



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

PRUEBA DE UN MICROMETODO PARA
CUANTIFICAR UN ANTIMICROBIANO EN
MUESTRAS MUY PEQUEÑAS DE PLASMA
Y LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO DE NI-
ÑOS RECIEN NACIDOS.

TESIS CONJUNTA

Para obtener el título de:

B I O L O G O

que presentan:

Clara Esquivel Huesca

Carmen Noemí Herrera Sánchez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A NUESTROS PADRES, con profundo
agradecimiento.

A NUESTROS HERMANOS, por su
comprensión.

A NUESTROS MAESTROS, con
afecto.

Agradecemos especialmente a el Dr. Emilio Escarzaga Tapia,
asi como al Dr. Jorge M. Hill J. y a la Biol. Refugio Veladéz,
por sus valiosas enseñanzas.

Al personal del laboratorio de el Hospital General de la
S.S.A. por su colaboración.

Este trabajo se realizó en los Laboratorios Centrales del Hospital General de México, S. S. A., Departamento de Farmacología Clínica, bajo la dirección del M. Cdr. Emilio Escárzaga Tapia. Siendo representante de la Facultad de Ciencias la Dra. en Ciencias Elvira Estrada Flores.

CONTENIDO

I	INTRODUCCION
II	ANTECEDENTES Y OBJETIVOS
III	MATERIAL Y METODO
	1) Ensayo del método.
	2) Construcción del modelo estándar (Curva).
	3) Verificación de la reproducibilidad del modelo estándar al utilizar solventes orgánicos (plasma y líquido cefalorraquídeo).
	4) Método de administración del antimicrobiano: dosis, vía, frecuencia y toma de muestras.
	5) Cuantificación del antimicrobiano.
IV	RESULTADOS
V	COMENTARIOS Y CONCLUSIONES
VI	RESUMEN
VII	ANEXO
VIII	BIBLIOGRAFIA

PRUEBA DE UN MICROMETODO PARA CUANTIFICAR UN
ANTIMICROBIANO EN MUESTRAS MUY PEQUEÑAS DE PLASMA Y LIQUIDO
CEFALORRAQUIDEO DE NIÑOS RECIEN NACIDOS

I INTRODUCCION

Para hacer un uso racional y efectivo de los antimicrobianos, es necesario conocer su origen, propiedades físicas y químicas, los efectos bioquímicos y fisiológicos sobre el organismo que los recibe, las propiedades farmacocinéticas y la acción misma sobre microorganismos patógenos y sus efectos terapéuticos; para todo esto, en la práctica médico-biológica se hacen estudios "in vitro" e "in vivo".

Los estudios "in vitro" muestran la efectividad de las sustancias antimicrobianas contra los microorganismos patógenos y los estudios "in vivo" sirven para hacer la valoración farmacológica de estas sustancias. Los estudios "in vivo" primaro se realizan en animales y los resultados se extrapolan al hombre, ya que la experimentación en éste está limitada por razones éticas. (12, 13, 14, 15, 28, 31)

Así como el comportamiento farmacológico y el efecto terapéutico de los antimicrobianos varían en las diferentes especies de animales y en el hombre, es de esperarse que en los

niños cuyo metabolismo es diferente al de los adultos, también sea distinta la farmacocinética de estas sustancias. (5, 31)

II ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES

En farmacología clínica existen varios métodos para determinar o cuantificar sustancias antimicrobianas en diversos líquidos corporales como: suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, bilis, etc; estos métodos los podemos clasificar en:

- a) Métodos químicos
- b) Métodos biológicos

a) Métodos químicos.- Consisten en hacer reaccionar al antimicrobiano presente en las muestras con sustancias químicas y el producto de esta reacción se pueda cuantificar por medio de métodos turbidométricos, iodométricos y otros métodos especiales que algunas veces son semiautomatizados. Algunos de estos métodos por dar resultados poco confiables, han dejado de utilizarse. Actualmente se cuenta con métodos radioinmunológicos que son muy exactos, pero requieren de material muy costoso (13,38,39,40).

b) Métodos biológicos.- En estos métodos se prueban las mu-

estres con el antimicrobiano frente a un microorganismo muy sensible; entre estos están: el método de dilución seriada en caldo y los métodos de difusión en agar. (13,16).

Método de dilución seriada en caldo.- Para determinar la concentración de un antimicrobiano en muestras líquidas se preparan dos sistemas con un mismo microorganismo de prueba: una serie de diluciones conocidas del antimicrobiano (serie control) y otra con diluciones del líquido corporal (serie desconocida). En la serie control se determinará la concentración inhibitoria mínima (C. I. M.) del antimicrobiano contra el microorganismo de prueba. En la serie desconocida se observe cuál es el tubo en el que ocurre la inhibición; ese punto equivale a la concentración inhibitoria mínima. La cantidad de antimicrobiano presente en la muestra es determinada multiplicando la C. I. M. obtenida por el factor de dilución de la muestra. Este es un método simple y no requiere de equipo especial, sin embargo se ha observado que no da resultados reproducibles y es poco exacto.

Método de difusión en agar.- En forma general este método se construye colocando en cajas de petri una base de medio de cultivo sólido que servirá como capa niveladora para la difusión del antimicrobiano que se colocará posteriormente;

sobre esta base se aplica una segunda capa muy delgada de medio de cultivo inoculado con el germen de prueba (que debe ser altamente susceptible), sobre esa segunda capa se coloca el antimicrobiano en concentraciones conocidas y decrecientes ya sea en cilindros metálicos (cubetas) o impregnado en discos de papel filtro. La difusión del antimicrobiano desde la cubeta o el papel variará según la concentración del antimicrobiano colocado en torno a la fuente del mismo cilindro o disco y, después de mantener las cajas a temperatura adecuada se observarán halos de inhibición de tamaño proporcional a la concentración de antimicrobiano; en esta forma se construye una línea de regresión (curva estándar) que represente los halos de inhibición que se consiguen con cada una de las concentraciones probadas.

Construido el sistema de medida (curva estándar) se podrá probar, en condiciones similares, el material cuyo contenido en antimicrobiano se quiere determinar, midiendo el resultado (halos de inhibición) contra la curva estándar correspondiente (16).

En el método de difusión vertical de Mithison y Spicer (13), las soluciones conocidas del antimicrobiano y las de las muestras con el antimicrobiano se pipetea dentro de tubos capilares (3 mm de diámetro interno) que contengan una

columna de agar inoculado (2 a 3 cm); de este modo se obtienen zonas de inhibición que se puedan medir longitudinalmente.

De los métodos antes mencionados, el que más se utiliza es el de difusión en placas de agar, originalmente diseñado por Grove y Randall (16) que ha sido modificado por muchos investigadores asegurando la utilidad de éste método biológico (1, 2, 3, 5, 6, 9, 10, 13, 18, 19, 22, 24, 25, 27, 28, 29, 31, 34, 36, 37, 41).

En este estudio se probó un método biológico modificado para micrométodo con el que se cuantificó en plasma y líquido cefalorraquídeo de niños recién nacidos un nuevo antimicrobiano, la Sisomicina (Ver anexo A)

OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue probar un método para cuantificar un antimicrobiano en muestras muy pequeñas de plasma y líquido cefalorraquídeo, obtenidas de niños recién nacidos, a fin de contribuir al conocimiento farmacocinético de antimicrobianos en niños de bajo peso, en el caso particular el estudio se realizó con Sisomicina.

III MATERIAL Y METODO

1) Ensayo del método

Al hacer los ensayos del método, fue necesario tomar en cuenta los factores que podían influir en los resultados, para controlar las variables y reducir al mínimo los errores; principalmente se tomó en cuenta que se tenían que procesar muestras con volúmenes muy pequeños utilizando un micrométodo que fuera práctico, sencillo y reproducible.

La descripción general de este micrométodo, se muestra en el siguiente parrafo y posteriormente se detallará al describir la construcción del modelo estándar.

Se planeó determinar la concentración de Sisomicina en muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo obtenidas de niños recién nacidos, modificando el sistema de Grove y Randall (16) en el que se utilizan muestras de volúmenes no menores de 4 ml.; por ello se tuvo que modificar para micrométodo ya que se tenía que cuantificar el antimicrobiano en muestras mucho menores que 0.1 ml.

Las variaciones que se tuvieron que hacer para el micrométodo, fueron las siguientes:

Para aplicar las soluciones conocidas de la Sisomicina y los líquidos corporales a las placas de agar inoculadas con el germen de prueba, se utilizaron discos de papel filtro en vez de usar cilindros de acero inoxidable (cubetas), debido a que estos presentan una mayor dificultad en su manejo y además por que estos deben llenarse con 0.6 ml. de muestra y de los niños no se pueden obtener grandes volúmenes de sangre o de líquido cefalorraquídeo.

Las diluciones del antimicrobiano y las muestras problema, se impregnaron a los discos utilizando tubos capilares que previamente se calibraron y marcaron para aceptar un volumen de 0.02 ml. estos capilares se usaron como micropipetas y también para la toma y conservación de las muestras.

2) Construcción del modelo estándar (Curva)

a) Preparación del microorganismo de prueba

Fundamentalmente este paso tuvo por objeto obtener un concentrado de esporas bacterianas (microorganismo de prueba sensible a bajas concentraciones del antimicrobiano) para inocular el sistema de agar y lograr un desarrollo uniforme dando halos nítidos, no festonados ni dobles y que fueran fáciles de medir.

Para encontrar el microorganismo de prueba adecuado se trabajó con diferentes cepas, generalmente susceptibles a la Streptomina, probándolas a bajas concentraciones, hasta obtener una cepa formadora de esporas. Esta cepa fue una de Bacillus subtilis.

