

Estudio comparativo de la eficacia microbiocida de ampicilina de patente y una homóloga genérica, en ratones

Ana Colmenero, Miriana Duran, Karla Méndez

Resumen

Se evaluó la eficacia de ampicilina genérica y de patente, en la flora normal de ratones de laboratorio. Se usaron dos tipos de medicamentos, el genérico en este caso el *Amsapen*® y el de patente que fue *Binotal*®. Se administró vía intramuscular en dosis de 0.03/mgml de medicamento una vez al día durante 5 días, en 3 grupos de 3 ratones cada uno, machos ICR de 3 meses de edad. Diariamente se tomaron muestras de heces fecales, las cuales fueron diluidas con agua salina y se incubó una muestra de 50µl de esta suspensión en una caja de petri, donde después de incubar por 12 horas a una temperatura de 37° analizamos los resultados. Se hicieron cuatro replicas que nos ayudaron a analizar mejor los datos y obtener resultados más confiables. Comparamos el número de colonias en las cajas de petri, donde cultivaremos heces fecales de los ratones y así poder ver cual es la diferencia entre un medicamento de patente y uno genérico. Obtuvimos como resultado que los dos medicamentos tuvieron la misma eficacia.

Introducción

A pesar de su prestigio en el mercado y la gran diferencia en precios, los medicamentos genéricos; entre ellos la ampicilina; supuestamente tienen la misma eficacia que un medicamento de patente. La ampicilina es un antibiótico similar a la penicilina usado para tratar ciertas infecciones provocadas por las bacterias como la neumonía, bronquitis, y las infecciones al oído, pulmón, piel y vías urinarias. Por consiguiente, trataremos de demostrar que es un mito que los medicamentos genéricos no son igual de efectivos que los de patente, mediante el experimento descrito a continuación. Inyectaremos ampicilina a ratones para poder comparar el número de colonias que observaremos en las cajas de petri, donde cultivaremos heces fecales de los ratones. Una característica importante de los ratones que usaremos consiste en que no sufren infecciones espontáneas por microorganismos propios de su flora normal. De esta manera podremos observar el cambio que produce el medicamento en la flora de los ratones.

Antecedentes

La ampicilina es un antibiótico betalactámico de amplio espectro, efectivo contra diversos microorganismos (Rossi, 2004). Los betalactámicos se unen por enlaces covalentes a

la membrana citoplasmática de las bacterias (Zamora Marín, et al, 1998). Se utiliza contra diversas infecciones producidas por bacterias en pulmones, piel, oído y vías urinarias. Se puede administrar vía oral o vía intravenosa, puede modificar la flora normal de algunos animales como los ratones. Los ratones, al igual que otros organismos superiores, presentan una flora nativa constituida por bacterias, hongos, virus y parásitos que no necesariamente producen una enfermedad (Rossi, 2004). Esta flora normal de microorganismos puede establecer una relación de comensal o simbiote con el hospedero, e incluso ser benéficos, tal es el caso de bacterias intestinales que producen vitamina K y vitamina B₁₂ o de otros elementos de la flora y fauna nativa que permiten un desarrollo adecuado del sistema inmune. Los ratones son mamíferos roedores del orden *Rodentia*, del género *Mus* y especie *musculus* con especies y líneas genéticamente definidas, poseen una microflora y micro fauna autóctona bien definida. Los animales de laboratorio empleados en experimentación deben estar libres de patógenos específicos y presentan una gran diversidad de microorganismos en su flora normal. Es por esto que los ratones constituyen un buen modelo experimental. Para cultivar la flora de los ratones, usaremos un medio de cultivo de Luria (LB), el cual esta formado por 10 mg/ml de peptona, 15 mg/ml de agar, 5 mg/ml de NaCl y 5 mg/ml de extracto de levadura.

Hipótesis

Los antibióticos genéricos como la ampicilina, no presentan diferencias en la eficiencia bactericida con respecto a sus homólogos farmacéuticos de patentes.

Objetivo General

Evaluar la eficiencia de 2 presentaciones de un antibiótico de amplio espectro de acción, sobre las colonias bactericidas constitutivas de ratones de laboratorio y así poder comparar la actividad microbicida de la ampicilina en dos presentaciones, de patente farmacéutica y de marca genérica, sobre la flora bacteriana constitutiva de ratones ICR.

