

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Facultad de Química y Farmacia

VALORACION DEL ANTIBIOTICO ESTREPTOMICINA  
ESTUDIO DE LOS METODOS PARA  
SU DOSAJE

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Química por

Hector Enrique Cammarota

1951



P A D R I N O   D E   T E S I S

Psor.Dr; JOSE MARIA DE LA BARRERA

1951

A MIS PADRES

---

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Facultad de Química y Farmacia

Valoración del Antibiótico Estreptomicina.

Estudio de los métodos para  
su dosaje

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor en Química por

Héctor Enrique Cammarota

1951

## CAPITULOS

- I ) Introducción histórica.
  - II ) Estructura química del antibiótico.
  - III ) Diferentes métodos para su valoración en líquidos orgánicos.
  - IV ) Estudio de diferentes agentes químicos que influyen en la valoración.
  - V ) Nuevo método para el dosaje.
  - VI ) Aplicaciones.
  - VII ) Resumen.
  - VIII ) Conclusiones.
  - IX ) Bibliografía.
-

I ) Introducción Histórica

## a ) Generalidades sobre el antibiótico.-

El término " antibiosis " define un hecho conocido desde hace mucho tiempo; el antagonismo entre distintos microbios.

Un antibiótico - dice el Dr. Alfredo Sordelli - puede ser definido de la siguiente manera: " es una sustancia específica producida por un ser viviente que tiene la propiedad de ser activa contra un microbio ".(A)

Existen antecedentes muy antiguos de la existencia de tales sustancias en el tratamiento de las enfermedades humanas, antes de que se conociera con precisión su etiología y naturaleza. Recordaremos entre estos antecedentes el uso de las infusiones de la corteza de la quina y su introducción en la medicina occidental en 1639 por Juan del Vego, cuando la aplicara para curar las fiebres de la condesa del Chincón. Así comienza el uso de la ipecacuana, desde el año 1639, para el tratamiento de la disentería. Fueron Pelletier y Magendie en 1817 y Caventou y Pelletier en 1820 quienes obtuvieron de la ipecacuana y de la quina , sustancias químicas definidas y de acción específica: la emetina y la quinina, que merecieron el nombre de antibióticos. Antes del comienzo de este siglo, el investigador italiano Gosio - 1896 - estudiando las posibles causas de la enfermedad conocida bajo el nombre de pelagra, obtuvo de la harina de maíz, alterada por el crecimiento de un hongo ( Penicillium ), una sustancia cristalina que tenía la propiedad de inhibir el crecimiento del B. Antracis.

Esta sustancia, conocida hoy bajo el nombre de ácido micofenólico; sería el primer antibiótico de origen microbiano.

Poco después del hallazgo de Gosio, Emmerich y Low ( 1899 ), obtienen y aplican la piocianasa, producto de cultivo de la bacteria piocianica, que se usa en la terapéutica de las afecciones de las fauces por aplicación local, siendo su uso continuado hasta el año 1937, año en que es posible conocer su fabricación y uso, especialmente en Alemania.

Posiblemente el hecho más significativo en esta historia se produce con el hallazgo de Dubos ( 1939 ) quien, por el tratamiento de los líquidos de cultivo de una bacteria aislada de una gra-

mínea y que resultó ser luego el B. brevis, obtuvo una sustancia bastante pura y cristalina designada como Gramicidina.

Después de los hallazgos de Jenner, Pasteur y Behring, la terapéutica de las enfermedades infecciosas fué concebida con los conocimientos y métodos de la inmunidad, y la aplicación de un suero o de una vacuna era considerada como la solución más efectiva. Los fracasos de la aplicación de los sueros y vacunas para ciertas enfermedades y la imposibilidad de obtener dichos medicamentos para otras, fueron en cierto modo olvidados por el advenimiento de la quimioterapia. Los éxitos logrados con el Salvarsán y luego con el Neosalvarsán abrieron el camino a una nueva esperanza. Sin embargo, poco de importancia fué añadido al descubrimiento de Ehrlich ( 1905 ) por mucho tiempo y sólo cabría mencionar a la octoquina y algunos productos de su familia, que se los conocía activos contra el pneumococo.

Mucho más tarde se descubre el 205 y luego los antipalúdicos Atebrina y Plasmoquina, todos muy activos contra protozoarios pero ninguno prácticamente contra las verdaderas bacterias. En 1935, con el hallazgo de Domagk, se adquiere la certeza de que las enfermedades producidas por bacterias pueden ser tratadas por sustancias químicas, sintéticas en este caso, por su aplicación sistemática ( Prontosil ).

La aparición de la sulfamida y sobre todo de la 693-MB sulfapiridina, en 1938, fueron el comienzo de una nueva era en el pensamiento de los farmacólogos, químicos y clínicos. Desde entonces existió la convicción de que se podían encontrar sustancias que, interfiriendo con los procesos normales del metabolismo de los microbios, podían impedir su multiplicación o destruirlos, aún en condiciones en que no son tóxicas para los animales superiores huéspedes de aquéllos. (1)

Puede decirse que el mundo se encontraba preparado para el gran descubrimiento, que así merece ser llamado el de la Penicilina ( 1929, Alexander Fleming ).

Se creyó entonces resuelto el problema de la cura de los procesos microbianos en el hombre. Se vió después que, si bien la medicina se había enriquecido con un poderoso agente para la lucha contra las infecciones, estaba lejos de ser la esperada terapéutica general y muchos microorganismos escapaban a su acción.

Una serie de estudios iniciados en 1939 por Waksman sobre la producción por microorganismos del suelo, de sustancias antibióticas que detienen el crecimiento ( bacteriostáticas ) y o lo destruyen ( bactericidas ) de ciertas especies bacterianas, condujeron al aislamiento en los cultivos de un hongo Streptomyces, de una sustancia con propiedades antibacterianas que se denominó Streptomycin y que presentó muchas similitudes con la Streptomycin, antibiótico que ya había sido aislado del Streptomyces.

Waksman y colaboradores habían estudiado las sustancias antibióticas que se obtenían con cultivos de diferentes hongos, pero llegaron a la conclusión de que es el Streptomyces Griseus la especie que produce el elemento más activo y útil en aplicaciones terapéuticas.

Desde el punto de vista cronológico es menester mencionar los estudios de Waksman sobre los actinomicetos, iniciados en 1915. En 1919 junto con Curtis logran el aislamiento del Actinomyces griseus, de una de cuyas subdivisiones, el Streptomyces griseus, deriva la estreptomycin. No obstante ser Waksman un perito en suelos se vio precisado a realizar tanto investigaciones de carácter industrial como de carácter agrícola. Entre ellas figuran sus trabajos sobre los tipos de microorganismos que oxidan el azufre, que han contribuido a los métodos de producción microbiana del ácido sulfúrico. Asimismo, Waksman estudió los hongos que producen ácido cítrico y ácido fumárico, así como varias enzimas producidas por hongos y actinomicetos. En 1931 fué llamado por el Instituto Oceanográfico Woods Hole para colaborar en la organización de una sección de bacteriología marítima y también ha ayudado a la marina de los EE.UU. a solucionar ciertos problemas bacteriológicos. En 1932 inició investigaciones sobre la suerte de bacterias tuberculosas en la tierra. En 1937 publicó tres comunicaciones sobre las relaciones antagónicas entre los microorganismos del suelo. En 1939 se produjeron dos acontecimientos que lo llevaron a poner en práctica su pensamiento: en ese año se anunció el descubrimiento de la tirotricina y en ese año también comenzó la guerra en Europa. (4)

Waksman sabía que la guerra haría indispensables nuevos medicamentos; así pues en 1939 refirmó el plan de trabajo, prosiguiendo con las investigaciones de carácter agrícola, pero juntamente con ellas instituyó un programa de investigaciones cuyo objeto era el de aislar las sustancias a las que dos años más tarde daría el nombre de antibióticos; es así que se llegó al descubrimiento - junto con Woodruff-

de la actinomicina, derivada del *Actinomyces antibioticus*, de la familia de las actinomicetáceas, pero desgraciadamente la sustancia es tóxica. Prosiguiendo con sus investigaciones, Waksman aisla en 1942 la estreptotricina, nombre derivado de una antigua denominación de los actinomices, esto es, estreptotricéas. La estreptotricina habái sido aislada de cultivos de *Streptomyces lavendulae*, otro miembro de los actinomices. Evidenciaba mayor acción contra los microorganismos gram negativos que contra los gram positivos.

En 1942 Waksman, junto con E.S.Horning y E.L. Spencer, dieron a conocer el aislamiento de otras dos sustancias: la fumigacina y la clavacina. Ambas eran elaboradas por miembros del género *Aspergillus*: la primera por el *Aspergillus fumigatus* y la segunda por el *Aspergillus clavatus*, pero la fumigacina, activa contra las bacterias gram positivas, resultaba tóxica, lo mismo que la clavacina. Mientras tanto, los estudios con la estreptomicina habían avanzado hasta el punto de que sus posibilidades parecían mayores de lo que habían parecido originariamente.

Waksman estaba obsesionado con la idea de encontrar una sustancia que fuera capaz de disolver la cápsula cérica que protege del ataque leucocitario al agente de la tuberculosis humana. A mediados de 1943, logra aislar dos razas de *Streptomyces griseus*. Una raza fué obtenida originalmente de la tierra de un campo fuertemente abonado y la otra de la garganta de un pollo que fué prestado por la sección de granja de la Estación Experimental. Ambos evidenciaban notable antagonismo contra el gram negativo *Escherichia coli*. Inmediatamente se estableció una unidad de potencia equivalente a la cantidad de filtrado de cultivo necesario para inhibir el desarrollo de una determinada raza de *Escherichia coli* en 1 ml de un medio de cultivo. Fué entonces posible valorar la potencia de cada nuevo filtrado a medida que se producía. Las primeras razas producían 200 unidades de estreptomicina, cantidad que disminuía con las nuevas generaciones a 75, es decir que tenían su mayor capacidad productora cuando era recién aislado de la tierra. La raza debilitada se sembró en tierra estéril y no sólo recobró su fortaleza sino que se produjeron varias razas nuevas. Se examinaron todas y se encontró que algunas podían conservar la propiedad de dar 200 unidades aún cuando se cultivaran generaciones sucesivas en medios artificiales. En colaboración con Bugie se estudiaron los medios de cultivo que mejor se prestaban para el *Streptomyces griseus*.