Ya teniendo el microorganismo de prueba se obtuvo una suspensión rica en esporas, sin formas bacilares y se calculó la concentración óptima a que debía usarse (Ver anexo B).

b) Preparación de las cajas

Se colocó en cajas de petri de 100 X 10 mm. una primera capa de medio de cultivo a fin de nivelar el fondo de la caja (capa niveladora) y una segunda con Bacillus subtilis al 0.04 % (capa inoculada).

El medio que se utilizó fue Antibiotic medium No. 2 (DIFCO) ajustando el pH a 8.1 (35). Con el medio de cultivo fundido se preparaba un grupo de 16 cajas, marcadas previamente en su base con una línea de color, vertiendo 10 ml. de medio nutritivo en cada una y dejando que solidificara.

En la preparación de la segunda capa, el medio de cultivo se calentó a una temperatura de 55° C. para agregar la suspensión de esporas, en seguida se distribuyeron 4 ml. en cada una de

las cajas; estas con la segunda capa se dejaban destapadas durante 15 minutos aproximadamente con el fin de eliminar el exceso de humedad; luego se taparon y se conservaron en refrigeración (no más de 24 hs.) hasta el momento de usarlas.

c) Preparación de las diluciones del antimicrobiano para la curva estándar

Las concentraciones conocidas del antimicrobiano para la curva estándar se prepararon haciendo diluciones a partir del estándar primario de "Sulfato de Sisomicina" SCH 13475 (Lote 55 53-147-1 Pot. 573 mcg/ml.), tomando en cuenta su potencia y no su peso. Las concentraciones para este sistema fueron: 1, 2, 4, 8 y 16 mcg/ml. teniendo como punto de referencia (PR) la concentración de 4 mcg/ml.

En la tabla No. 1 se muestra como se prepararon las soluciones acuosas de la Sisomicina.

d) Construcción de la curva estándar

De 16 cajas preparadas como ya se indicó en el inciso anterior, se destinaban 4 para cada una de las concentraciones conocidas, menos para la concentración del punto de referencia (PR) que se colocaba en todas las cajas sobre la línea de color previamente marcada.

TABLA No. 1

PREPARACION DE SOLUCIONES ACUOSAS DE SISOMICINA

Concentraciones para la curva estándar:

1, 2, 4 (PR), 8 y 16 mcg/ml.

Solución Madre (M) 20 mg. activos de Sisomicina (34.8 mg.) + 20 ml. de agua* 1 000 mcg/ml
 Solución (I) 1.0 ml. de (M) + 9 ml. de agua* 100 mcg/ml

Solución:	Procedimiento	Concentración en mcg/ml.	Volumen inicial (ml.)	Volumen final (ml.)
1	0.8 ml. de (I) + 4.2 ml. de agua*	16	5	3
2	2.0 " " (1) + 2.0 " " "	8	4	2
3	2.0 " " (2) + 2.0 " " "	4 (PR)	4	3
4	1.0 " " (3) + 1.0 " " "	2	2	1
5	1.0 " " (4) + 1.0 " " "	1	2	2

* Agua destilada estéril

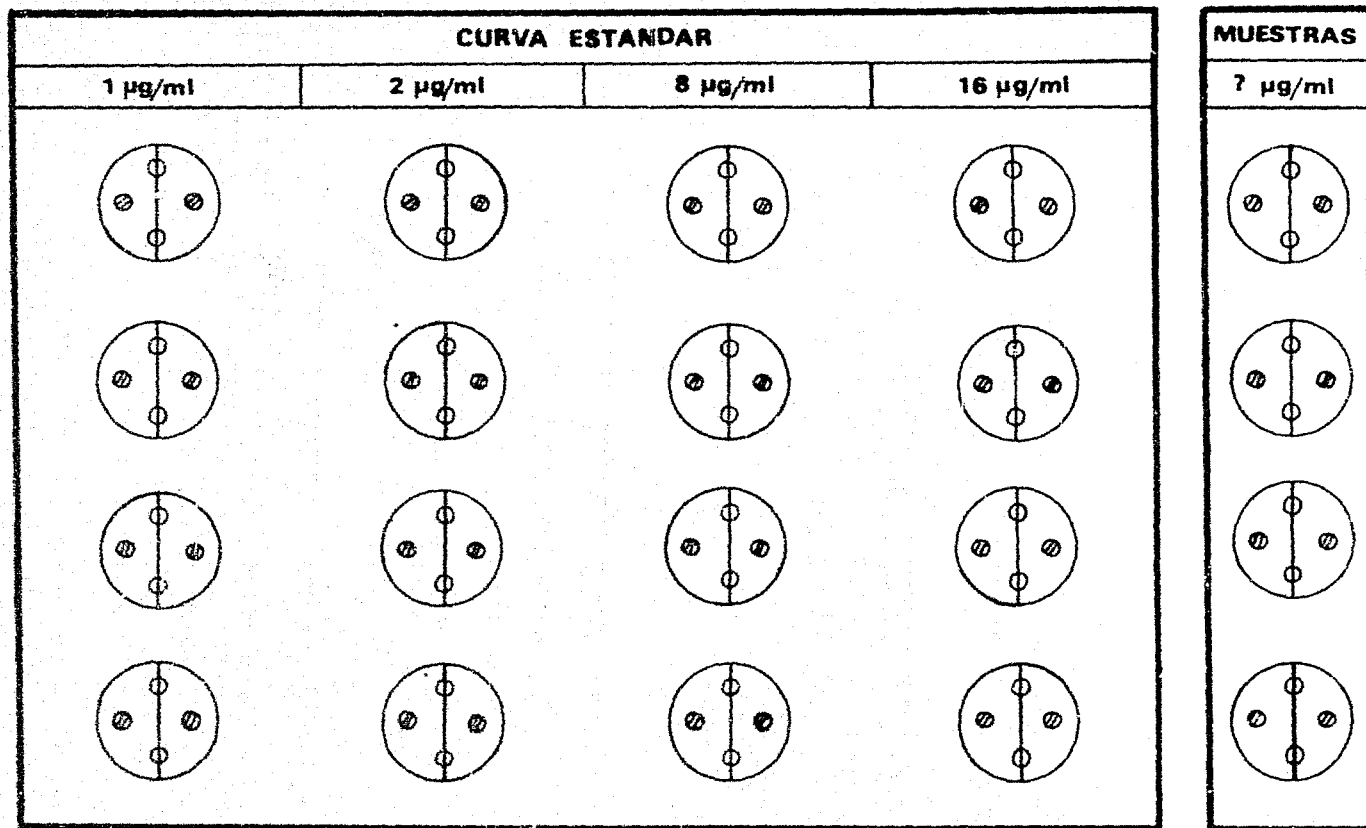
Como se observa en la figura No. 1, en cada una de las cajas se colocaron cuatro discos de papel filtro (Schleicher & Shuell 740-E de 6.35 mm.); dos de estos se impregnaron con un volumen de 0.02 ml. de la solución del PR y otros dos se impregnaron con un volumen igual de una de las soluciones de concentración conocida.

Las soluciones se aplicaron a los discos utilizando capilares (Dade B-4415-2A) previamente calibrados y marcados para utilizarse como micropipetas. Se hace notar, que en el momento en que se colocaba el disco sobre la placa de agar, éste se impregnaba inmediatamente con el volumen de las soluciones, de lo contrario el disco absorbía humedad del medio nutritivo y no aceptaba el volumen total de la solución.

De esta forma quedaban para la curva estándar 32 discos impregnados con la solución de PR y 2 discos de cada una de las soluciones de concentración conocida.

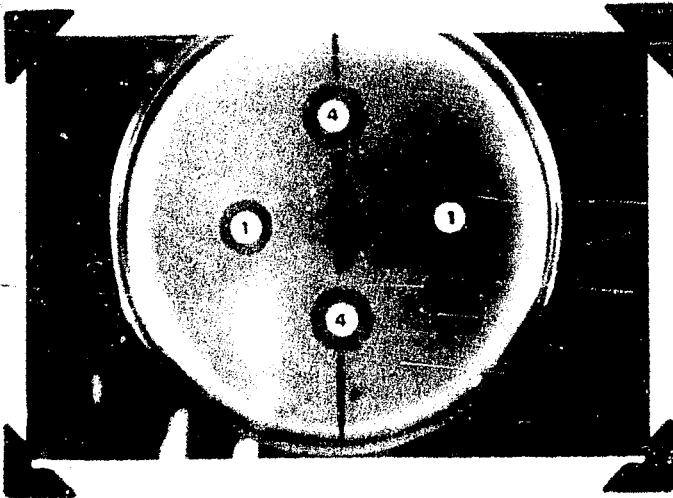
Después de haber hecho lo anterior, las cajas se invirtieron y se colocaron a temperatura constante ($37^{\circ}\text{C}.$) durante 16-18 hs. y posteriormente se hizo la lectura de los halos de inhibición logrados. (Ver las fotos 1 y 2).

FIGURA 1

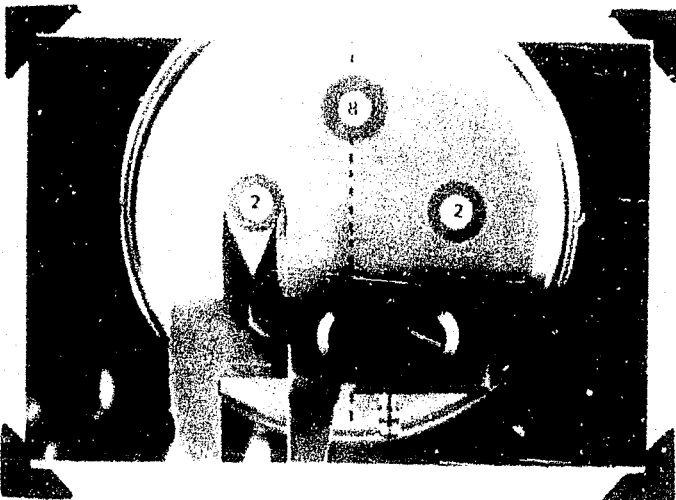


○ Concentración media de la curva 4 $\mu\text{g/ml}$ (PR)

● Concentraciones conocidas o muestras problema



No. 1.-La fotografía muestra los halos de inhibición logrados por la concentración de 1 mcg/ml, en la curva estándar que se hizo con soluciones en plasma, siendo el PR = 4 mcg/ml.