Metodología

Este proyecto se realizó en las instalaciones del Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizaron machos ICR de 2 meses de edad que fueron sometidos a tratamiento con antibiótico.

Se utilizó ampicilina pediátrica administrada por vía intramuscular a dosis específicas de 0.1 ml de medicamento cada 3 horas, 3 veces al día durante 10 días.

Se hicieron 3 grupos de 8 ratones cada unos. Uno fue el grupo control que no recibió antibiótico, el segundo recibirá ampicilina de marca de patente y el tercero ampicilina de marca genérica, a las mismas dosis.

Los animales fueron alojados en grupos de 4 en cajas de policarbonato con cama, alimentación y bebederos estériles y recibieron el tratamiento durante dos semanas. Se evaluó la presencia de microorganismos mediante la formación de colonias microbianas en cajas con medio de cultivo específico, cada tercer día. Se analizará la eficiencia bactericida del antibiótico en cada grupo. Como se producirá estrés a los ratones a los que se les administrará el medicamento, a los ratones del grupo de control se les inyectará agua para tener el mismo efecto de estrés.

Diario se tomaron muestras de heces fecales, 50 ul fueron diluidas con disolventes lipídicos y se implanto una muestra de 2 ml de esta suspensión en una caja de petri. Este procedimiento se le aplicó a los 3 grupos de ratones e inoculamos 2 muestras diferentes de heces por cada grupo

para tener mayor punto de comparación. Diariamente observaremos el número de colonias que se reprodujeron en las cajas de petri de cada grupo de ratones.

Con estos datos, se hizo un estudio comparativo de la presencia de microorganismos mediante la formación de colonias bacterianas en cajas de petri con medio de cultivo específico.

Material

- o Ratones machos ICR de 2 meses de edad.
- o Ampicilina trihidratada: *Amsapen*(marca genérica) en ampollas de agua inyectable de 250 mg y *Binotal de Bayer*(marca de patente) 250 mg para administrar por vía intravenosa.
- o Unidades de alojamiento para los animales, las cuales están constituidas por:
- o Caja de policarbonato, cama de material inerte, rejilla de acero inoxidable, tapa de policarbonato con micro aislador y bebederos de policarbonato con pipeta de acero inoxidable. Todo el material de cama se esteriliza y se cambia totalmente cada semana.
- o Alimentación de los animales, que consiste en agua y pellets de alimento, especial para roedores esterilizados.



Raton macho ICR antes de ser inyectado.

Resultados y Discusiones

Contamos el número de colonias que crecieron en las cajas petri (como lo muestra la Fig. 1), esos números fueron lo que usamos como muestras. Con las muestras que obtuvimos de nuestros experimentos sacamos un promedio de cada grupo considerando los 5 días que les aplicamos medicamento a los ratones.

(Fig. 2, 3 y 4). Después sacamos la desviación estándar y le aplicamos una prueba t a los resultados. De acuerdo a estas pruebas estadísticas pudimos observar que el efecto que se produjo en la flora en el grupo 1 (al que le aplicamos Binotal) y 2 (al que le aplicamos *AMSAPEN*) de los ratones fue el de reducir la flora normal de estos en las mismas cantidades, y el grupo 3 (de control) tuvo una flora constante y no disminuyó. Gracias a esto comprobamos nuestra hipótesis, pues comprobamos que la eficacia de ampicilina de patente y ampicilina similar fue la misma en los grupos de ratones a los cuales se les aplicó el medicamento.

Las colonias que obtuvimos de las replicas 2 y 3 tuvieron patrones muy parecidas (fig. 4a y 4b) . El número de colonias fue disminuyendo constantemente en el medicamento genérico (fig. 5 y 6) así como en el de patente (fig. 7 y 8) .

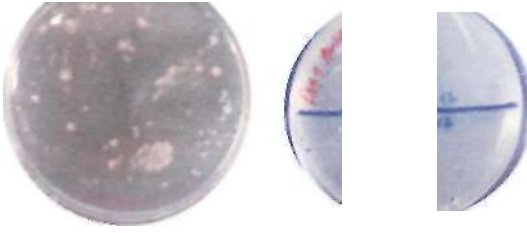


Fig. 4 a Las colonias producidas por las muestras de heces fecales de los ratones inyectados con el medicamento *Binotal* (medicamento de patente) fueron disminuyendo en el transcurso de los cinco días.