Se encontró que el medio ideal era el que contenía

glucosa, peptona, extracto de carne y cloruro de calcio. Se descubrió que el rendimiento aumentaba cuando se agitaban los cultivos. Posteriormente se realizaron experiencias in vivo utilizando embriones de pollo. Doris Jones inyectó un grupo de embriones con dosis letales de *Shigella gallinarum*, agente de la tifoidea de los pollos y luego inoculó la mitad de los huevos infectados con estreptomicina impura. Los embriones no tratados murieron y los tratados vivieron todos sin evidenciar toxicidad del medicamento. A principios de 1945 la casa Merck estaba produciendo pequeñas cantidades de estreptomicina; en 1947 la producción del medicamento había aumentado enormemente. Los 3.000 gramos por mes producidos en setiembre de 1945 en EE.UU. se transformaron en 1947 en 550.000 gramos. En ese año se conoció además la estructura química del antibiótico. (4)

El comité de quimioterapia americano para el estudio de la estreptomicina señaló su gran actividad sobre: *Pasteurella tularensis*; *Klebsiella pneumoniae* y sobre *Mycobacterium tuberculosis* tipo humano, pero la dificultad en el tratamiento de la tuberculosis a base de estreptomicina es la rápida adaptación del bacilo al antibiótico, que lo hace estreptomycinico resistente, sobre todo cuando el enfermo está sometido a fuertes dosis. La Neomicina es un poderoso antibiótico de acción intensa sobre el Koch pero tiene el mismo inconveniente.

En 1946 Peck, Brinck y Kuchl obtienen la dihidroestreptomicina, que tiene la particularidad de resistir la acción de los solventes alcalinos y de no ser inactivada por la cisteína. Así como la penicilina reveló que los antibióticos podían conquistar éxitos fabulosos, la estreptomicina, el más prometedor de los muchos antibióticos recién aislados, demuestra que las posibilidades de su acción son literalmente infinitas y asequibles a la investigación tesonera e infatigable.

Resumo en cuadro el número de antibióticos que se han obtenido a partir de los hongos del género *Streptomyces* : (3)

Estreptomicina	Actinorubina	Sulfactina
Manosidomicina	Antiesmegmatis	Microsporina
Griseína	Actinomicetina	Cloromicetina
Actidiona	Actinomicina	Aureomicina
Estreptotocina	Proactinomicina	Terramicina
Estreptolina	Musarina	Neomicina
Estreptina	Micetina	
Lavendulina	Litmocidina	

La estreptomicina es útil en el tratamiento de infecciones debidas a microorganismos gram negativos o ácido resistentes. Como todo agente antibacterico la estreptomicina debe considerarse com un coadyuvante de la cirugía o de cualesquiera otros métodos terapéuticos reconocidos que sean indicados y no como un sustituto de ellos.

Se recomienda la estreptomicina como una terapéutica coadyuvante en el tratamiento de :

Infecciones causadas por *Mycobacterium tuberculosis*;

*Hemophilus influenzae*

Meningitis; debida a cepas sensibles de *Salmonella*

Endocarditis, debida a agentes patógenos penicilino resistentes pero sensibles a la estreptomicina.

Meningitis, bacteriemia o infecciones de las vías urinarias debidas a cepas estreptomicino sensibles de :

*Escherichia coli*

*Proteus vulgaris*

Neumobacilo de Friedlaender.

*Aerobacter aerogenes*

*Bacillus piocyaneus*

Blenorragia -

Chancroide ( refractaria a las sulfonamidas ).

Granuloma inginal.

Tularemia.

La estreptomicina es por lo común útil en las siguientes condiciones :

Peritonitis - Abscesos hepáticos - Colangitis - Infecciones crónicas del pulmón - Empiema - Neumonia - Ciertas infecciones gastrointestinales causadas por cepas sensibles de *Salmonella* y *Shigella*.

La estreptomycinina necesita ser investigada aún con relación a:

Tuberculosis génitourinaria.

Linfadenitis tuberculosa - sin fístulas cutáneas.

Tuberculosis del pericardio, de los huesos, articulaciones, ojos o de la piel.

Brucelosis - en combinación con sulfadiazina.

La estreptomycinina no se recomienda en la actualidad para tratar las siguientes lesiones tuberculosas :

Fibroide o fibrocásea ( especialmente cavidades de paredes gruesas ), pulmonar terminal o destructiva aguda, pulmonar mínima o incipiente moderadamente avanzada con pronóstico favorable bajo tratamiento clásico, empiema crónico.

La estreptomycinina es de dudoso valor en el tratamiento de la fiebre tifoidea y en la mayoría de las infecciones a Salmonella.

La estreptomycinina es ineficaz en las infecciones a : Clostridios, Rickettsias, Plasmodios, virus, mohos y hongos.

Acción bacteriostática de la estreptomycinina :

Microbios gram positivos

Corynebacterium diphtheriae  
Mycobacterium tuberculosis ( v. hom.)  
Staphylococcus aureus  
Streptococcus homolyticus  
Streptococcus viridans

Microbios gram negativos

Brucella melitensis  
Salmonella typhi  
Escherichia coli  
Klebsiella pneumoniae  
Pasteurella tularensis  
Shigella paradysenteriae

Absorción La estreptomycinina pasa a la corriente sanguínea después de haber sido administrada por vía intramuscular o subcutánea. La vía intramuscular es la de elección; se usan diluciones en suero fisiológico. La vía subcutánea es también aplicada - pero el dolor y la reacción local limitan su uso.(2)

Debido a la poca absorción de la droga, la vía oral no se aplica. Se han usado vaporizaciones en el tratamiento de ciertas infecciones broncopulmonares, a la concentración de 50 mg por cc. de suero fisiológico y puede ser inhalado un total de 500 mg en 24 horas.

Excreción : La mayor parte es excretada por los riñones, a través de la orina. En pequeñas cantidades es excretada por la bilis, el líquido pleural, peritoneal y espinal.

Antes se acostumbraba expresar la potencia y la

dosis de estreptomicina en términos de unidades; sea :

Unidad S : es la cantidad de estreptomicina en solución capaz de inhibir el desarrollo del bacilo còli en el volumen de 1 cc.

Unidad L : la cantidad que inhibe el mismo cultivo en 1.000 cc.

Unidad G : equivalente en peso a 1.000.000 de U.S o 1.000 U.L.

Una unidad S es igual a un microgramo de estreptomicina.

Hoy toda potencia y dosis se expresa en términos del peso de la base.(2)

---

### Clasificación de los antibióticos

Las sustancias que se agrupan bajo la denominación de antibióticos son demasiado heterogéneas para que con ellas se pueda seguir una clasificación coordinada. Se pueden clasificar los antibióticos en cuatro grupos sobre la base de la solubilidad.

- a ) Solubles en agua y en éter a apropiada reacción : penicilina, flavicina, citrinina, etc.
- b ) Solubles en agua a diferentes reacciones e insolubles en éter : sustancias de tipo polipeptídico o proteínico.
- c ) Insolubles en agua y en éter : gramicidina, tirocidina, subtilina, etc.
- d ) Solubles en éter e insolubles en agua : fumigatina, gliotoxina, actinomicina, etc.

Entre los de composición química conocida se establecen los siguientes agrupamientos :

- Polipéptidos : gramicidina, tirocidina, etc.
  - Pigmentos : piocianina, fumigatina, actinomicina.
  - Derivados sulfurados : gliotoxina, quetomina, etc.
  - Cetonas y quinonas : espinolosina, clavacina, etc.
  - Bases orgánicas : estreptomina, proactinomicina.
  - Lípidos : piocianasa, etc.
-

Fabricación de estreptomina

En la fabricación industrial del antibiótico que nos ocupa, se ha encontrado ( Waksman S.A., Schulz A., J.Am.Pharm.Assoc.-34-273 (1945) que ligeras variantes en la composición del medio tienen gran importancia no sólo con la cantidad sino con la calidad del producto. El medio propuesto era- según se ha dicho en páginas anteriores -:

Glucosa	10 gr	
peptona	5	
extr. carne	5	
ClNa	5	
agua c.s.p.	1000 ml	pH : 6.5 - 7

Se había considerado la producción de estreptomina en un medio como estrechamente ligada a ciertas sustancias relacionadas con el extracto de carne. Se supuso que se trataba de bases guanidínicas indispensables para la formación normal de la estreptomina.

El mejor sustituto del extracto de carne parece ser el líquido de maceración del trigo o maíz germinado. Como sustituto de la glucosa se ha usado la glicerina y el almidón, con éxito, y como reemplazante de la peptona, la caseína. Con el crecimiento del *Streptomyces griseus*, el medio se vuelve gradualmente alcalino.

La producción de estreptomina parece ser específica del *S. griseus*. Las razas utilizadas tienen el inconveniente de ser altamente inestables. En cultivos activos se forman en ocasiones mutantes con una capacidad de formación de estreptomina notablemente disminuida. Estas mutantes tienden a experimentar una rápida lisis. Cuando se forman estas mutantes el medio se acidifica y se vuelve viscoso. La lisis tiene lugar en parte porque las mutantes inactivas del *Streptomyces griseus* son muy sensibles a la acción de la estreptomina, a diferencia de lo que sucede con las variedades activas, que tienen una gran resistencia. Según Waksman y Schulz, mediante selección y cultivo adecuado las mutantes inactivas pueden transformarse de nuevo en las formas esporuladas y activas; lo cierto es que, dado el estricto control que existe, las posibilidades de degeneración de las razas utilizadas en la práctica industrial son muy escasas.(5)