No. 2.- En esta fotografía se muestra la forma en que se medien los halos de inhibición logrados.

e) Lectura de los valores de la curva estándar y corrección del sistema.

Las lecturas se hicieron de la siguiente forma: cada una de las cajas se colocó en un cuenta colonias (DARKFIEL QUEBEC Modelo 3330) y se midieron los halos de inhibición logrados por las soluciones de concentración conocida con un vernier de una aproximación de 0.1 mm.; los datos se anotaron en tablas para después hacer las correcciones. (Ver tabla No. 2)

f) Corrección de las lecturas

En cada grupo de 4 cajas de una misma concentración, se obtuvieron 8 valores para la concentración del PR y 8 valores de la concentración correspondiente a ese grupo, de los cuales se calculó por separado la suma y el promedio, Ver tabla No. 2.

Para corregir todo el sistema, se obtuvo la suma total de los 32 valores del PR y también su promedio total, al que se comparó con el promedio del PR obtenido en cada uno de los grupos de cajas para las concentraciones conocidas y la diferencia que se obtuvo entre el PR total y el de los 8 valores de una concentración ya fuera positiva o negativa, era la corrección que debía hacerse al valor promedio de las lecturas de las concentraciones conocidas por ejemplo:

Promedio total del PR	= 16.48 mm.
Promedio del PR obtenido del grupo de cajas para la concentración de 1 mcg/ml.	= 16.61 mm.
Factor de corrección (Diferencia)	= -0.13 mm.
Valor promedio de los halos de inhibición para la concentración de 1 mcg/ml.	= 13.88 mm.
Factor de corrección	= -0.13 mm.
Valor corregido	= 13.75 mm.

Cuando el promedio del PR obtenido en el grupo de cajas de concentración conocida era menor que el promedio total del PR, entonces en vez de restarse el factor de corrección se sumaba al valor promedio obtenido en esa concentración. (Ver la tabla 2 en la concentración de 2 y 8 mcg/ml.)

f) Trazo de la curva estándar.

Esta curva se trazó con los valores corregidos de los halos de inhibición que se obtuvieron en cada una de las concentraciones y con el promedio general del PR; teniéndose así cinco puntos, que se inscribieron en papel semilogarítmico de dos ciclos, anotándose en las abscisas las lecturas de los halos de inhibición expresados en mm. y en las ordenadas la concentración del antimicrobiano en mcg/ml.

Para obtener la línea de regresión a fin de realizar un trazo rectilíneo, se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5}$$

Para el punto bajo.

$$H = \frac{3a + 2d + c - e}{5}$$

Para el punto alto.

Donde:

- a = Al halo de inhibición logrado por la concentración menor conocida, expresada en mm (1 mcg/ml).
- b = Al halo de inhibición logrado por la concentración de 2 mcg/ml.
- c = Al halo de inhibición logrado por la concentración de 4 mcg/ml.
- d = Al halo de inhibición logrado por la concentración de 8 mcg/ml.
- e = Al halo de inhibición logrado por la concentración de 16 mcg/ml.

Ya obtenidos los valores del punto bajo y el alto se inscriben y se traza la curva de regresión (17, 21) Ver tabla No. 2 y la gráfica No. 1

TABLA No. 2

LECTURA DE LOS VALORES DE LA CURVA ESTANDAR Y CORRECCION DEL SISTEMA

SOLUCIONES ACUOSAS DE SISOMICINA

MEDIO DE CULTIVO:

Ant. Medium No. 2, pH=8.1

MICROORG. DE PRUEBA:

B. subtilis al 0.04 %

DISCOS DE:

6.35 mm. de diámetro.

CAPA NIVELADORA:

Con 10 ml.

CAPA INOCULADA:

Con 4 ml.

SUMA

PROMEDIO

CORRECCION

PR	1	PR	2	PR	8	PR	16
16.70	14.20	16.30	14.90	16.20	17.60	16.40	18.80
16.80	14.30	16.40	15.00	16.00	17.40	16.40	18.70
16.50	13.70	16.80	14.80	16.40	17.70	15.90	19.00
16.30	13.50	16.80	15.30	16.40	17.50	15.90	19.10
17.00	14.10	16.50	15.20	16.00	17.60	16.70	18.50
17.00	13.90	16.40	14.90	15.90	17.90	16.70	18.40
16.20	13.80	16.30	15.20	17.00	18.10	17.00	18.80
16.40	13.60	16.30	14.90	16.80	17.70	17.00	18.70
132.90	111.10	131.80	120.20	130.70	141.50	132.00	150.00
16.61	13.88	16.47	15.02	16.33	17.68	16.50	18.75
-0.13	13.75	+0.01	15.03	+0.15	17.83	-0.02	18.73

1- a = 13.75

2- b = 15.03

4- (PR) c = 16.48

8- d = 17.83

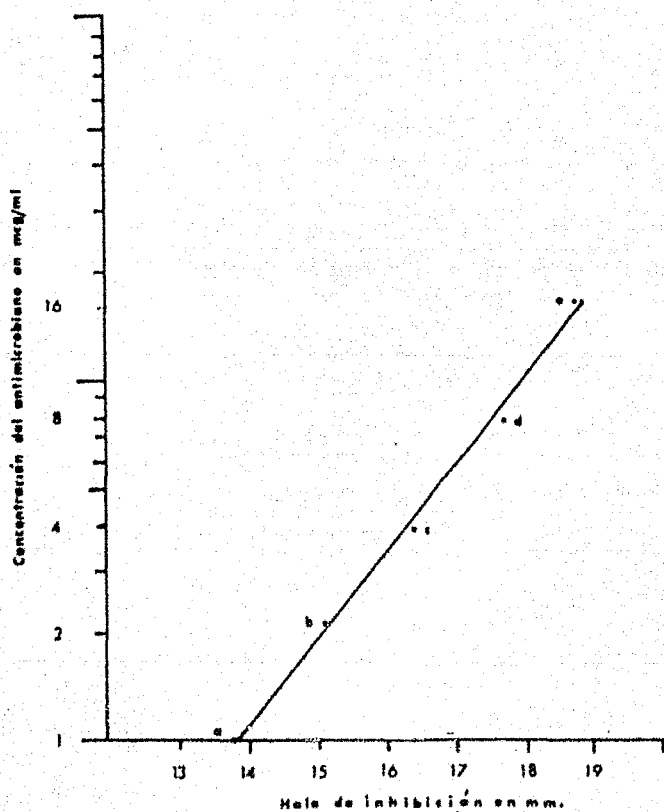
16- e = 18.73

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 13.81$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 18.91$$

SUMA TOTAL DEL PR (4) = 527.4

PROMEDIO TOTAL DEL PR (4) = 16.48



Gráfica No. 1.- Curva estándar de Sisomicina con soluciones acuosas, de concentración 1, 2, 4(PR), 8 y 16 mcg/ml. (Curva baja)

3) Verificación de la reproducibilidad del modelo estándar, al utilizar solventes orgánicos, (plasma y líquido cefalorraquídeo).

Para observar si el modelo estándar era reproducible, se preparó material para curvas estándar en las que se utilizó plasma y líquido cefalorraquídeo para hacer las diluciones a partir de la solución madre (SM de 1 000 mcg/ml) como se muestra en las tablas 3 y 4 .

El plasma o líquido cefalorraquídeo que se utilizaron para hacer las diluciones se obtuvieron de diferentes sujetos y fueron probados previamente contra el microorganismo de prueba para observar que no tuvieran actividad contra éste y luego fueron mezclados y filtrados con papel filtro Millipore (DAUP 047 00 25 es. DA 0.65u Millipore) y guardados en congelación hasta el momento de usarse.

Al observar que se obtenían curvas estándar semejantes se procedió a hacer la cuantificación del antimicrobiano. (Ver gráficas 2, 3, 4, y 5).

4) Método de administración del antimicrobiano: dosis, vía, frecuencia y toma de muestras.

Se administró una dosis de Sisomicina de 4 mg/kg/día por vía intramuscular, repartiéndose en dos porciones para apli-

TABLA No. 3

PREPARACION DE SOLUCIONES DE SISOMICINA UTILIZANDO COMO SOLVENTE PLASMA

Concentraciones para las curvas estándar:

Curva baja: 1, 2, 4 (PR), 8 y 16 mcg/ml.

Curva alta: 2, 4, 8 (PR), 16 y 32 mcg/ml.

Solución Madre (M) 20 mg. activos de Sisomicina (34.8 mg.) + 20 ml. de agua* 1 000 mcg/ml.
 Solución (I) 0.5 ml. de (M) + 4.5 ml. de plasma 100 mcg/ml.

Solución:	Procedimiento	Concentración en mcg/ml.	Volumen inicial (ml.)	Volumen final (ml.)
1	0.8 ml. de (I) + 1.7 ml. de plasma.	32	2.5	1.3
2	1.2 " " (1) + 1.2 " " "	16	2.4	1.0
3	1.4 " " (2) + 1.4 " " "	8 (PR)	2.8	1.5
4	1.2 " " (3) + 1.2 " " "	4 (PR)	2.4	1.6
5	0.8 " " (4) + 0.8 " " "	2	1.6	1.1
6	0.5 " " (5) + 0.5 " " "	1	1.0	1.0

* Agua destilada estéril

TABLA No. 4

PREPARACION DE SOLUCIONES DE SISOMICINA UTILIZANDO COMO SOLVENTE LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO

Concentraciones para las curvas estándar:

Curva baja: 1, 2, 4 (PR), 8 y 16 mcg/ml.

Curva alta: 2, 4, 8 (PR), 16 y 32 Mcg/ml.