Fig.4b Las colonias producidas por las muestras de heces fecales de los ratones inyectados con el medicamento *Amsapen* (genérico) tuvieron un cambio muy parecido.

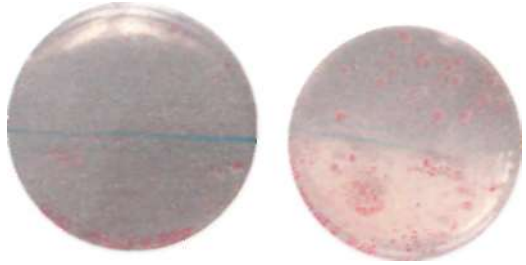


FIG.1. Colonias producidas por las heces fecales de los ratones del grupo control

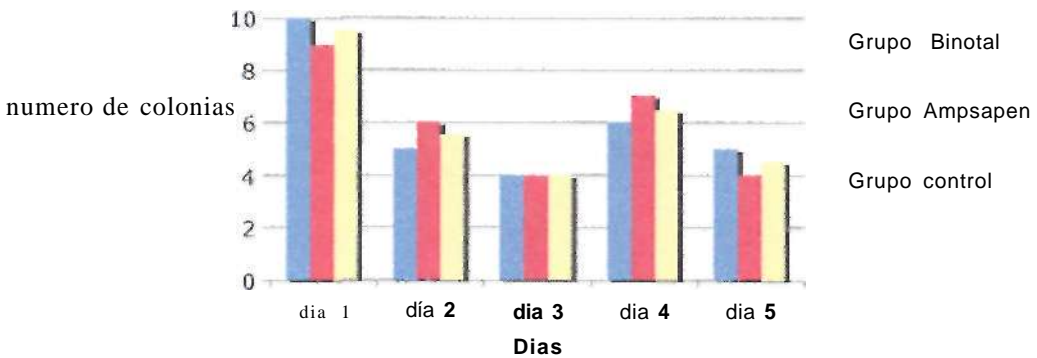


Fig.2 Resultados del primer experimento.

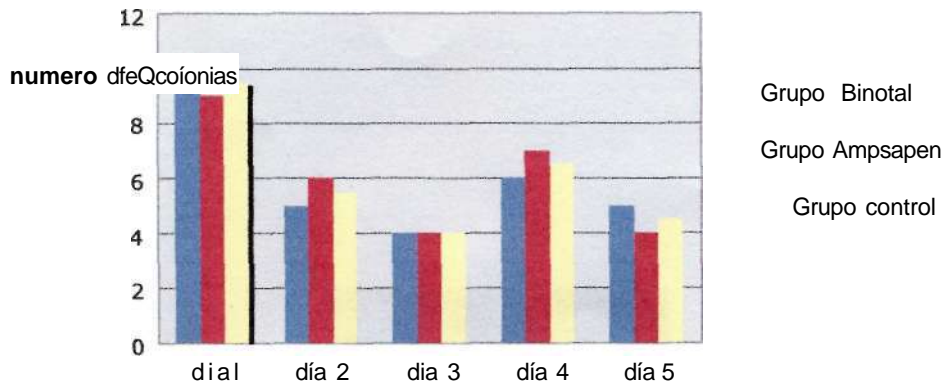


Fig.3. Resultados del segundo experimento.

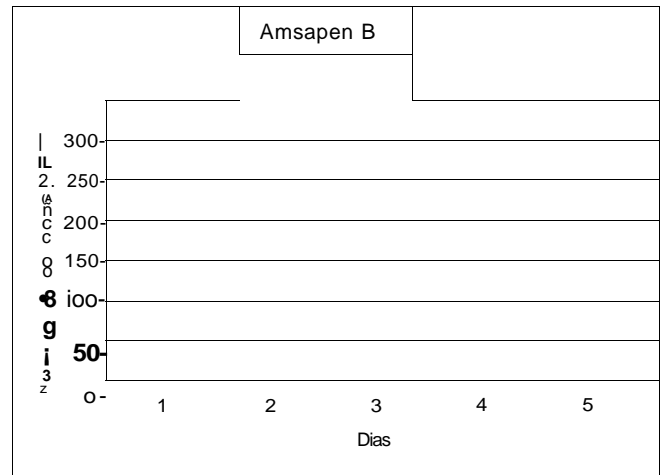
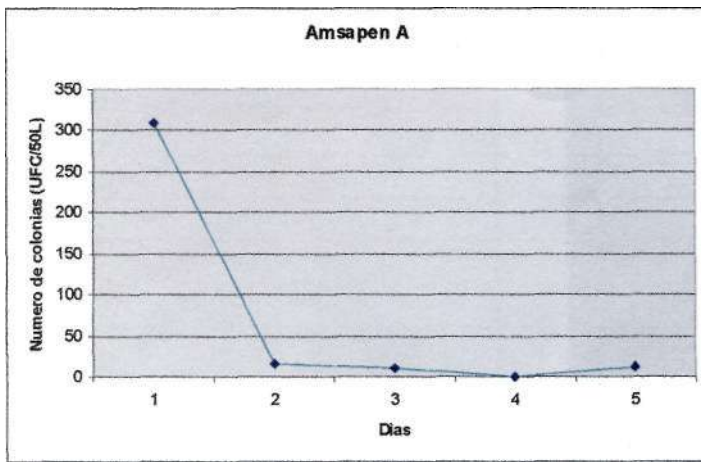