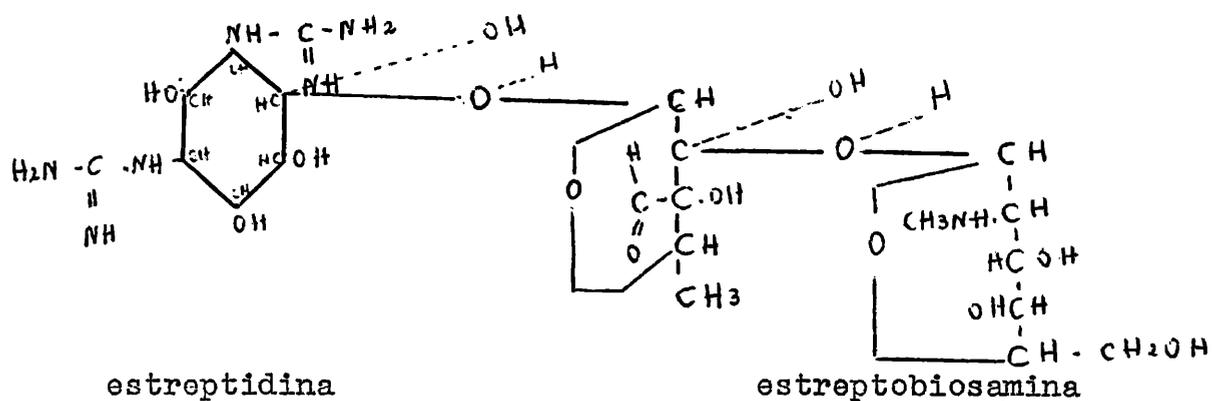
Cultivo y procesos industriales : El proceso de fermentación se comenzó utilizando el cultivo en superficie; después se ha adoptado también el cul-

tivo sumergido que, dadas las características aerobias del *S. griseus*, requieren una intensa aereación. La primera planta industrial montada por Merck & Co. en Elkton comenzó a funcionar en mayo de 1946. Con el fin de obtener una producción masiva del antibiótico se requiere la inoculación en gran cantidad de esporos. Se utilizan tanques de fermentación de 50.000 Hs; como en este proceso hay una formación de abundante espuma, se debe utilizar agentes antiespumantes que no sean tóxicos para el organismo de fermentación. Una vez fermentado el caldo, la parte insoluble se compone fundamentalmente de micelio, que es fino y gelatinoso. Es difícil separarlo por centrifugación y por filtración tiene el inconveniente de la obstrucción de los filtros. Se utilizan sustancias coadyuvantes de la filtración, cuya elección debe hacerse cuidadosamente, pues tienden a adsorber la estreptomicina. Se usan filtros prensas rotatorios prerrevestidos. El filtrado se adsorbe sobre carbón activo, en proceso continuo. Es fundamental para un buen rendimiento que no exista exceso ni defecto de C. El C rico en estreptomicina se separa del caldo agotado por filtración; luego el adsorbato se lava primero con alcohol y luego se trata con alcohol - ácido, luego se neutraliza el líquido ácido, con lo cual queda una solución purificada y con una concentración de 0.15 % de estreptomicina. El eluato neutro se concentra a temperatura cuidadosamente controlada, ya que el antibiótico es más inestable cuanto más concentrado. De la solución concentrada se puede precipitar el clorhidrato de estreptomicina por adición de disolventes (acetona) con lo que se obtiene un producto todavía impuro.(5)

La primera sal que se obtuvo prácticamente pura fue un derivado cristalino de la heliantina, a partir de la cual se obtenía un clorhidrato amorfo con una potencia de 800 unid/mg. Luego se utilizó en la purificación el ácido fosfotúngstico, el pícrico, etc., pero se comprobó que la sal mixta clorhidrato de estreptomicina - cloruro de calcio presenta la forma más adecuada de cristalización y presentación del antibiótico. La estreptomicina también se obtiene industrialmente trabajando inicialmente con cultivo sumergido. Dado lo reciente de la práctica industrial de este proceso, todavía es prematuro para decidir qué tipo de proceso se impondrá finalmente.

II ) Estructura Química

La estreptomicina es una base compleja producida por fermentación en medios especiales de cultivo, usando cepas de *Streptomyces griseus* adecuadas a la producción de Estreptomicina A. Es una base guanidínica con un grupo inositol y dos hidratos de carbono unidos en forma glucosídica : (6) (7)

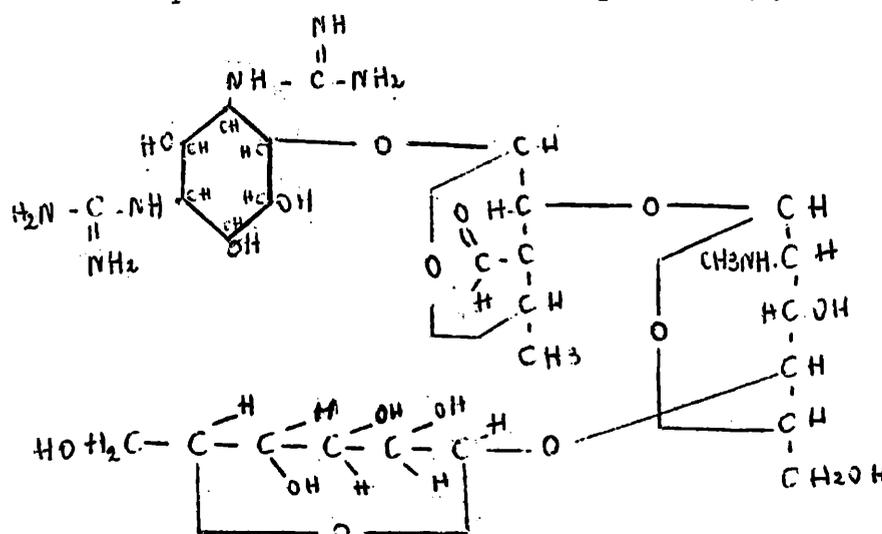


De los líquidos de fermentación se solubiliza la estreptomicina por filtración ácida y se adsorbe sobre carbón activo a pH : 7, se eluye luego por ácido y se precipitan impurezas al punto de solubilidad de éstas y se combina a otras sustancias formando complejos que contienen estreptomicina y pocas impurezas. El precipitado se disuelve en solventes orgánicos y por medio de resinas de intercambio iónica se elimina el precipitante utilizado, quedando la estreptomicina en solución ácida sea como clorhidrato o sulfato. La solución es desecada por liofilización después de filtración estéril.

La estreptomicina es insoluble en éter, cloroformo y acetona. Es soluble en agua.

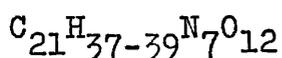
Es termoestable, resistiendo calentamientos de 80 a 100°C sin perder en forma apreciable su actividad.

El mismo *Streptomyces griseus* produce una estreptomicina B que es el Manósidoestreptomicina, de fórmula :



La dihidroestreptomicina se distingue de la estreptomicina A, que es la comercialmente usada, por tener el grupo aldehídico transformado en grupo alcohólico, por reducción con hidrógeno por medio de un catalizador.

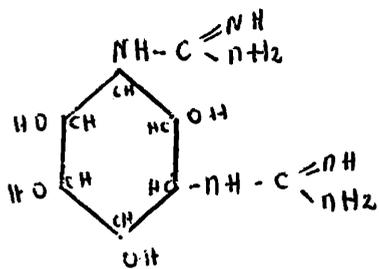
Mediante el empleo de métodos especiales ha sido posible obtener sales cristalizadas de estreptomicina con elevado grado de pureza. Hoy se sabe que el antibiótico es una base fuerte constituida por C, H, N, O, no entrando en su constitución S ni P. Para la estreptomicina base se ha propuesto la siguiente fórmula empírica:



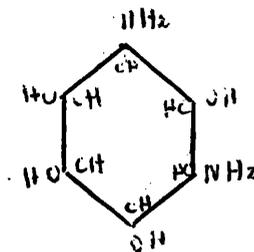
( Peck R.L., Brunk N.G., Flynn C.H., Folkers K. )

Por procedimientos adecuados se degrada en dos porciones básicas: estreptidina y estreptobiosamina, unidas por una ligadura glucosídica.(7)

Estreptidina : Es la 1-3 diguanidino-tetrahidroxiciclohexano ( $C_{18}H_{18}N_6O_4$ ) que por hidrolisis alcalina libera la : estreptourea y la estreptoamina ( 1-3 diamino tetrahidroxiciclohexano ). Esta última es ópticamente inactiva y guarda estrecha relación química con el mesoinositol. ( Carter H.E., Clark R.K. jr., Dickman S., Loo J.H., Meek J.S., Shell P.S. ).

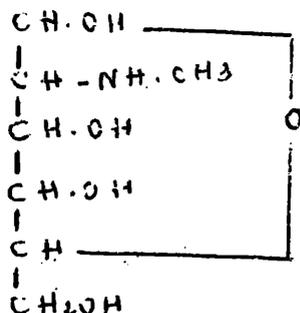


Estreptidina  
1-3 diguanidino 2-4-5-6 tetrahidroxi-  
ciclohexano.



Estreptomina  
1-3 diamino 2-4-5-6 tetrahidroxi-  
ciclohexano.

Estreptobiosamina : Es un disacárido nitrogenado que libera como producto de degradación la : N-metil-1-glucosamina. ( Brunck y colab., Flynn C.H., Holly F.W., Mozongo R. y Folker K. ).



Se ignora a qué parte de la molécula corresponden las propiedades bacterios-

táticas y bactericidas.

El dicloruro de estreptomina en concentración de 1 mg/cc, no mostró efectos antibacterianos, aunque en concentración de 10 mg/cc tiene una cierta acción inhibidora sobre el *B. subtilis*. ( Peck R.L., Graber R.P., Walti A., Hoffhine Ch. ).

La existencia de más de una estreptomina fué su-  
puesta por Madigan y Brownlee, quienes en 17 lotes diferentes encuentran una sustancia no identificada que provoca síntomas y signos tóxicos agudos en el ratón ( Lancet 1947 ).

Recientemente Fried y Titus han aislado de los con-  
centrados de estreptomina una base con propiedades antibacterianas que de-  
signan con el nombre de Estreptomina B.

Mediante el método cromatográfico de purificación  
se encuentra esta fracción, que es menos activa, que tiene una potencia de  
150-200 unidades S ( microgramos ) por miligramo. Se la obtiene como cloru-  
ro de estrptomina B en forma de polvo amorfo.

En la actualidad se está estudiando su eficacia en  
infecciones experimentales y en la clínica.

---

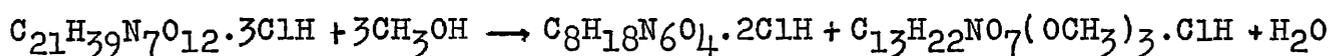
La degradación de la Estreptomina y dihidroestreptomina con metanol. (8)

Carter, Clark y Hooper han estudiado la reacción  
de la estreptomina y el ácido clorhídrico en solución de metanol y obtu-  
vieron un sólido amorfo. El clorhidrato de estreptomina así logrado fué  
separado por la acción de metanol anhidro conteniendo ácido clorhídrico en :  
estreptidina y metil estreptobiosamina-dimetil acetal hidrocioruro, el cual  
por acetilación dió : metil-tetra-acetil-estreptobiosamina-dimetil acetal.  
Se demostró además que la mitad de la estreptobiosamina de estreptomina  
poseía un grupo metilamino y también un grupo libre o potencial carbonilo,  
lo que se demostró en la preparación de la oxima y semicarbazona de hidro-  
cloruro de estreptomina, por Bruik, Knell y Folkers.

Cuando una solución de hidrocioruro de estrepto-  
micina en metanol, conteniendo alrededor de 1 % de ClH se la dejó a la tem-  
peratura ambiente, la rotación específica se modificó profundamente en 24  
horas. Los productos de la reacción fueron separados por el procedimiento  
cromatográfico, usando alúmina lavada. En solución de éter metanol el hi-

drocloruro de estreptidina fué adsorbido por la alúmina, mientras los derivados de la estreptobiosamina pasaron libremente a través de la columna. El hidrocloreuro de estreptidina fué entonces obtenido por tratamiento con metanol y fué caracterizado como picrato cristalino.