Solución Madre (M) 20 mg. activos de Sisomicina (34.8 mg.) + 20 ml. de agua* 1 000 mcg/ml.
 Solución (I) 0.5 ml. de (M) + 4.5 ml. de L. C. R. 100 mcg/ml.

Solución:	Procedimiento	Concentración en mcg/ml.	Volumen inicial (ml.)	Volumen final (ml.)
1	0.8 ml. de (I) + 1.7 ml. de L. C. R.	32	2.5	1.4
2	1.1 " " (1) + 1.1 " " "	16	2.2	1.0
3	1.2 " " (2) + 1.2 " " "	8 (PR)	2.4	1.4
4	1.0 " " (3) + 1.0 " " "	4 (PR)	2.0	1.3
5	0.7 " " (4) + 0.7 " " "	2	1.4	0.9
6	0.5 " " (5) + 0.5 " " "	1	1.0	1.0

* Agua destilada estéril

L. C. R. = Líquido cefalorraquídeo

cerlas una cada doce horas, durante un período de diez días en niños que debían reunir las siguientes características: recién nacidos y que por su estado de salud ameritaban ser tratados con Sisomicina según el criterio de los pediatras, ya que el microorganismo causal de la enfermedad solo era sensible a este antimicrobiano y además que durante el tratamiento no se les administrara ningún otro. Este estudio se hizo en veinte niños cuya edad fue de tres a veintisiete días ($Sx=4.9$) y su peso de 1 800 g. a 3 750 g. ($Sx=443$), en camados en la sección de neonatología de la unidad 503 del Hospital General de México de la S. S. A.

Para determinar los niveles de la Sisomicina en plasma, se tomaron muestras de sangre en la siguiente forma: antes de la iniciación del tratamiento (muestra previa); a la primera hora. El segundo día y el tercero, las muestras se tomaron inmediatamente antes de la dosis matutina (previa) y una hora después de la inyección.

También se tomaron muestras de líquido cefalorraquídeo para determinar el nivel de Sisomicina, obteniéndose solamente dos muestras por punción lumbar (método obligado en el diagnóstico de procesos infecciosos de recién nacidos); la primera muestra se tomó antes del tratamiento y otra una hora después de la primera inyección del tercer día.

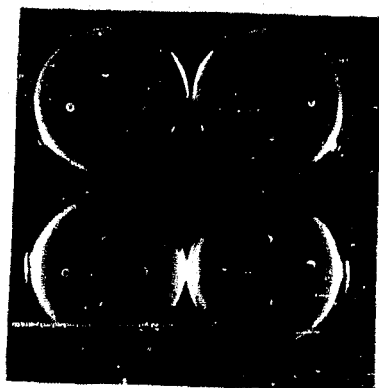
Para la toma y conservación de las muestras, se utilizaron capilares heparinizados (Dade B-4415-2a). Para la obtención de plasma se tomaban muestras de sangre, tomándose ésta por punción con microlancetas estériles (B-D Microlance No. 419). Las muestras de líquido cefalorraquídeo se obtuvieron por punción lumbar hecha por los pediatras.

De cada una de las muestras tanto de plasma como de líquido cefalorraquídeo, se obtuvieron de tres a cuatro capilares los que se sellaron por uno de sus extremos.

Las muestras de sangre se centrifugaron en microcentrífuga para la obtención del plasma y en seguida se mantuvieron en congelación, lo mismo que las muestras de líquido cefalorraquídeo hasta el momento en que se iba a cuantificar el antimicrobiano.

5) Cuantificación del antimicrobiano.

Cada vez que se tenía que determinar la concentración de la Sisomicina en el suero y líquido cefalorraquídeo de los niños, se preparaba todo el material necesario para usarlo fresco. La cuantificación se hacía utilizando dos sistemas con diferentes rangos de concentración para construir dos curvas estándar; una baja (1-16 mcg/ml) y otra alta (2-32 mcg/ml), Ver fotos 3 y 4 y las gráficas 2, 3, 4 y 5, con el fin de efectuar la lectura en aquella curva en la que el halo de inhibición de los problemas fuera más parecido



No. 3.- En esta fotografía se muestran los halos de inhibición logrados en la curva estándar de concentraciones bajas hecha con soluciones en plasma.



No. 4.- En esta fotografía se muestran los halos de inhibición logrados en la curva estándar de concentraciones altas hecha con soluciones en plasma.

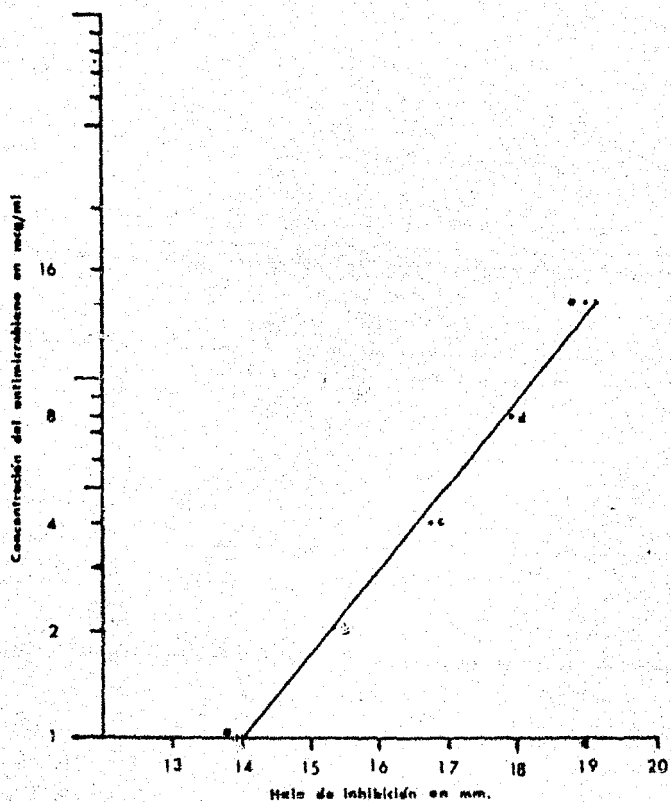


Gráfico No. 2.- Curva estándar de Sisomicina con soluciones en plasma, para la lectura del sujeto S-3. (Curva baja).

DATOS CORRESPONDIENTES A LA GRAFICA No. 2

LECTURA DE LOS VALORES DE LA CURVA ESTANDAR Y CORRECCION DEL SISTEMA (CURVA BAJA)

SOLUCIONES DE SISOMICINA EN PLASMA

MEDIO DE CULTIVO:

Ant. Medium No. 2, pH=8.1

MICROORG. DE PRUEBA:

B. subtilis al 0.04 %

DISCOS DE:

6.35 mm. de diámetro.

CAPA NIVELADORA

Con 10 ml.

CAPA INOCULADA:

Con 4 ml.

SUMA

PROMEDIO

CORRECCION

PR	1	PR	2	PR	8	PR	16
16.90	14.40	16.80	15.10	16.50	19.00	16.70	18.70
17.00	13.70	16.90	15.60	16.90	17.70	17.00	19.70
16.70	13.90	16.80	14.90	16.80	17.70	16.60	18.90
16.70	14.10	17.00	15.60	16.80	17.70	16.60	19.10
16.70	14.00	16.80	15.70	16.80	17.90	16.60	18.00
16.70	14.20	17.00	15.30	16.80	17.60	17.00	19.40
17.20	13.80	16.90	15.80	16.00	17.20	16.70	19.00
17.20	14.00	16.30	15.00	16.00	17.20	17.00	19.20
135.10	112.10	134.50	123.00	132.60	142.00	134.20	152.00
16.88	14.01	16.81	15.37	16.57	17.75	16.77	19.00
-0.12	13.89	-0.05	15.32	+0.19	17.94	-0.01	18.99

$$1- \quad a = 13.89$$

$$2- \quad b = 15.32$$

$$4- (PR) \quad c = 16.76$$

$$8- \quad d = 17.94$$

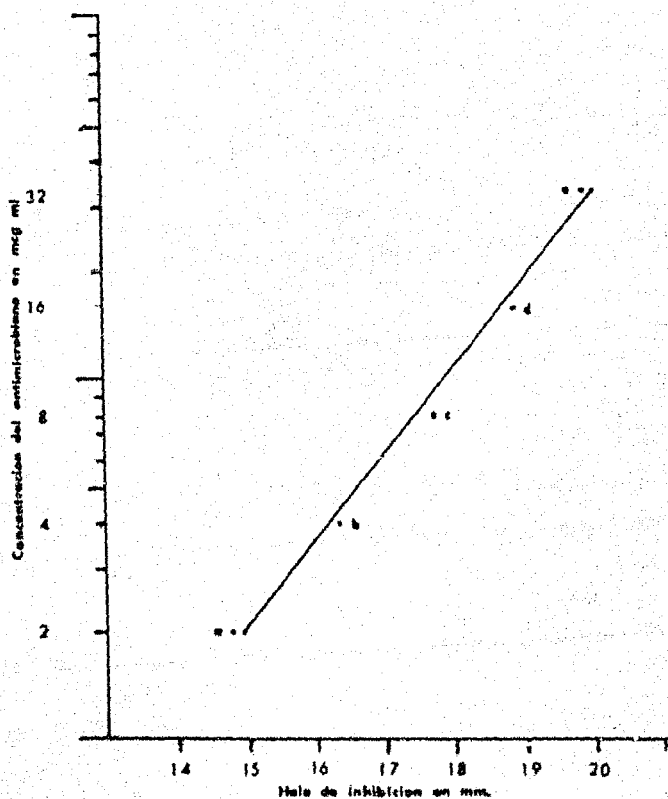
$$16- \quad e = 18.99$$

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 14.01$$

$$H = \frac{3a + 2d + c - b}{5} = 19.14$$

$$\text{SUMA TOTAL DEL PR (4)} = 536.40$$

$$\text{PROMEDIO TOTAL DEL PR (4)} = 16.76$$



Gráfica No. 3.- Curva estándar de Sisomicina con soluciones en plasma, de concentraciones 2,4,8(PR), 16 y 32 mcg/ml. (Curva alta).