Fig. 5 /Fig. 6 Disminución de colonias desde el primer día hasta el último día de aplicación de *Ampsapen* en los grupos A y B.

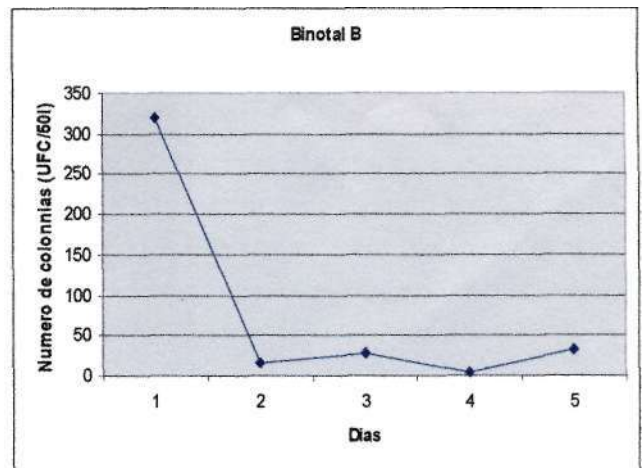
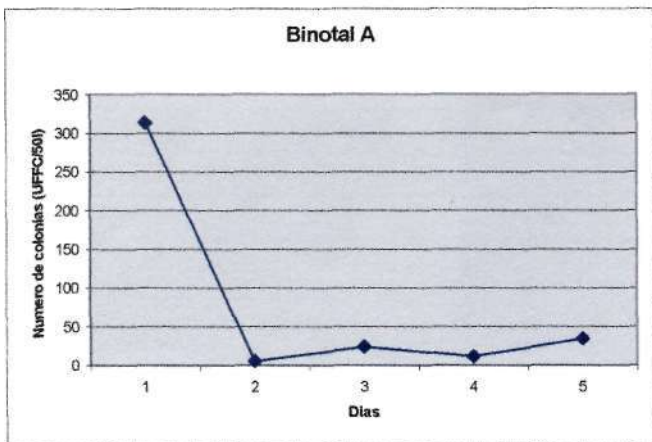


Fig. 7 / Fig. 8 6 Disminución de colonias desde el primer día hasta el ultimo día de aplicación *Binotal* en los grupos A y B.

Al recopilar los datos de todas las réplicas sacamos un promedio de todos los días, por medicamento, (fig. 9) esto demuestra que realmente es significativa la diferencia que existe en la eficacia de un medicamento de patente y uno genérico. Gracias a los análisis anteriores pudimos darnos cuenta de que esto tiene un 95% de credibilidad.

Dia	Binotal		Amsapen	
	serie A	Serie B	Serie A	Serie B
0	314	320	310	300
1	6	17	15	12
2	24	28.7	11	10
3	11	4	0	0
4	35	33	12	8

Con estos resultados pudimos observar que el numero de colonia mientras el medicamento ha sido administrado empieza a disminuir en los dos medicamentos y en las dos series, A y B. Para analizar mas detalladamente los resultados sacamos el promedio de estos y obtuvimos que el grupo del Binotal obtuvo un promedio de 78.58 UFC/ 50 ul y el grupo del amsapen 71.96 UFC/ 50 ul.