Sobre la base de la fórmula :  $C_{21}H_{39}N_7O_{12}$  para la estreptomina, el dosdoblamiento del antibiótico en solución de metanol puede ser representado así :



El hidrocloreuro de metil-estreptobiosamina-dimetil-acetal es un sólido amorfo, levógiro, soluble en agua, piridina y metanol, pero insoluble en los solventes orgánicos comunes. Cuando se hizo el estudio espectrográfico, no se pudo constatar absorción del carbonilo; pareciera que en este derivado de la estreptobiosamina, el grupo reactivo carbonilo ha sido convertido en dimetil acetal.

En una determinación hecha por Kuhn-Roth, de grupos metilos ligados al carbón, fué obtenido un equivalente de 0.83 moles de ácido acético, indicando que el compuesto tenía por lo menos un carbono del grupo metilo.

Cuando el hidrocloreuro de metil-estreptobiosamina-dimetil acetal fué calentado con álcali acuoso, la formación de maltol fué indicada por la absorción ultravioleta de la solución acidificada ( $\lambda$  máx. : 2750 A°).

El tratamiento del hidrocloreuro de metil-estreptobiosamina-dimetil acetal con álcali acuoso concentrado, mantenido a reflujo dió metilamina, la cual fué aislada e identificada luego como 2-4 dinitro-dimetil anilina.

La acetilación del hidrocloreuro de metil-estreptobiosamina-dimetil acetal dió metil-estreptobiosamina(tetra acetil)dimetil acetal, en forma cristalina:  $C_{13}H_{18}NO_7(CH_3CO)_4(OCH_3)_3$ . En solución de metanol, el espectro de absorción de este compuesto demostró un mínimo de absorción en el ultravioleta, sin máximo. El espectro infrarrojo de metil-tetra acetil-estreptobiosamina-dimetil acetal en concentración baja ( 3-10 % ) en solución de tetracloroetano demostró fuertes bandas simétricas de absorción en 5.75 y 6.16 . Ello fué atribuido a la presencia de éster y amino grupos bisustituídos. Una muestra del compuesto en el mismo solvente demostró una absorción en 2.75  $\mu$ .

En una determinación de hidrógeno activo ( Zerewiti-

no $\beta$ ) en este compuesto, se liberó un mol de metano; no podía ser del grupo  $>NH$ , aquí presente como  $-N(CH_3)(CH_2CO)$ , y esos resultados indican que el metil-tetra acetil-estreptobiosamina-dimetil acetal contiene el grupo hidroxilo libre, el cual es resistente a la acetilación.

El hidrocloreto de dihidroestreptomicina fué tratado con metanol conteniendo  $61H$ , y el hidrocloreto de estreptidina fué obtenido cromatográficamente. La acetilación del producto amorfo dió como resultado dos derivados de acetilo cristalinos; de punto de fusión : 198-198.5 y 155.5-157. Como se esperaba, ambos compuestos contenían un grupo metoxi y cinco grupos acetilo, cuatro de los cuales estaban ligados a átomos de oxígeno y uno al átomo de nitrógeno. Este hallazgo sustancia la interpretación de la naturaleza de los grupos metoxi en el hidrocloreto de metil-estreptobiosamina-dimetil acetal. Demostró además que -como se sugirió- la hidrogenación de estreptomicina a dihidroestreptomicina implica la reducción de un grupo carbonilo a un grupo hidroxilo. Ambos derivados de acetilo dieron aproximadamente un mol de metano ( Zerewitinoff ) y ambos demostraron una absorción infrarroja en la región  $3.4$ , cuando se estudió en solución saturada de tetracloreto. Es así evidente que el grupo hidroxilo inacetilable observado en el metil-tetra acetil-estreptobiosamina-dimetil acetal, está también presente en la penta acetil-dihidro-estreptobiosamina isomérica. Para investigar la naturaleza del isomerismo implicado a esos dos compuestos, ellos fueron tratados separadamente con etil-mercaptán y  $HCl$ , para reemplazar los grupos metoxi por grupos etil-mercapto, fueron luego reacetilados y tratados con níquel Raney, para sustituir los átomos de hidrógeno por grupos etil-mercapto.

Ambos glucósidos de metilo dan el mismo producto final cristalizado : penta acetil-dihidrodexoi-estrepto-biosamina; por lo que así aparece que los dos compuestos difieren estéricamente en el átomo de carbono que lleva el grupo metoxi-glucósido, dado que la destrucción de la asimetría en este átomo de carbono conduce al aislamiento de un compuesto común. Los compuestos fueron designados :  $\alpha$ -metil penta acetil dihidroestreptobiosamina, p.f.: 198-198.5 y el correspondiente compuesto  $\beta$ , p.f. 155.5-157°C.

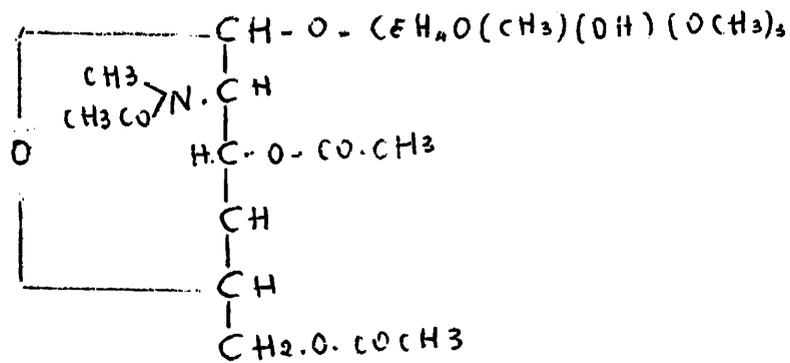
La hidrólisis del metil-estreptobiosamina-dimetil acetal-hidrocloreto para producir N-metil l-glucosamina fué anunciada por Kuehl y Flyn.

El compuesto :  $\alpha$ -metil penta acetil dihidroestreptobiosamina fué disuelto en  $HCl$  caliente al 10 % y refluado por 3 horas. Los

productos de la reacción fueron reacetilados y se obtuvo una pequeña cantidad de : penta acetil-N-metil-l-glucosamina que fué aislada por el procedimiento cromatográfico. Esta observación sustancia la conclusión de que el grupo reactivo carbonilo de la estreptomina reside en la porción estreptosa ( nitrógeno libre ) de la molécula.

Se ha demostrado que la porción : N-metil-l-glucosamina de estreptobiosamina está ligada a la mitad de la estreptosa, a través del átomo de carbono de la metil amino hexosa.

Una fórmula estructural para : metil-tetra acetil-estreptobiosamina dimetil acetal basada en la experiencia acumulada es la siguiente :



### III DIFERENTES METODOS DE DOSAJE

#### Método de los cilindros de vidrio.

El fundamento del método consiste en la difusión de la estreptomycin, desde la sustancia problema, que está colocada en cilindros, al agar sembrado con el microorganismo.

Se preparó una curva patrón con soluciones de estreptomycin de concentración conocida.

#### Material :

**Cilindros.**- Los cilindros pueden construirse de vidrio, porcelana o acero inoxidable. Para este trabajo se utilizaron cilindros de vidrio Pyrex (1) de 8 mm de diámetro externo y 1 mm de pared. Longitud de 12 mm y calibre uniforme. Es conveniente que los bordes sean perfectamente planos. Fueron colocados en tubos de ensayo, tres en cada tubo, y esterilizados por calor seco.

**Organismo de prueba :** Se utilizó la cepa de *Staphylococcus Aureus* N° 578 (2). De la capa mantenida en agar inclinado, en refrigerador para no alterar la vitalidad, se efectuaron subcultivos durante 24 horas.

**Medio de cultivo :** Se fundió agar nutricio transparente, dejando enfriar a 45°C. Por cada 100 ml de agar fundido se le agregó 0,1 ml del caldo de cultivo, mezclando cuidadosamente.

Por otro lado, se prepararon cápsulas de Petri estériles, de vidrio Pyrex, de 9 cm de diámetro interno. Con pipeta estéril se llevaron rápidamente a cada cápsula, 13 ml del agar sembrado. Se dejaron solidificar en las placas, conservándolas en refrigerador. Allí se mantuvieron 24 horas antes de usarlas, pues el enfriamiento evita que las bacterias se desarrollen demasiado rápido y el agar adquiere mejores condiciones para colocar los cilindros. Las placas sembradas nunca deben dejarse más de unos minutos a la temperatura ambiente antes de usarlas.

---

(1) Estos fueron preparados por el Sr. Carlos P. Bermejo, del taller de vidrio de la Universidad Nacional de La Plata, a quien mucho agradezco.

(2) Las cepas necesarias para la ejecución del presente trabajo fueron solicitadas oficialmente al Sr. Director del Instituto Malbrán, Dr. Enrique Savino, a quien mucho agradezco.

---

Preparación del patrón de estreptomina.

Para expresar los valores hallados y trazar la curva patrón se tomó la unidad S.

1 U.S. : 0.000001 gr

Se tomó un frasco de estreptomina Merck, mantenido en refrigerador, y se inyectaron asépticamente 20 ml de agua destilada estéril. Los frascos de antibiótico vienen con una cantidad de 1 gr de estreptomina, es decir que en 20 ml ----- 1.000.000 U.S.

Se tomó 1 ml y se diluyó con agua destilada estéril a 100 ml; es decir :

100 ml----- 50.000 U.S.

1 ml ---- 500 U.S.

Nuevamente se tomó 0,6 ml :

Si 1 ml ---- 500 U.S.

0,6 "---- 300 U.S.

Llevando a 100 ml con agua destilada estéril :

100 ml ----- 300 U.S.

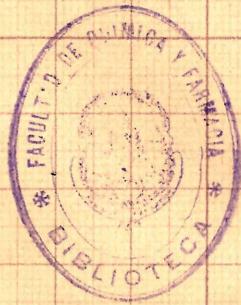
1 ml ----- 3 U.S.

Esta fué la solución madre.

A partir de ella, se procedió a realizar las diluciones para trazar la curva patrón.