DATOS CORRESPONDIENTES A LA GRAFICA No. 3

LECTURA DE LOS VALORES DE LA CURVA ESTANDAR Y CORRECCION DEL SISTEMA (CURVA ALTA)

SOLUCIONES DE SISOMICINA EN PLASMA

MEDIO DE CULTIVO:

Ant. Medium No. 2, pH = 8.1

MICROORG. DE PRUEBA:

B. subtilis al 0.04 %

DISCOS DE:

6.35 mm. de diámetro.

CAPA NIVELADORA:

Con 12 ml.

CAPA INOCULADA:

Con 4 ml.

SUMA

PROMEDIO

CORRECCION

PR	2	PR	4	PR	16	PR	32
17.90	14.60	17.80	16.40	17.90	18.90	17.60	19.90
17.80	14.50	14.70	16.50	17.90	18.70	17.70	19.80
17.70	14.80	17.90	16.60	17.60	19.00	17.80	19.70
17.70	14.70	17.80	16.50	17.60	18.80	17.80	18.80
17.90	14.70	17.60	16.40	17.70	18.80	17.90	20.00
17.90	14.60	17.60	16.30	17.80	19.00	17.90	20.00
17.60	14.80	17.90	16.40	17.40	18.90	17.80	19.80
17.60	14.80	17.90	16.40	17.90	18.90	17.70	19.90
142.10	117.50	142.20	131.50	141.80	151.00	142.20	158.90
17.76	14.68	17.77	16.43	17.72	18.87	17.77	19.86
-0.01	14.67	-0.02	16.41	+0.03	18.90	-0.02	19.84

$$2- \quad a = 14.67$$

$$4- \quad b = 16.41$$

$$8- (PR) \quad c = 17.75$$

$$16- \quad d = 18.90$$

$$32- \quad e = 19.84$$

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 14.94$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 20.07$$

$$\text{SUMA TOTAL DEL PR (8)} = 568.30$$

$$\text{PROMEDIO TOTAL DEL PR (8)} = 17.75$$

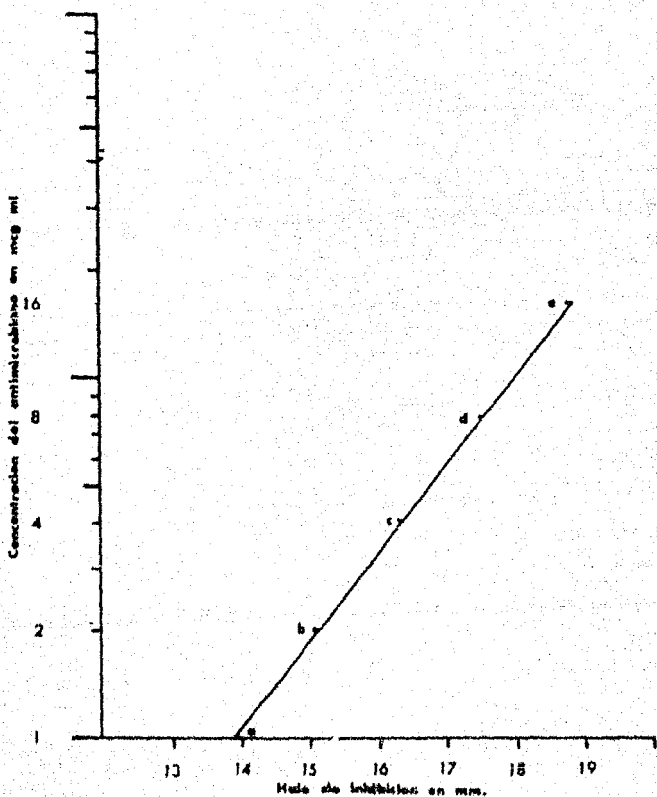


Gráfico No. 4.- Curva estándar de Sisomicina con soluciones en L.C.R. para las lecturas del sujeto S-3. (Curva baja).

DATOS CORRESPONDIENTES A LA GRAFICA No. 4

LECTURA DE LOS VALORES DE LA CURVA ESTANDAR Y CORRECCION DEL SISTEMA (CURBA BAJA)

SOLUCIONES DE SISOMICINA EN L. C. R.

MEDIO DE CULTIVO;

Ant. Medium No. 2, pH = 8.1

MICROORG. DE PRUEBA:

B. subtilis al 0.04 %

DISCOS DE:

6.35 mm. de diámetro.

CAPA NIVELADORA:

Con 10 ml.

CAPA INOCULADA:

Con 4 ml.

PR	1	PR	2	PR	3	PR	16
16.00	13.70	16.80	15.40	17.00	17.50	16.20	19.30
16.00	13.40	16.80	14.70	17.00	18.40	16.50	18.30
16.80	14.00	16.70	15.90	16.40	17.70	15.90	18.70
16.80	14.20	16.20	15.00	16.70	17.70	16.50	18.70
16.90	14.40	16.20	14.60	16.40	17.50	16.40	19.00
16.60	14.40	16.50	15.00	16.00	17.90	16.70	19.00
16.30	13.70	16.00	14.90	16.60	17.50	16.20	18.00
16.30	14.00	16.00	14.90	15.90	16.90	16.40	18.70
SUMA	131.70	111.60	131.20	120.40	132.00	141.10	149.70
PROMEDIO	16.46	13.95	16.40	15.05	16.50	17.63	18.71
CORRECCION	-0.04	13.91	+0.02	15.07	-0.08	17.55	+0.07

1- a= 13.91

2- b= 15.07

4- (PR) c= 16.42

8- d= 17.55

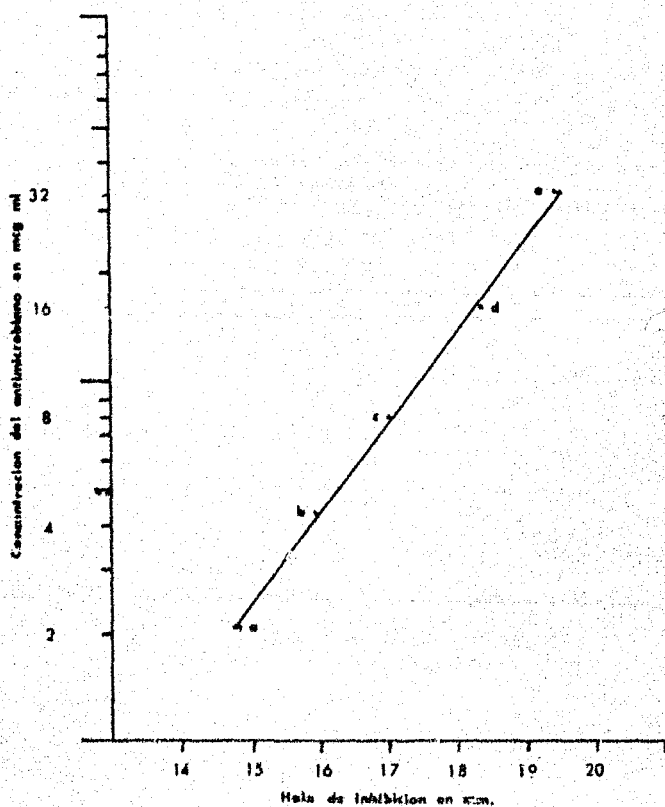
16- e= 18.78

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 13.90$$

$$K = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 18.79$$

SUMA TOTAL DE PR (4) = 525.70

PROMEDIO TOTAL DEL PR (4) = 16.42



Gráfica No. 5.- Curva estándar de Sinomicina
con soluciones de L.C.R. de concentración
2, 4, 8(PR), 16 y 32 mcg/ml. (Curva alta).

DATOS CORRESPONDIENTES A LA GRAFICA No. 5

LECTURA DE LOS VALORES DE LA CURVA ESTANDAR Y CORRECCION DEL SISTEMA

(CURVA ALTA)

SOLUCIONES DE SISOMICINA EN L. C. R.

MEDIO DE CULTIVO:

Ant. Medium No. 2, pH = 8.1

MICROORG. DE PRUEBA:

B. subtilis al 0.04%

DISCOS DE:

6.35 mm. de diámetro.

CAPA NIVELADORA:

Con 12 ml.

CAPA INOCULADA:

Con 4 ml.

SUMA

PROMEDIO

CORRECCION

PR	2	PR	4	PR	16	PR	32
17.20	14.60	17.30	16.20	16.90	18.50	17.20	19.70
17.30	14.90	17.30	16.10	17.20	18.60	17.40	19.70
17.30	15.00	17.40	15.90	17.40	18.40	16.90	19.40
17.20	14.70	17.40	15.90	17.40	18.40	17.10	19.90
15.90	14.80	17.20	16.30	17.20	18.80	17.30	19.70
16.90	14.60	17.40	16.30	16.90	18.80	17.40	19.70
17.40	14.90	17.20	15.90	17.30	18.50	17.40	19.80
17.40	14.80	17.30	16.00	17.20	18.40	17.20	19.80
137.60	118.30	138.50	128.60	137.50	148.40	137.90	157.70
17.20	14.78	17.31	16.07	17.18	18.55	17.23	19.71
+0.03	14.81	-0.08	15.99	+0.05	18.60	0.00	19.71

2- a = 14.81

4- b = 15.99

8- (PR) c = 17.23

16- d = 18.60

32- e = 19.71

$$L = \frac{3a + 2b + c - e}{5} = 14.78$$

$$H = \frac{3e + 2d + c - a}{5} = 19.75$$

SUMA TOTAL DEL PR (8) = 551.5

PROMEDIO TOTAL DEL PR (8) = 17.23

al de la concentración media de la curva estándar y no recurrir a hacer diluciones de la muestra como en el método de Grove y Randall.