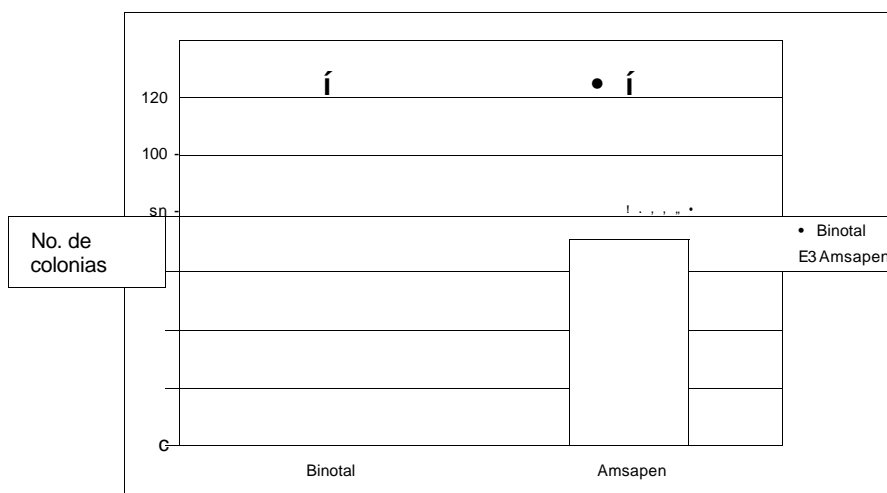


Fig. 9 Evaluación de los promedios de colonias microbianas, durante la aplicación de los medicamentos por un periodo de 5 días.

PRUEBA
ESTADÍSTICA:

Xbinotal: 78.58

Xamsapen: 71.98

SA: 132.414

SA: 120.30

Sebinotal: 132.414/2.23

Seamapen: 120.30 / 2.23

59.3

53.9

Prueba estadística:

$$= 78.58 \pm 59.3$$

$$= 71.98 \pm 53.9$$

$$= 19.28$$

$$= 125.29$$

$$= 137.88$$

$$= 17.63$$

Margen de error

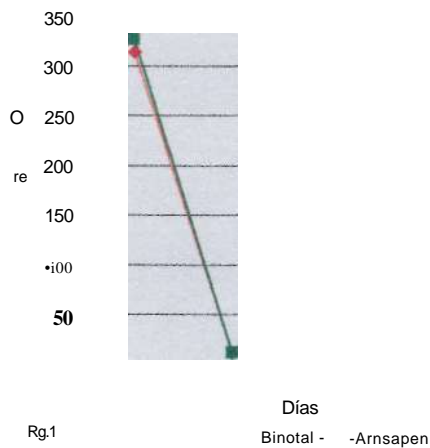


Fig. 10. Colonias producidas por las muestras de heces fecales de ratones del inyectados por los diferentes medicamentos durante los diferentes en cinco días.

* El grupo control no redujo en ningún momento su flora normal, siempre estuvo alrededor de las 300 colonias, como los ratones normalmente tienen. Este dato no es relevante para definir la eficacia de los medicamentos pero ayuda a tener un punto de referencia.

Conclusiones

Con esta gráfica (fíg. 10) podemos ver que los dos medicamentos aplicados, el genérico (*Amsapen*) y el de patente (*Binotal*) tuvieron cambios muy parecidos. Los dos medicamentos disminuyeron el número de colonias en la flora normal de los ratones. Los promedios de todas las réplicas están representados en esta gráfica muestran lo que tratamos de comprobar. Con la prueba estadística y el margen de error deducimos que, ya que estas se traslapan, no hay diferencia entre ellas.

Logramos comprobar nuestra hipótesis: que los medicamentos genéricos (en este caso la ampicilina) tiene la misma eficacia que un medicamento de patente, logrando disminuir la flora bactericida de los ratones.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Instituto de Biotecnología y en particular al Bioterio . Gracias a la Dra. Elizabeth Mata y a Marcela Yarza que nos supervisó a lo largo del proyecto.

Referencias

ROSSI, Adelaide: Australian Medicines Handbook. Australian Medicines Handbook 2004. ISBN 0-9578521-4-2.

ZAMORA MARÍN, AREU REGATEIRO, GUNDIÁN, MANRESA, SÁNCHEZ , MORALES SIRGADO., Cefalosporinas, Acta médica 1998; 8(1):40-7, Hospital Clínico quirúrgico "Hermanos Ameijeiras". Ciudad de La Habana, Cuba, www.bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act05198.pdf
Fecha consulta : 16/FEB/2006