Solución que contiene	H <sub>2</sub> O d.	Concentración final
3 U.S./ml	ml	U.S./ml
3	0	3
2.6	0.4	2.6
2.4	0.6	2.4
2	1	2
1.6	1.4	1.6
1.2	1.8	1.2
0.8	2.2	0.8
0.4	2.6	0.4
0.2	2.8	0.2

Se sacaron las placas de agar sembradas del refrigerador- de una en una -. Se tomó asépticamente con pinza estéril un cilindro de vidrio pasando un extremo sobre la llama de un mechero Bunsen y sin apretarlo se lo colocó sobre la superficie del agar sembrado. Se trató en todo lo posible de exponer el mínimo tiempo la superficie del agar en contacto



UNIDADES S POR mililitro

GRAFICO N° 1

con el aire, para lo cual las cápsulas estuvieron en todo momento cubiertas con su tapa, levantando sólo un extremo para la colocación del cilindro y para la posterior colocación de la solución antibiótica.

Una observación muy importante es que los cilindros no deben calentarse demasiado para que no se hundan en el agar. Esto traería una difusión no uniforme. Cuando están bien adheridos los cilindros no se desprenden del agar. Los tres cilindros fueron llenados con una misma solución, logrando resultados por triplicado, haciendo lo mismo con las otras soluciones. El volumen ocupado en cada cilindro fué de 0,25 ml. Las Petri, una vez dispuestas, fueron incubadas en estufa a 37°C.

Después de las 24 horas, no se observó más modificación. Se sacaron las placas y con compás de dos puntas se midieron las zonas de inhibición, transportando la medida a una regla graduada, tratando de apreciar el medio de milímetro.

Resultados :

Caja I	Caja II	Caja III
0,2 U.S./ml	0,4 U.S./ml	0,8 U.S./ml
14,1 mm	20,5 mm	22,4 mm
14,3	20,2	22,3
14,1	20,3	22,4
<u>14,1</u>	<u>20,3</u>	<u>22,4</u>
Caja IV	Caja V	Caja VI
1,2 U.S./ml	1,6 U.S./ml	2 U.S./ml
25,7 mm	27,9 mm	29,4 mm
25,8	27,0	29,5
25,8	27,9	29,1
<u>25,8</u>	<u>27,9</u>	<u>29,3</u>
Caja VII	Caja VIII	Caja IX
2,4 U.S./ml	2,6 U.S./ml	3 U.S./ml
31,2 mm	33,1 mm	34,3 mm
31,0	33,0	34,5
31,1	33,2	34,5
<u>31,1</u>	<u>33,1</u>	<u>34,5</u>

Conociendo la curva patrón se puede determinar la concentración del antibiótico en un líquido problema.

En este caso se pueden colocar 3 líquidos diferentes en cada uno de los cilindros, haciendo un triplicado. Se calcula el diámetro medio, se proyecta horizontalmente desde la ordenada hasta alcanzar la

curva patrón y luego verticalmente hasta la abcisa en donde se leerán las U.S. halladas.

Para lograr buenos resultados es necesario hacer una curva patrón cada vez que se realice la valoración del antibiótico.

Examinando las placas luego de la incubación se observó un halo transparente, de tamaño diferente según la dosis de antibiótico correspondiente a cada cilindro de vidrio, y una zona opaca. En la zona transparente es donde se ha impedido la proliferación del microorganismo de prueba, mientras que en el resto de la placa, opaco, el microorganismo desarrolló.

El diámetro de inhibición guarda relación directa con la cantidad de antibiótico. Los datos obtenidos están expresados en el gráfico N° 1.

Los primeros ensayos que se hicieron con cilindros fabricados " ad hoc " dieron resultados inconstantes. El Sr. Pérez Bermejo, del taller de vidrio de la Universidad Nacional de La Plata, tuvo la gentileza de fabricar un stock de cilindros de vidrio Pyrex, cuyas medidas se ajustaron a las exigidas.

---

Otro método ensayado fué el de los discos de papel, cuyo fundamento es el mismo que el del método anterior. Solamente he sustituido los cilindros de vidrio por los discos de papel. Se utilizó papel de filtro Schlicher y Schul N° 589 banda azul, de 14 mm de diámetro, los que fueron cortados por sacabocados, siendo esterilizados antes de su uso (10)

Se trabajó con la misma cepa anterior, de la cual se hicieron subcultivos cada 24 horas.

Se preparó además una solución de antibiótico de concentración conocida. Como antes, partimos de una solución tal que :

20 ml ----- 1.000.000 U.S.

1 ml ----- 50.000 U.S.

Llevamos 1 ml a 100 ml con agua destilada :

100 ml ----- ,50.000 U.S.

1 ml ----- 500 U.S.

Se llevó 1 ml a 250 ml con agua destilada :

250 ml ----- 500 U.S.

1 ml ----- 2 U.S.

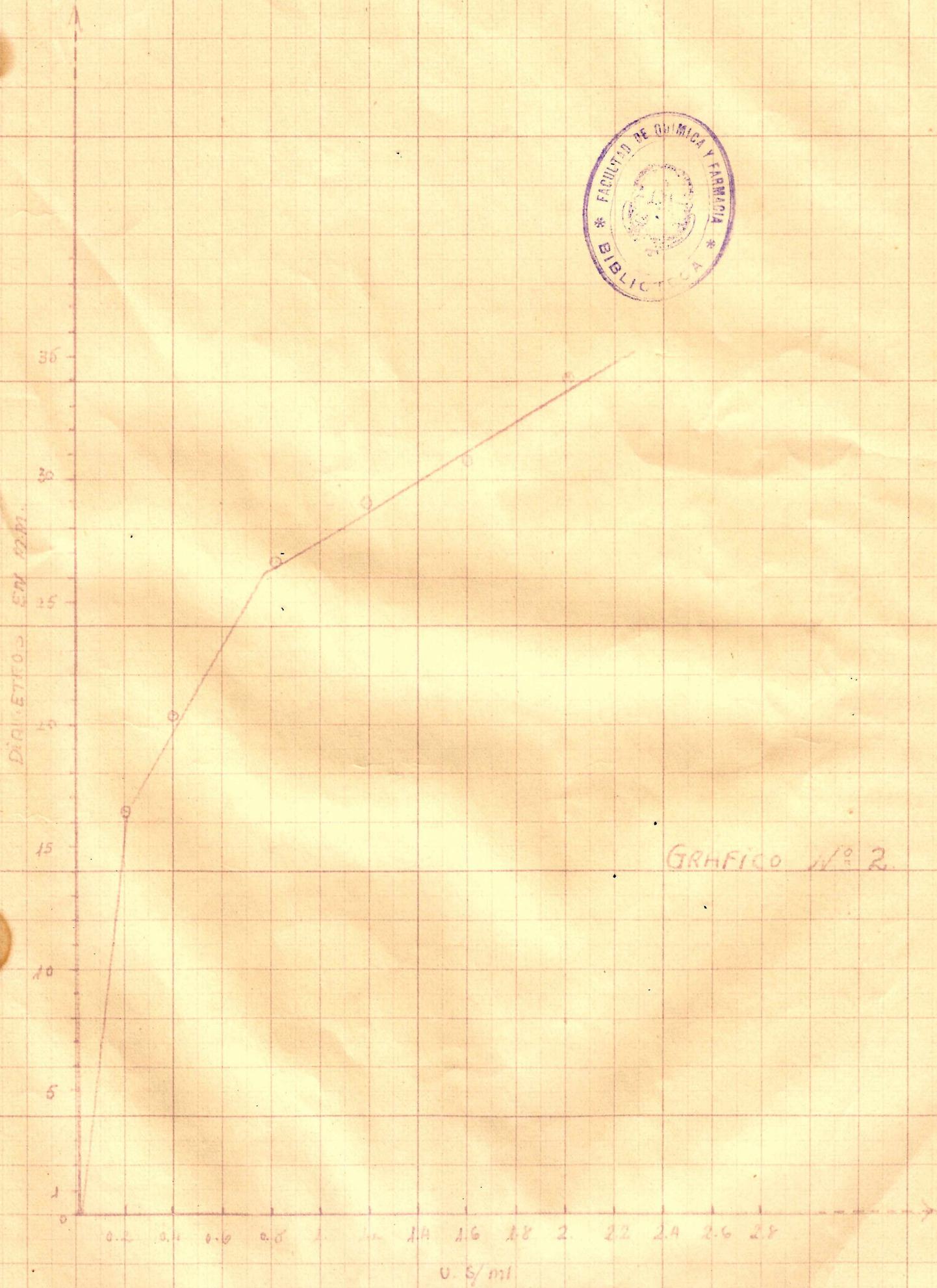


GRAFICO N° 2.

Esta fué la solución madre. A partir de ella se hicieron las diluciones para trazar la curva patrón.

Solución con 2 U.S./ml	Agua destilada	Concentración final
2	0	2
1,6	0,4	1,6
1,2	0,8	1,2
0,8	1,2	0,8
0,4	1,6	0,4
0,2	1,8	0,2

Para cada Petri, se dispusieron tres discos con el lado plano hacia abajo. Rápidamente, ni bien se hubo colocado cada disco sobre el agar sembrado, se depositó un volumen de la solución de antibiótico de concentración mayor. El volumen agregado no debe ser ni muy grande, como para que el papel de filtro no absorba rápidamente, ni muy chico. El volumen que se consideró conveniente en los ensayos fué de 0,05 ml. Hay que trabajar rápido, pues el cilindro absorbe la humedad del agar.

A medida que se descargaba la pipeta, se presionaba lentamente el disco, con la punta de la misma. Por cada cápsula de Petri se usaron tres cilindros, que se humedecieron con la misma solución. De igual forma se operó con las otras diluciones y se trazó la curva patrón (se incuban a 37° durante 20 horas ).

Cuando se trabaja en una solución problema cuya concentración de antibiótico se desconoce, se procede del mismo modo, haciendo el trabajo por triplicado. Con esos datos se acude a la curva patrón y se obtiene la concentración de estreptomycinina por ml.

Resultados :

Caja I	Caja II	Caja III
0,2 U.S./ml	0,4 U.S./ml	0,8 U.S./ml
16,1 mm	20,5 mm	26,9 mm
16,3	20,1	26,0
16,1	20,3	26,7
<u>16,1</u>	<u>20,3</u>	<u>26,8</u>
Caja IV	Caja V	Caja VI
1,2 U.S./ml	1,6 U.S./ml	2 U.S./ml
28,8 mm	30,4 mm	33,9 mm
29,0	30,7	34,1
28,8	30,1	34,1
<u>28,8</u>	<u>30,4</u>	<u>34,0</u>

Con estos datos se ha trazado la curva del gráfico N° 2.

**IV** Muchos factores ejercen una considerable influencia en la valoración de estreptomycin. Entre ellos se ha estudiado la influencia del pH del medio de cultivo, para lo cual se colocaron soluciones de antibiótico frente al medio sembrado pero a distintos pH, siempre compatibles con el normal desarrollo del microorganismo de prueba.