En cada una de las cajas con muestra problema se medía el halo de inhibición logrado (dos datos) y también el logrado por el PR (dos datos), como se muestra en la tabla No. 5 del caso No. 3 que se anexa para ejemplificar.

Estos datos también se corrigieron de la misma forma en que se hizo para los datos de la curva estándar.

Los valores de los halos de inhibición logrados por las muestras problema de plasma, ya corregidos, se interpolaban en la curva de regresión adecuada (baja o alta), para determinar el nivel de Sisomicina.

Los resultados así obtenidos se concentraron en una tabla (tabla No. 6) trazándose una curva de absorción y excreción de la Sisomicina (Ver la gráfica No. 6).

Para la construcción de esta curva se calculó la media de los datos obtenidos en cada uno de los casos y también su desviación estándar. (17, 21).

TABLA No. 5 .

SISOMICINA SCH 13475

SUJETO S-3 DOSIS 6.5 mg/12 h. NIVELES EN PLASMA Y L. C. R.

$\overline{PR}$ = 16.76 M = Muestra S = Suma P = Promedio C = Corrección
S A = Sin actividad L = Lectura - = No se pudo medir

	PR	M-0 antes	PR	M-1 1 h.	PR	M-2 3 hs.	PR	M-3 5 hs.	PR	M-4 8 hs.
	16.90	S A	16.60	14.00	16.50	13.70	16.80	13.00	16.40	13.20
	16.70	S A	16.00	13.70	16.90	14.70	16.90	13.20	17.00	13.10
S	33.60	S A	32.60	27.70	33.40	28.40	33.70	26.20	33.40	26.30
P	16.80	S A	16.30	13.85	16.70	14.20	16.85	13.10	16.70	13.15
C	-0.04	S A	+0.46	14.31	+0.06	14.26	-0.09	13.01	+0.06	13.21
L	Sin actividad		1.2 mcg/ml.		1.15 mcg/ml.		Menos de 1 mcg/ml.		Menos de 1 mcg/ml.	

	PR	M-5 12 hs.	PR	M-6 antes	PR	M-7 1 h.	PR	M-8 antes	PR	M-9 1 h.
	16.70	12.00	16.40	12.30	16.60	12.30	16.50	12.50	16.80	14.00
	15.80	11.70	16.00	11.50	16.80	12.30	-	12.60	16.80	15.60
S	33.50	23.70	32.40	23.80	33.40	24.60	16.50	25.10	33.60	29.60
P	16.75	11.85	16.20	11.90	16.70	12.30	16.50	12.55	16.80	14.80
C	+0.01	11.86	+0.56	12.46	+0.06	12.36	+0.26	12.81	-0.04	14.76
L	Menos de 1 mcg/ml.		Menos de 1 mcg/ml.		Menos de 1 mcg/ml.		Menos de 1 mcg/ml.		1.5 mcg/ml.	

LIQUIDO CEFALORRAQUICO 48 hs. después de iniciado el tratamiento

	PR	M-0 antes	PR	M-1 48 hs.
	16.00	S A	16.80	13.50
	16.70	S A	16.70	13.60
S	32.70	S A	33.50	27.10
P	16.35	S A	16.75	13.55
C	+0.41	S A	+0.01	13.56
L	Sin actividad		Menos de 1 mcg/ml.	

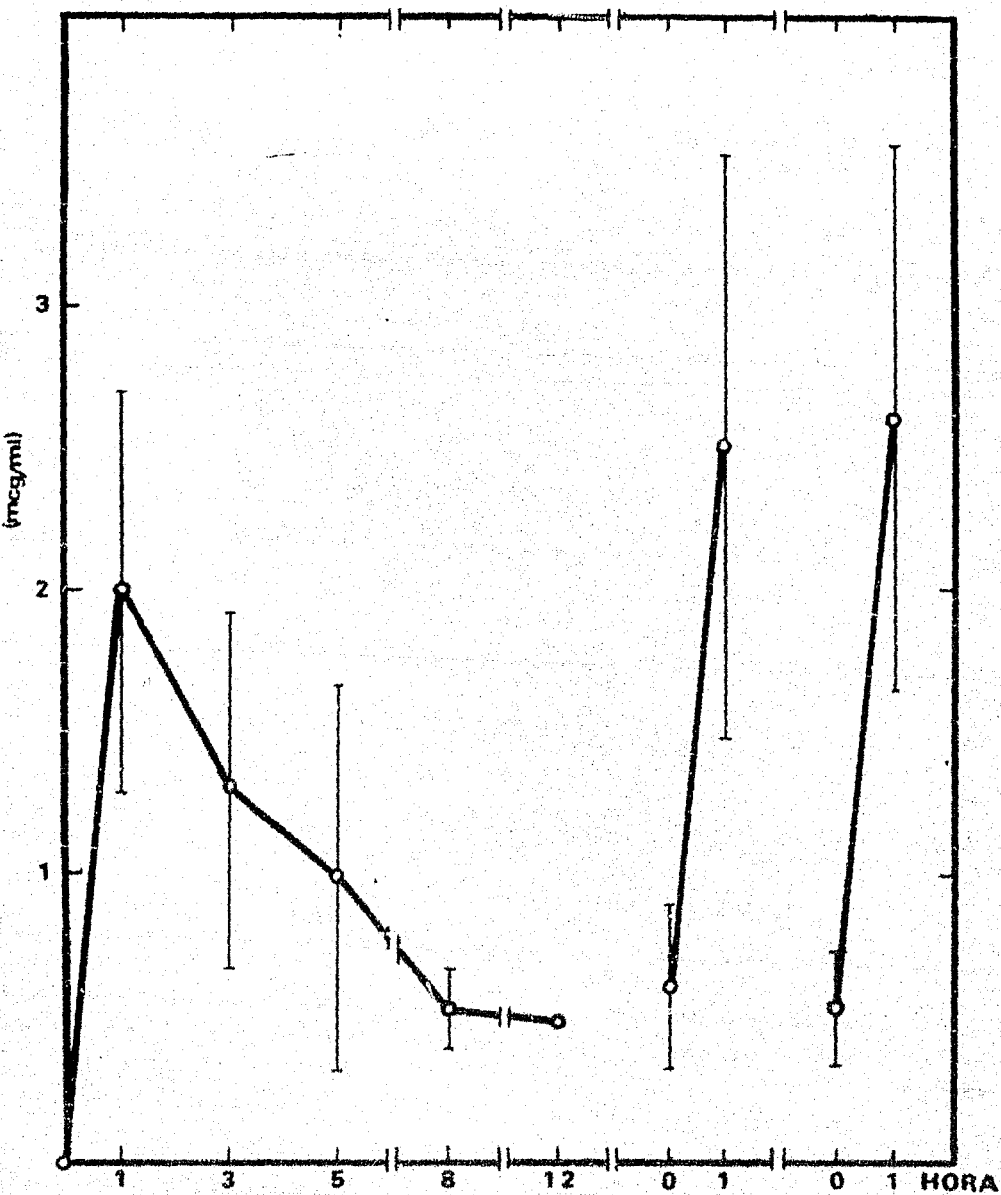
RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE LOS NIVELES EN PLASMA DE LA SISMICINA EN NIÑOS RECIENTE NACIDOS

CASO	PRIMER DIA										SEGUNDO DIA				TERCER DIA			
	1 hora		3 horas		5 horas		8 horas		12 horas		previa		1 hora		previa		1 hora	
	x	x ²	x	x ²	x	x ²	x	x ²	x	x ²	x	x ²	x	x ²	x	x ²	x	x ²
1	2.50	6.25	1.45	2.10	1.20	1.44	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.70	2.89	<1.0 0.5*	0.25	4.70	22.09
2	1.20	1.44	1.15	1.32	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.50	2.25
3	2.95	8.71	2.00	4.00	1.20	1.44	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	3.30	10.89	<1.0 0.5*	0.25	2.75	7.56
4	1.65	3.42	<1.0 0.5*	0.25	1.60	1.00	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.60	6.76	<1.0 0.5*	0.25	3.00	9.00
5	1.60	2.56	1.05	1.10	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.30	1.69	1.75	3.06	<1.0 0.5*	0.25	2.30	5.29
6	2.20	4.84	1.95	3.80	1.05	1.10	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	3.40	11.56	<1.0 0.5*	0.25	2.70	7.29
7	2.75	7.56	1.75	3.06	1.00	1.00	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.05	4.20	<1.0 0.5*	0.25	1.95	3.80
8	1.70	2.89	1.65	2.72	1.05	1.10	1.00	1.00	<1.0 0.5*	0.25	1.30	1.69	4.20	17.64	<1.0 0.5*	0.25	4.20	17.64
9	1.95	3.80	1.70	2.89	1.05	1.10	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.30	1.69	3.30	10.89	1.45	2.10	2.80	7.84
10	1.70	2.89	1.05	1.10	1.05	1.10	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.70	2.89	<1.0 0.5*	0.25	3.50	12.25
11	2.50	6.25	1.75	3.06	3.40	11.56	1.10	1.21	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.35	5.52	<1.0 0.5*	0.25	2.00	4.00
12	1.20	1.44	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.70	2.89	<1.0 0.5*	0.25	1.40	1.96
13	1.30	1.69	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.37	1.87	<1.0 0.5*	0.25	1.10	1.21
14	2.60	6.76	<1.0 0.5*	0.25	1.60	2.56	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	4.50	20.25	<1.0 0.5*	0.25	2.60	6.76
15	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.50	6.25	<1.0 0.5*	0.25	2.20	4.84
16	1.20	1.44	1.10	1.21	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.20	4.84	<1.0 0.5*	0.25	2.30	5.29
17	1.80	3.24	1.40	1.96	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.20	4.84	-	-	-	-
18	1.95	3.80	1.50	2.25	-	-	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	1.90	3.61	<1.0 0.5*	0.25	1.85	3.42
19	2.60	6.76	1.60	2.56	1.15	1.32	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	2.40	5.76	<1.0 0.5*	0.25	2.80	7.84
20	3.60	12.96	2.00	7.84	1.40	1.96	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	<1.0 0.5*	0.25	4.30	18.49	<1.0 0.5*	0.25	3.60	15.21
Σ	40.65	92.34	26.40	42.22	19.65	28.43	11.10	6.71	10.00	5.00	12.40	9.32	49.92	145.35	10.45	6.60	49.55	145.34
Σ	2.03		1.32		1.03		0.55		0.5*		0.62		2.49		0.55		2.60	
(Σx) ²	1652.42		696.96		386.12		123.21		100.00		153.76		2492.00		109.20		2455.20	
S _x	0.69		0.60		0.65		0.16		0.00		0.28		1.01		0.21		0.92	

* Valor arbitrario dado a las muestras que contenían menos de 1 mcg/ml de Sismicina

TABLA No. 6

GRAFICA No. 6



Para determinación del nivel de Sisomicina en líquido cefalorraquídeo se procedió de igual manera que con las muestras de plasma, pero los datos de los halos de inhibición logrados se interpolaron en la curva estándar que se hacía utilizando líquido cefalorraquídeo como solvente para hacer las soluciones de concentración conocida. (Ver tabla 4 y gráficas 4 y 5).

