadística: principios y procedimientos", 2ª ed., McGraw-Hill, México, 1997.
 11. P. Gonzales, "Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte I: ceftriaxona sódica", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2003.
 12. E. Moreno, "estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte II: cefotaxima sódica", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2004.
 13. N. Serrato, "Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte III: ceftriaxona sódica", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2004.
 14. E. Sáenz, "Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte IV: ampicilina/sulbactam", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2004.
 15. P. Amaya, "Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte V: ceftazidima pentahidrato", Trabajo de Grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, 2004.
 16. A. Connors, Gordon y S.J. Valentino, "Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists", 2nd ed., Wiley Interscience, New York, 1986. pp. 300-314.