Operaciones :

De las cepas de *Staphylococcus Aureus* N° 578 y de *Streptococcus pyogenes hemolyticus* N° 203, mantenidas en refrigerador, se hicieron subcultivos cada 24 horas.

Se fundió agar nutritivo transparente repartiéndolo en seis erlenmeyers. El pH fué llevado a 6 en el primer erlenmeyer; a 6,5 en el 2°; a 7 en el 3°; a 7,5 en el 4° y a 8 en el 5°. Luego se procedió a esterilizar el material a 120° durante 20 minutos en autoclave.

Al agar estéril y enfriado a 45° aproximadamente se inoculó en cada erlenmeyer 0,1 % de caldo de cultivo de 24 horas de estafilococo, para lo cual con pipeta estéril se tomó 1 ml de caldo de cultivo bien homogeneizado, repartiéndolo en cada erlenmeyer en la proporción 0,1 de caldo por cada 100 ml de agar nutritivo. Se mezclaron cuidadosamente y mediante pipeta, trabajando rápido para evitar la solidificación del medio, se transfirieron cantidades de 13 ml del agar sembrado a cajas de Petri estériles. Se dejaron solidificar y se conservaron en refrigerador.

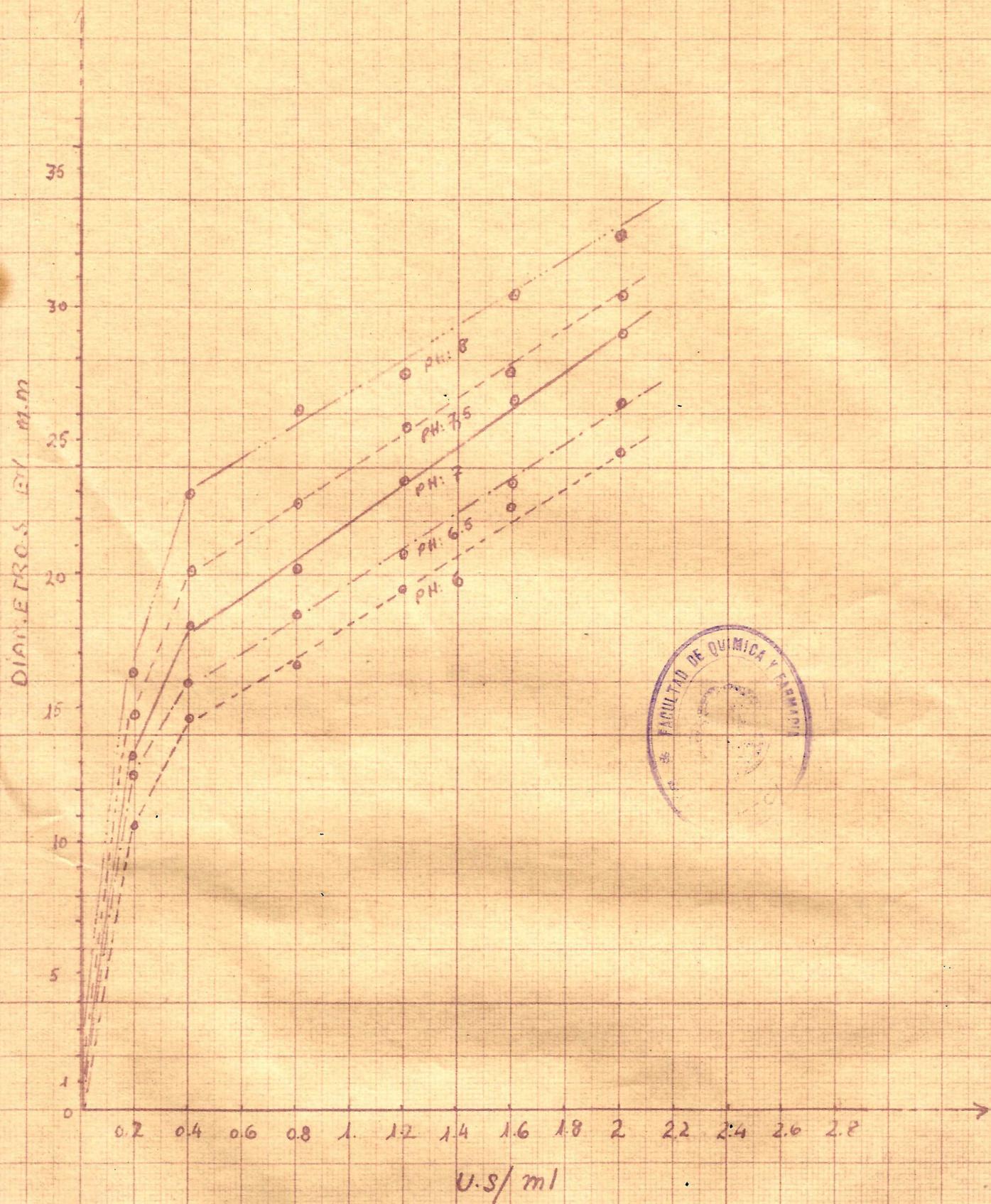
La misma operación se realizó con otra partida de agar nutritivo, con cajas que tenían los mismos pH entre 6 y 8, pero que fueron sembradas con caldo de *Streptococcus pyogenes*.

Se tuvieron así cajas de Petri sembradas con dos microorganismos diferentes, aisladamente y cada caja con pH distinto.

Preparamos un patrón de estreptomycin de tal modo que 1 ml : 3 U.S., haciendo diluciones con agua destilada estéril para tener una escala entre 3 y 0,2 U.S./ml.

Se sacaron las placas del refrigerador y dispusieronse tres discos de vidrio en cada una de ellas con las precauciones de práctica. En cada cápsula se colocó la misma solución de antibiótico en los tres cilindros, para obtener resultados por triplicado promediando luego. Con las otras cápsulas se procedió de igual modo pero con otra unidad de antibiótico.

Así dispuesto, el material fué incubado a 37° durante 24 horas, después de las cuales se retiraron las cajas de la estufa y



CURVAS OBTENIDAS A DIFERENTES PH  
CON: STAPHYLOCOCCUS aureus.

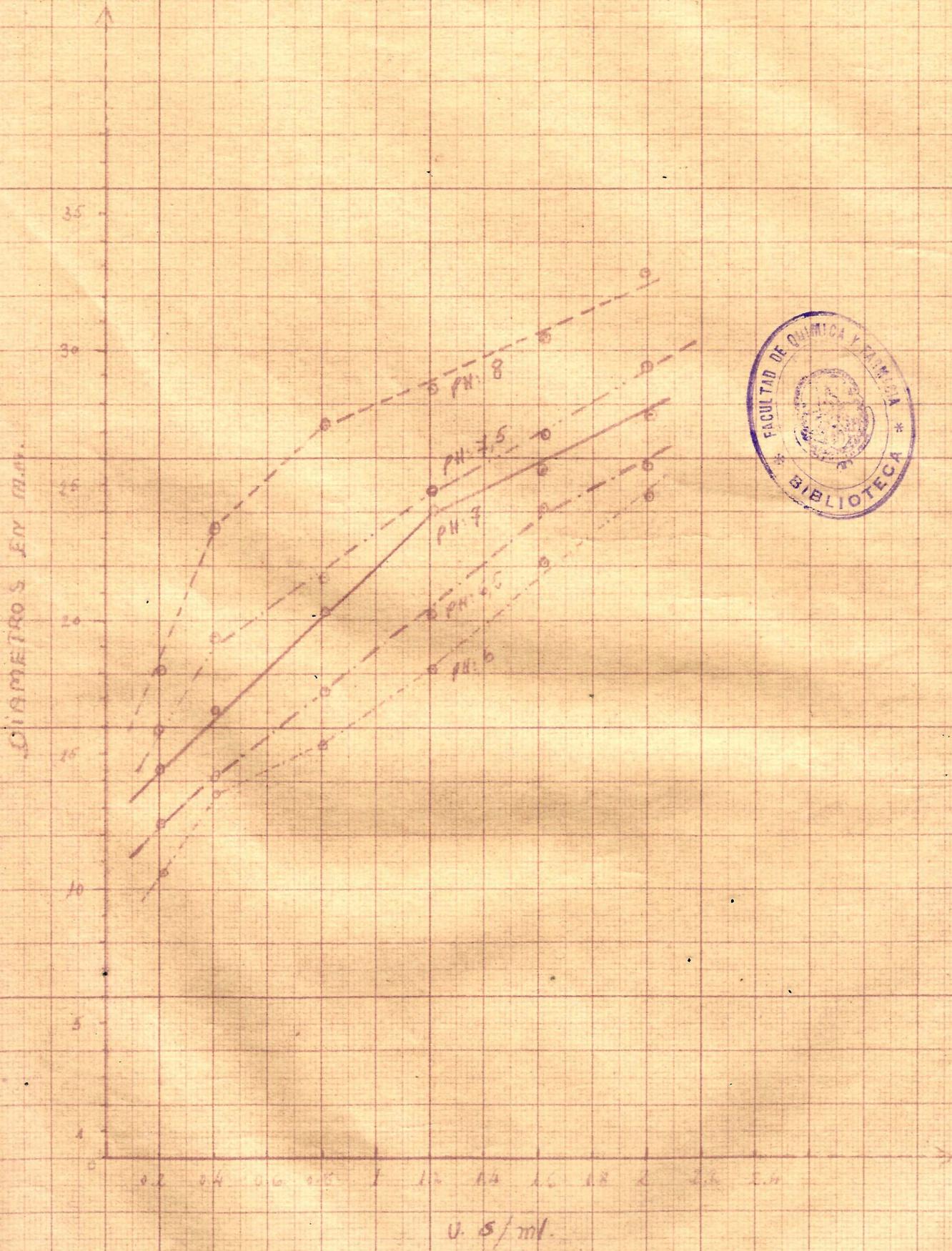
se procedió a medir el halo de inhibición.

Se trazaron curvas y se compararon los valores obtenidos a distintos pH.