De los datos obtenidos del nivel de Sisomicina en líquido cefalorraquídeo no se obtuvo una curva de absorción y excreción debido a que solamente se tenían dos muestras de cada uno de los casos.

IV RESULTADOS

Las curvas estándar hechas con soluciones conocidas de Sisomicina en las que se utilizó como solvente agua, plasma y líquido cefalorraquídeo son reproducibles. Por emplearse un método biológico estandarizado se consideró, que el micro método probado es útil para determinar concentraciones de un antimicrobiano en volúmenes de 0.02 ml. de muestra con un límite de confiabilidad del 95 %, por lo que se procedió a determinar los niveles en plasma y líquido cefalorraquídeo de la Sisomicina en niños recién nacidos, cuyos resultados se muestran en seguida.

En la tabla No. 6 se muestran los niveles hemáticos expresados como promedio de veinte casos y su desviación estándar. Se observa en la curva de absorción y excreción de la Sisomicina (Ver gráfica No. 6) que la concentración máxima en plasma fue de 2.0 mcg/ml. y fue encontrada una hora después de aplicar la inyección; en seguida hubo un descenso paulatino. En todos los casos se encontró que después de doce horas todavía se apreciaba actividad del antimicrobiano, que por ser ésta siempre menor de 1 mcg/ml. se les dio un valor arbitrario de 0.5 mcg/ml. y por esta razón, la desviación estándar de este punto no se presenta.

Durante el primer día de tratamiento el promedio de la concentración hemática fue de 2.03 mcg/ml, pero en dos ca-

En los dos casos se encontraron concentraciones máximas de 2.60 mcg/ml (caso 14) y 3.60 mcg/ml (caso 20), una hora después de la primera administración de la Sisomicina.

En el segundo día, la concentración promedio encontrada a la hora fue de 2.49 mcg/ml pero al igual que en el primer día también se encontraron valores altos; uno de 4.50 mcg/ml (caso 14), y otro de 4.30 mcg/ml (caso 20) Ver tabla No. 6 que a la hora del primer día habían tenido 2.6 mcg/ml y 3.6 mcg/ml respectivamente.

Durante el tercer día, el valor promedio de sisomicina en suero fue de 2.6 mcg/ml en la primera hora; sin embargo también se encontraron casos que mostraron niveles hemáticos altos; el que había tenido un nivel hemático de 4.30 mcg/ml (caso 20) el segundo día; el tercer día tuvo un nivel de 3.9 mcg/ml, pero hay que hacer notar que este niño fue el de peso mas alto (3750 gr.); otro niño que no había mostrado niveles hemáticos altos en ninguna ocasión, el tercer día presentaba un nivel hemático de 4.7 mcg/ml (caso 1) aunque su peso fue de 1800 gr.

Los resultados del nivel de Sisomicina en líquido cefalorraquídeo fueron los siguientes: no hubo actividad en las muestras previas, en todas las muestras del tercer día se encontró un nivel menor de 1 mcg/ml.

V COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Como se observa en los resultados obtenidos, se puede decir que el micrométodo probado para cuantificar un antimicrobiano en muestras muy pequeñas es satisfactorio útil y aplicable a la práctica siempre y cuando se controlen las variables mencionadas al describir el método.

Este micrométodo probado tiene la ventaja de realizar determinaciones de concentración de antimicrobiano que en ciertos casos nos pueda proporcionar diferencias mínimas como son fracciones de microgramo. El empleo de correcciones estadísticas, estandariza los errores propios de un sistema biológico; por no requerir de material costoso y complicado, es accesible a cualquier laboratorio.

Este micrométodo nos permitió cuantificar el nivel en plasma y líquido cefalorraquídeo de la Sisomicina en niños recién nacidos, considerándose trato de gran importancia ya que se contribuye al conocimiento de la farmacocinética de este nuevo antimicrobiano de amplio espectro que tiene la ventaja de ser útil en el tratamiento de infecciones en las cuales no lo son otros antimicrobianos. Las características que debían reunir estos niños para ser tratados con Sisomicina, determinaron que el número de casos fuera solo de veinte.

VI RESUMEN

Se describe la prueba de un micrométodo para cuantificar un antimicrobiano en muestras muy pequeñas de plasma y líquido cefalorraquídeo, de 20 niños recién nacidos que presentaban cuadros infecciosos severos que ameritaban el tratamiento con antimicrobianos, de los cuales se escogieron aquellos cuyo microorganismo causal de la infección era sensible a la Sisomicina y no hubieran sido tratados con antimicrobianos.

El método utilizado para determinar el nivel en plasma y líquido cefalorraquídeo, fue una modificación para micrométodo del método biológico de Grove y Randall con el fin de trabajar con muestras de volúmenes de 0.02 ml.

Se probó la reproducibilidad de este micrométodo al hacer curvas estándar con soluciones conocidas de la Sisomicina utilizando como solvente el mismo que el de las muestras (plasma o líquido cefalorraquídeo).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente obteniéndose para cada uno de los casos la media y su desviación estándar, construyendo una curva de absorción y excre-

ción de la Sisomicina, contribuyendo así al conocimiento farmacocinético de antimicrobianos en niños recién nacidos.

VII ANEXO

ANEXO A.- SISOMICINA

Es un nuevo antimicrobiano del grupo de los aminoglucósidos, aislado de la fermentación producida por una nueva especie de un actinomiceta del género *Micromonospora*, llamada - *Micromonospora inyoensis*, descrita por primera vez por Weinstein et al, en 1970 (45).

La fórmula estereoquímica de la Sisomicina se muestra en la figura 1A (7).

Este antimicrobiano es producido como un elemento simple, muy similar a la Gentamicina C_{12} un componente del complejo de Gentamicina (C_{12} , $C_{1,2C}$) (44).

Los estudios "in vitro" de este aminoglucósido muestran que su espectro antimicrobiano es similar al de la Gentamicina, pero es más activo que aquel, particularmente sobre especies de *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus* indol positivo (4, 8, 20, 32, 43, 44, 45).

Excepto para *Pseudomonas*, las bacterias resistentes a la Gentamicina, generalmente también son resistentes a la -

SISOMICINA

The chemical structure of Sisomicina is a complex molecule consisting of three pyranose rings linked by ether bridges. The first ring is a 2-amino-6-(aminomethyl)-2,4-dihydroxy-3H-pyran-3-yl group. The second ring is a 2,6-diamino-3,4-dihydroxy-2-methyltetrahydropyran-3-yl group. The third ring is a 2,3,4,6-tetrahydro-2H-pyran-2-yl group with methyl and hydroxyl substituents. The structure is labeled with various atoms and groups: CH₂NH₂, H_D, NH₂, H_E, O, NH₂, HO, NH₂, O, H_C, HO, H_B, H_A, Me, NH, Me, OH.

FIGURA 1A

Sisomicina. Algunos estudios comparativos entre la Sisomicina y la Gentamicina, han mostrado que la primera es de dos a cuatro veces más efectiva y que su dosis letal media (LD_{50}) en ratas, ratones y cobayos fue del 50% al 75% menor que la reportada para gentamicina.

También se han hecho estudios para conocer su toxicidad, observandose que es más vestibulo tóxica en gatos que en cobayos y que es tan nefrotóxica como la gentamicina en perros, pero más nefrotóxica en ratas y gatos. (42).

ANEXO B

Preparación del Microorganismo de prueba.

Previa verificación de la pureza del Bacillus subtilis, se inocularon dos cajas de petri con medio nutritivo (antibiotic medium No. 1 Difco), éstas cajas con inóculo masivo, se mantuvieron a 37°C durante 24 hrs. y con ese primer cultivo se inocularon dos botellas de Roux que contenían 300 ml. de medio nutritivo cada una (Antibiotic medium No. 1 Difco).

Removiendo el cultivo de las cajas de petri con 10 ml. de solución salina estéril, procurando recoger la mayor cantidad posible, se preparó una suspensión de bacterias que se repartió uniformemente en la superficie del medio nutritivo de las botellas de Roux.

Las botellas se mantuvieron a 37°C durante una semana para dar lugar a la esporulación. El cultivo se cosechó de las botellas de Roux con 30 ml. de agua destilada estéril, pasando el producto a tubos con tapón de caucho esterilizados; éstos se colocaban en un baño de agua a temperatura de 65°C, durante 30 minutos, después se centrifugaron a 3 000 rpm. durante 15 minutos, eliminando el sobrenadante, y se le agregó nueva-

mente agua destilada estéril; el tubo se agito y se colocó otra vez a 65°C ; el proceso de calentamiento y lavado se hizo tres veces y después solamente se centrifugó y eliminó el sobrenadante reconstituyendo el agua las veces que fue necesario hasta observar que quedara completamente límpido. Ya obtenido el concentrado de esporas, se conservó en refrigeración a una temperatura de $4-8^{\circ}\text{C}$; para su uso posterior.