Resultados :

1ra. serie, con *Staphylococcus aureus*.

pH : 6						
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I mm	11,4	15,4	17,1	20,0	22,4	24,2
II	10,0	14,1	16,2	19,2	21,6	25,0
III	<u>10,9</u>	<u>15,6</u>	<u>16,0</u>	<u>19,1</u>	<u>23,0</u>	<u>24,1</u>
mm promedio	10,7	14,7	16,4	19,4	22,3	24,3
pH : 6,5						
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	12,1	16,1	18,1	21,1	24,2	26,1
II	12,0	15,2	18,4	20,2	23,0	27,2
III	<u>12,6</u>	<u>16,7</u>	<u>17,2</u>	<u>21,6</u>	<u>22,9</u>	<u>26,9</u>
	12,5	16,0	18,5	20,9	23,0	26,7
pH : 7						
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	13,0	18,2	20,0	24,0	26,4	28,6
II	13,0	18,4	20,1	23,1	27,6	28,0
III	<u>13,2</u>	<u>18,0</u>	<u>20,4</u>	<u>24,0</u>	<u>25,9</u>	<u>29,4</u>
	13,0	18,1	20,1	23,7	25,6	28,6
pH : 7,5						
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	14,0	21,0	23,0	25,0	27,1	30,2
II	14,9	20,2	22,1	26,8	28,2	31,3
III	<u>15,1</u>	<u>20,1</u>	<u>23,2</u>	<u>25,6</u>	<u>27,4</u>	<u>30,3</u>
	14,6	20,1	22,7	25,8	27,5	30,6
pH : 8						
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	16,4	22,9	26,4	26,2	30,2	32,4
II	15,1	23,5	27,1	27,0	30,4	33,0
III	<u>17,2</u>	<u>23,1</u>	<u>26,6</u>	<u>28,1</u>	<u>31,0</u>	<u>32,7</u>
	16,2	23,1	26,7	27,1	30,5	32,7



CURVAS OBTENIDAS A DIFERENTES PH  
con *STREPTOCOCCUS PYOGENES* T.

2da. serie, con *Streptococcus pyogenus* h.

pH : 6

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I mm	10,4	12,4	16,4	18,2	22,1	24,0
II	10,0	13,6	15,1	17,1	23,2	24,6
III	11,2	14,1	15,9	19,2	22,0	25,0
mm promedio	10,5	13,3	15,8	18,1	22,4	24,5

pH : 6,5

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	12,1	14,5	16,9	20,4	24,0	26,0
II	13,4	14,1	17,4	20,1	24,6	25,4
III	11,9	13,1	18,0	22,2	23,4	26,2
	12,4	13,9	17,4	20,2	24,0	25,8

pH : 7

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	14,1	17,1	19,6	24,0	25,4	27,0
II	15,2	16,6	20,1	24,4	25,6	28,4
III	14,6	16,9	21,6	23,9	26,0	27,4
	14,6	16,8	20,4	24,1	25,6	27,6

pH : 7,5

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	15,6	19,1	22,4	23,6	26,4	29,0
II	15,4	20,0	20,9	25,4	25,9	29,4
III	16,9	19,9	21,6	25,2	27,2	30,0
	15,9	19,6	21,6	24,7	26,5	29,4

pH : 8

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Caja I	18,0	23,0	27,0	28,0	30,0	33,0
II	17,6	23,9	28,1	29,9	31,2	34,0
III	18,4	24,6	27,6	27,8	30,9	32,9
	18,0	23,8	27,5	28,5	30,7	33,3

Observando los valores obtenidos vemos que los diámetros medidos en los medios sembrados a pH debajo de 7 son menores que los logrados a pH por encima del punto neutro, es decir que la concentración de antibiótico se mostró más eficaz en un medio por encima del punto neutro que por debajo de él. Este efecto no puede deberse a un mayor o menor desarrollo de los gérmenes debido a la modificación del pH ya que los microorganismos elegidos para nuestra experiencia desarrollan normalmente entre pH : 6 y 8 en ausencia del antibiótico.

Influencia de las condiciones atmosféricas

Colocándonos en el caso de que un microorganismo pueda desarrollar igualmente en aero y en anaerobiosis, he querido ver qué modificaciones se obtendrían, trabajando en ambas condiciones con el microorganismo en cuestión bajo las mismas condiciones experimentales.

El microorganismo elegido para esta prueba fué el *Bacillus Eschericcia coli communis*, cepa N° 406.

El medio de cultivo usado fué :

Caldo de cultivo -----2 ml

Soluc. glucosa 10 %--- 2 "

Agua destilada ----- 6 "

Soluc. sat. de rojo fenol ----0,25 ml. El pH fué ajustado entre 8,2-8,4 ( rojo cereza ).

Por cada 10 ml de caldo así preparado se agregan 0,1 ml de un caldo de cultivo del microorganismo de 24 horas.

El fundamento del método que se siguió consiste en hacer actuar al microorganismo en un medio glucosado. Una pequeña cantidad de ácido producido por el microorganismo cambia el color del rojo inicial al amarillo. Una vez que el medio fué sembrado con 0,1 ml del caldo de 24 horas, se dispusieron en dos series de tubos de ensayo, una destinada para el ensayo en aerobiosis y la otra para el ensayo en anaerobiosis. A cada uno de los tubos de ambas series se les colocó una cantidad precisa de antibiótico, haciendo diluciones seriadas. Para conseguir la anaerobiosis he seguido<sup>(12)</sup> entre las varias técnicas aconsejadas el procedimiento por vía química basado en las propiedades reductoras de ciertas sustancias que fijan el oxígeno; como las sustancias más reductoras son tóxicas para el microorganismo, se las empleó por medio del dispositivo de Buchner que consta de un tubo grande de paredes fuertes donde se colocan 5 ml de una solución reciente de :

Acido pirogálico	1 gr
Hidróxido de sodio	1 gr
Agua	10 gr

Se colocó un soporte en el fondo del tubo y sobre él, para que no toque el fondo, el tubo con el medio sembrado. Para conseguir la anaerobiosis por vía química los autores aconsejan utilizar ácido pirogálico y  $\text{C O}_3\text{K}_2$ . En este trabajo se ha reemplazado el carbonato pues el  $\text{CO}_2$  formado favorece las condiciones anaeróbicas, lo que no fué

precisamente nuestro propósito. El objeto de nuestro trabajo fué estudiar cómo desarrolla la *Eschericcia coli* en ambas condiciones, libres de factores que puedan favorecer a una de ellas, y luego ver a qué dilución de antibiótico se produce la inhibición del crecimiento en aerobiosis y en anaerobiosis.

#### Procedimiento.

De la cepa N° 406 de *Eschericcia coli* se hicieron subcultivos en caldo cada 48 horas. Por cada 10 ml del medio de cultivo mencionado, se inoculó 0,1 ml de un caldo de cultivo del microorganismo citado de 48 horas.

Se utilizaron dos series de tubos de ensayo pequeños, de los de hemólisis. Preparamos una solución de estreptomicina que contenía 50 U.S./ml. En todos los tubos de ambas series colocamos 1 ml del caldo inoculado. Al primer tubo de cada serie colocamos 1 ml de la solución de antibiótico que así quedódiluida al medio. Homogeneizamos bien y pasamos 1 ml de la solución caldo-antibiótico al segundo tubo; es decir que de cada 1<sup>er</sup> tubo de cada serie sacamos 1 ml y lo colocamos en los 2dos. tubos de cada serie. El antibiótico se diluyó al cuarto. Así seguimos haciendo diluciones seriadas. Al último tubo de cada serie no se le agregó antibiótico.

Dispuestos así los tubos de hemolisis, fueron incubados a 37°C; una serie en aerobiosis y la otra serie en anaerobiosis, conseguida como hemos dicho antes.

Los tubos testigos de las dos series, que no tenían antibiótico, mostraron evidente modificación de color, aproximadamente a las 18 horas de incubación a 37°.

Se sacaron los tubos de la estufa y nos encontramos con que algunos tubos mostraban variación de color, otros no.

En los tubos sin estreptomicina, de ambas series, se practicaron recuentos de microorganismos, para ver en qué grado la *E. coli* prolifera mejor en las condiciones de la experiencia.

De los tubos restantes, aquellos que no mostraron modificación de pH indicaron que la concentración de antibiótico fué lo suficientemente alta como para impedir tal variación. Algunos mostraron variación de pH; allí el antibiótico no actuó. Se tomó el último tubo que no mostró variación de color; hasta allí la concentración de antibiótico fué capaz de impedir el crecimiento del microorganismo. Esta observación la hicimos en los tubos de ambas series.

Resultados:

Para el recuento de microorganismos empleamos la cámara cuenta microbios de Heller, muy semejante a las de Thomas y Neubauer. Tiene un retículo de 400 cuadrados en total, cada uno tiene 0,05 mm de lado; ( 1/20 ) o sea una superficie de  $0,0025 \text{ mm}^2$  ( 1/20.1/20 ); la altura una vez colocado el cubreobjetos es de 0,02 mm; de modo que el volumen para cada celdilla es :  $1/20.1/20.1/50 : 0,000050 \text{ mm}^3 : 1/20.000 \text{ da mm}^3$ .

Para hacer la lectura de los dos tubos, diluimos la suspensión bacteriana en s.f. 1/50 tomando 0,1 más 4,9 de s.f. Cargamos hasta 0,5 una pipeta de blancos completando hasta 1l con :

Soluc. alcohol. sat. Cristal Violeta	10 ml
Agua destilada	100 ml

Se agitó bien, despreciamos las primeras gotas, depositamos en el centro de la cámara una gota, adaptamos un cubreobjetos, esperamos 10 minutos y efectuamos el recuento.

Cálculo :  $1/20.000 . 400$  : volumen de la cámara. La dilución de la pipeta fué de 1/20. La solución de gérmenes : 1/50. Luego :

$$400/20.000 . 1/20 . 1/50 : 50.000$$

Nº de gérmenes por ml : 50.000 . promedio.

	Recuento en aerobiosis	Recuento en anaerobiosis
1º	89	70
2º	81	64
3º	<u>97</u>	<u>76</u>
	267 ( promedio 89 )	210 ( promedio 70 )
	$50.000 . 89 : 4.450.000$	$50.000 . 70 : 3.500.000$

Vemos pues que en aerobiosis el microorganismo prolifera mejor. La diferencia fué : 950.000/ml.

Los otros tubos con antibiótico mostraron el siguiente resultado :

Anaerobiosis	Diluc. de antibiótico.	U.S./ml	Aerobiosis
-	1:2	25	-
-	4	12,5	-
-	8	6,25	-
-	16	3,125	-
-	32	1,56	-
-	<u>64</u>	0,78	+
-	128	0,39	+
-	<u>256</u>	0,19	+
+	512	0,09	+
+	1024	0,045	+
+	2048	0,024	+
+	4096	0,012	+
+	8192	0,006	+

En aerobiosis llegamos hasta una dilución de 1/256 sin que haya variación de color; hasta allí la dilución de estreptomycin detiene el crecimiento; en anaerobiosis se llegó a la mayor dilución inhibidora en 1/64. Luego :

Trabajando con *Escherichia coli*, como microorganismo testigo; en iguales condiciones de experimentación, se hizo necesaria mayor concentración de antibiótico para impedir el crecimiento del microorganismo trabajando en aerobiosis.

Esta experimentación nos mostró como activo el antibiótico en uno y otro caso, trabajando con una cepa de un organismo determinado.