Para determinar la concentración a la que debía usarse el concentrado de esporas, se probaron diferentes diluciones a partir del concentrado original, (Ver tabla No. 1 B) preparándose dos cajas de petri con una primera capa (capa niveladora) de 10 ml. de medio nutritivo (Antibiotic Medium No. 2 Difco), para cada una de las concentraciones de esporas a probar; ya solidificada ésta, se vertía la segunda capa (capa inoculada) de 4 ml. de medio nutritivo y la concentración de esporas, tratando de revolverla perfectamente con el medio fundido a una temperatura de 60 a 65°C . Cuando la segunda capa se solidificó, las cajas se mantuvieron a 37°C durante 18 hrs. y se determinó la concentración de esporas adecuada; la selección de ésta concentración se hizo observando las cajas que presentarían un desarrollo uniforme.

Procedimiento para determinar la concentración a la que debe utilizarse el concentrado de esporas original de B. subtilis (Microorganismo de prueba)

Suspensiones de esporas:

A	Concentrado de esporas original	100 %
I	0.5 ml. de (A) + 4.5 ml. de agua destilada estéril	10 %
II	0.5 ml. de (I) + 4.5 ml. de agua destilada estéril	1 %

Concentraciones a probar:	Volumen necesario para 100 ml. de gelosa	Volumen necesario para 8 ml. de gelosa (para 2 cajas)
0.5 %	5 ml. de (I)	0.4 ml. (I)
0.4 %	4 ml. de (I)	0.32 ml. (I)
0.3 %	3 ml. de (I)	0.24 ml. (I)
0.2 %	2 ml. de (I)	0.16 ml. (I)
0.1 %	10 ml. de (II)	0.8 ml. (II)
0.05 %	5 ml. de (II)	0.4 ml. (II)

TABLA No. 1B

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, T. G., and Troyanovsky. 1960. Antibiotic testing by the disk method. Antibiot. Annu. 1959-1960:587-595.
2. Bower, A. W., et al. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol. 45:493-496.
3. Bennet, J. V., J. L. Brodie, E. J. Benner, and W. H. Kirby. 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. Appl. Microbiol. 14:170-177.
4. Benveniste, P., and J. Davies. 1973. Structure-Activity relationships among the aminoglycoside antibiotics: role of hydroxyl and amino groups. Antimicrob. Ag. Chemother. 4:402-409.
5. Cassady, G. 1966. Plasma volume studies in low birthweight infants. Pediatr. 36:1020-1027.
6. Chang, M. J., et al. 1975. Kanamycin and Gentamicin treatment of neonatal sepsis and Meningitis. Pediatr. 56:696-699.
7. Cooper, D. J., R. S. Jarst, and H. Reimann. 1971. Structure of Sisomicin unsaturated aminoglycoside antibiotic from Micromonospora inyoensis. Chem. Commun. 1971:285-286.
8. Crowe, C. C. and E. Sanders. 1973. Sisomicin: evaluation in vitro and comparison with Gentamicin and Tobramycin. Antimicrob. Ag. Chemother. 3:24-28.
9. Davies, W. W., and T. R. Stant. 1971. Disk plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. Appl. Microbiol. 22:659-665.
10. Ericsson, H. M., and J. C. Sherris. 1971. Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (Suppl. B.) 217:61.

11. Gale, E. F., et al. 1972. The molecular basis of antibiotic action. John Wiley and Sons. London. 456.
12. Garrod, L. P., H. P. Lambert, and F. O'Grady. 1973. Antibiotic and Chemotherapy. Fourth ed. Churchill Livingstone. Edinburgh. 546.
13. Gaven, T. L., H. W. McFadden Jr., and E. L. Cheattle. 1971. Antimicrobial susceptibility testing. American Society of Clinical Pathologists. Inc. Chicago Illinois. 244.
14. Goodman, L. S., y A. Gilman. 1974. Bases farmacológicas de la Terapéutica. 4a. ed. Nueva Editorial Interamericana, S. A. de C. V. México. 1972.
15. Goth, A. 1973. Farmacología Médica. 6a. ed. Interamericana. México. 718.
16. Grove, D. C., and Rendall. 1955. Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. Medical Encyclopedia, Inc. New York.
17. Hill, B. A. 1965. Principios de estadística médica. 3a. ed. "El Ateneo", Buenos Aires. 365.
18. Howard, J. B., and G. H. McCracken, Jr. 1975. Pharmacological evaluation of Amikacin in neonates. Antimicrob. Ag. Chemother. 8:86-90.
19. Howard, J. B., and G. H. McCracken. 1975. Reappraisal of Kanamycin usage in neonates. Pediatr. 86:949-956.
20. Hyman, M. S., Simberkoff, and J. J. Rahal Jr. 1973. In vivo bactericidal effectiveness of four aminoglycoside antibiotics. Antimicrob. Ag. Chemother. 3:87-94.
21. Ipsen, J., Feigl, P., Bancroft's. Introduction to Biostatistics Second ed. A. Harper International Edition. 185-189.
22. Klein, J. D., M. Harrechel, R. M. Therakan, et al. 1971. Gentamicin in serious neonatal infections: Absorption, excretion and clinical results in 25 cases. J. Infect. Dis. 124:5224.

23. Levison, M. E., and D. Kays. 1974. In vivo comparison of four aminoglycoside antibiotics: Sisomicin, Gentamicin, Tobramycin and BB-M8. Antimicrob. Ag. Chemother. 5:667-669.
24. Liberman, D. F., J. Fitzgerald, and R. G. Robertson. 1974. Rapid disk test determining Clindamycin serum levels. Antimicrob. Ag. Chemother. 5:458-461.
25. Lund, M. E., D. J. Blazevic, and J. M. Matsen. 1973. Rapid Gentamicin bioassay using a multiple-antibiotic-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob. Ag. Chemother. 4:569-573.
26. Mantel, N. 1951. Rapid estimation of standard errors of means for small samples. Amer. Stat. 5:26-27.
27. McCracken, G. H., Jr., and Jones L. G. 1970. Gentamicin in the neonatal period. Am. J. Dis. Child. 120:524.
28. McCracken, G. H., West H. R., Horton, L. J. 1971. Urinary excretion of Gentamicin in the neonatal period. J. Infect. Dis. 123:257-262.
29. McCracken, G. H. Jr., D. F. Chrons, H. L. Thomas. 1971. Pharmacologic evaluation of Gentamicin in newborn infants. J. Infect. Dis. 124:S214.
30. Meyers, F. H., E. Jawetz, and A. Golfian. 1968. Review of medical pharmacology. Lange. Medical Publications. California. 692.
31. Nunery, A. W., Riley H. D. 1969. Gentamicin: Clinical and Laboratory studies in infants and children. J. Infect. Dis. 119:460-464.
32. O'Hara, K., M. Kono, and Mitsuhashi. 1974. Enzymatic inactivation of a new aminoglycoside antibiotic Sisomicin by resistant strains of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Ag. Chemother. 5:558-561.
33. Pratt, W. B. 1973. Fundamentals of Chemotherapy. Oxford University Press. New York. 332.

34. Riley, H. D., T. Rubio, Hinz W. et al. 1971. Clinical and laboratory evaluation of gentamicin in infants and children. J. Infect. Dis. 124:5236.
35. Rodríguez, V., G. P. Bodey, M. Valdivieso, and R. Feld. 1975. Clinical pharmacology of sisomicin. Antimicrob. Ag. Chemother. 7:38-41.
36. Sabath, L. D., and I. Toftegaard. 1974. Rapid microassays for Clindamycin and Gentamicin when present together and the effect of pH and of each on the bacterial activity of the other. Antimicrob. Ag. Chemother. 6:54-59.
37. Simon, H. J., and E. J. Yin. 1970. Microbioassay of antimicrobial agents. Appl. Microbiol. 19:573-579.
38. Smith, D. H., B. Van Otto, A. L. Smith. 1972. A rapid chemical assay for gentamicin. N. Engl. J. Med. 286:564.
39. Smith, A. L., I. R. Rosenberg, D. H. Smith, B. B. Emerson. 1975. Enzymatic microassay of chloramphenicol. Pediatr. Res. 9:345.
40. Stevens, P., L. S. Young, and W. L. Hewitt. 1975. Improved acetylating radioenzymatic assay of Amikacin, Tobramycin, and Sisomicin in serum. Antimicrob. Ag. Chemother. 7:374-376.
41. Stroy, S. A. 1969. Modified microbiological assay for rapid estimation of antibiotic concentrations in human sera. Appl. Microbiol. 18:31-34.
42. Wagman, G. H., R. T. Tusta, and J. A. Marquez. 1970. Antibiotic 6640 II. Fermentation, isolation, and properties. J. Antibiot. 23:555-559.
43. Waitz, J. S. 1973. Interrelationship between disk and tube dilution sensitivity test for aminoglycoside antibiotics: Gentamicin, Kanamycin, Sisomicin, and Tobramycin. Antimicrob. Ag. Chemother. 4:445-454.

44. Weitz, J. A., E. L. Moss, Jr., E. M. Oden, and M. J. Weinstein. 1970. Antibiotic 6640, a new broad-spectrum aminoglycoside antibiotic. J. Antibiot. 23:559-565.
45. Weinstein, M. J., J. A. Marquez, R. T. Testa, G. H. Wagman, E. M. Oden, and J. A. Weitz. 1970. Antibiotic 6540, a new micromonospora-produced aminoglycoside antibiotic. J. Antibiot. 23:551-554.