---

Hemos estudiado el efecto producido por ciertas sales en presencia del antibiótico y que influyen sobre su dosaje. Primero se preparó una curva patrón, empleando como microorganismo testigo la cepa N° 578 de *Estafilococo aureus*, la que fué mantenida en refrigerador haciendo subcultivos en caldo cada 24 horas. Por cada 100 ml de agar nutricio fundido y enfriado a 45°C se inoculó 0,1 ml del caldo microbiano, se repartió el material en cajas de Petri conservando en refrigerador. Con una solución tipo de antibiótico en agua destilada se hizo una curva patrón, para el método de los cilindros de vidrio y otra para el de los discos de papel.

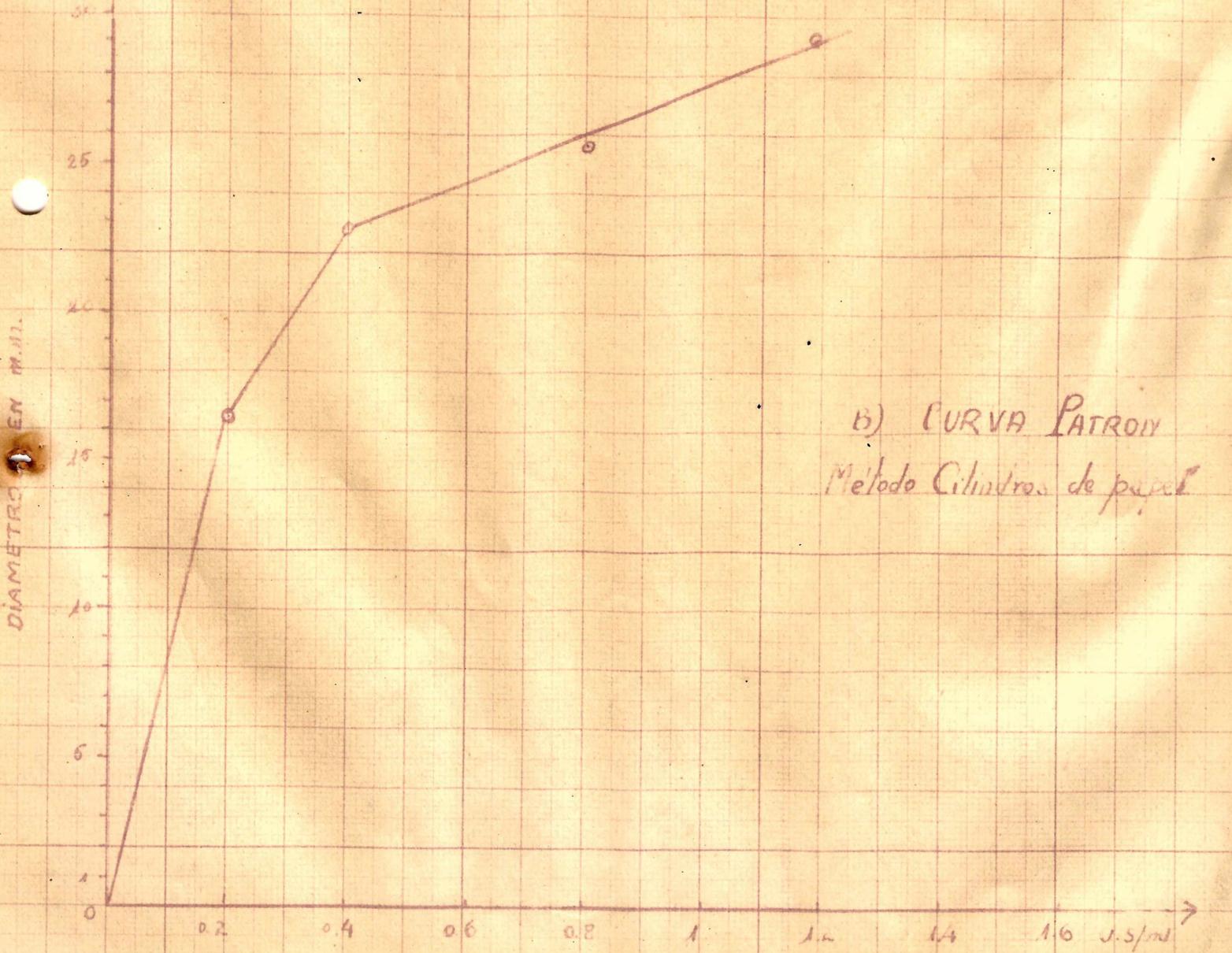
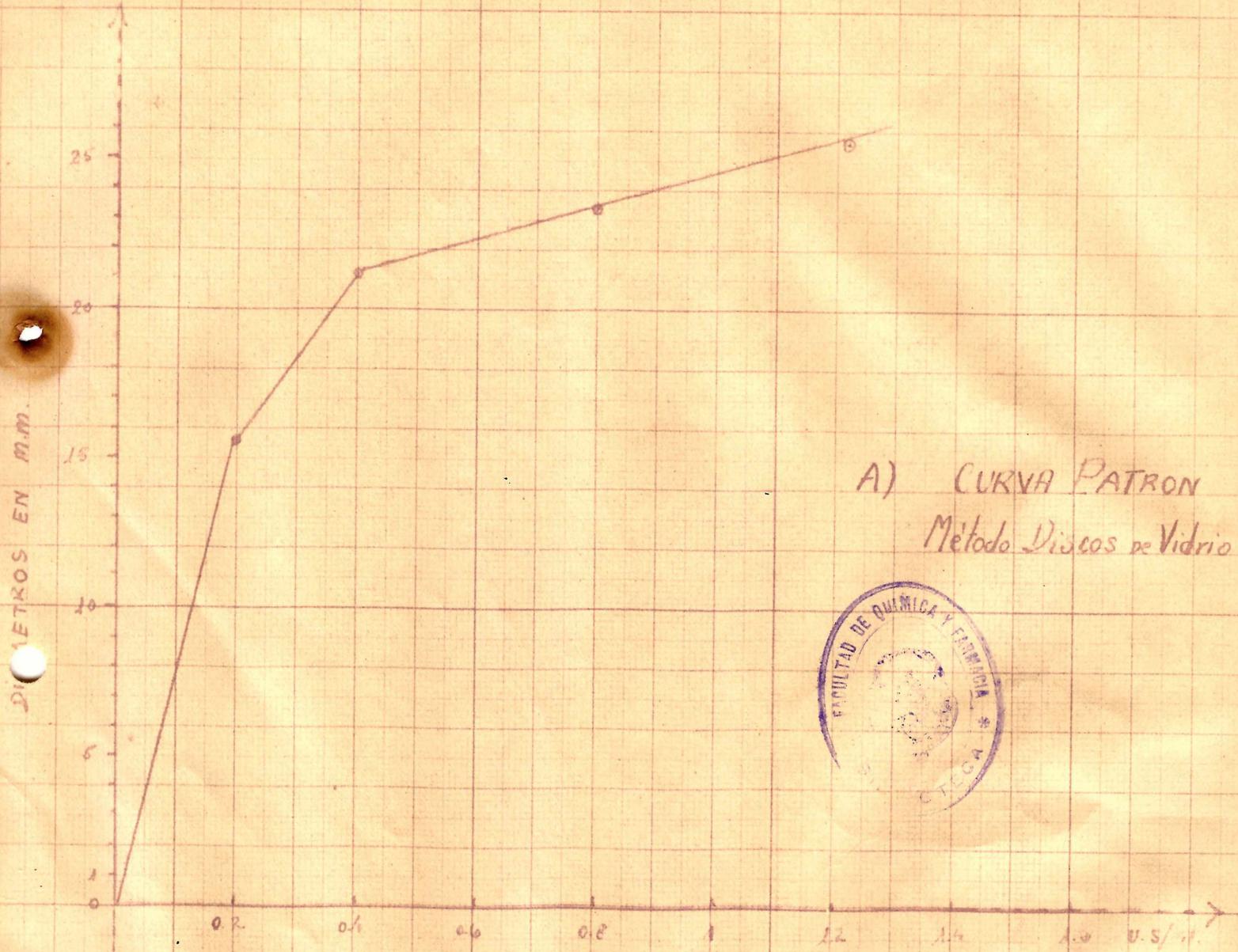
Luego se procedió a trazar nuevas curvas trabajando con las mismas concentraciones de antibiótico pero ahora en presencia de sales extrañas. Así, partiendo de una solución madre de estreptomycin que tenía 2 U.S./ml se hicieron diluciones para tener un margen entre 2 y 0,2 pero no en agua destilada, como antes, sino con soluciones de sales.

Los resultados fueron :

1 ) Solución madre en agua destilada : 2U.S./ml.

Se tomó :	Se agregó $PO_4HK_2$ 10 %	Concentración final :
0,2 ml	1,8 ml	0,2
0,4 "	1,6	0,4
0,8 ml	1,2	0,8

Con estas soluciones se hicieron las incubaciones como antes. Para trazar la curva patrón en agua destilada el pH fué ajustado a 7,6.



Curvas patrones

## Método de los cilindros de vidrio

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2
	15,3	21,0	23,0	25,2
	16,2	22,0	24,1	25,1
	<u>16,1</u>	<u>20,4</u>	<u>23,6</u>	<u>25,6</u>
mm promedio	15,8	21,1	23,5	25,6

## Método de los discos de papel

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2
	16,0	23,4	24,0	29,2
	17,1	21,9	25,1	29,8
	<u>16,9</u>	<u>22,6</u>	<u>25,6</u>	<u>29,2</u>
mm promedio	16,6	22,8	24,9	29,4

Influencia de sales :

Diluyendo la solución patrón con fosfato monoácido de potasio al 10 % y al 20 % se obtuvieron los resultados siguientes: Al 10 % :

## Mtdo. discos de vidrio

## Mtdo. cilindros de papel

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	16,6	23,0	25,0	17,6	24,0	27,0
	17,0	23,9	25,6	18,2	24,1	27,1
	<u>16,9</u>	<u>22,6</u>	<u>26,0</u>	<u>18,0</u>	<u>24,4</u>	<u>26,6</u>
mm promedio	16,8	23,1	25,4	17,9	25,5	26,9

Con fosfato monoácido de potasio al 20 % :

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	17,9	25,0	27,9	19,0	27,0	29,0
	18,3	24,2	27,1	20,1	27,1	30,1
	<u>18,2</u>	<u>24,4</u>	<u>28,0</u>	<u>20,3</u>	<u>26,2</u>	<u>31,2</u>
mm promedio	18,1	24,2	27,4	19,8	26,7	30,1

Con fosfato monoácido de potasio al 0,2 %.

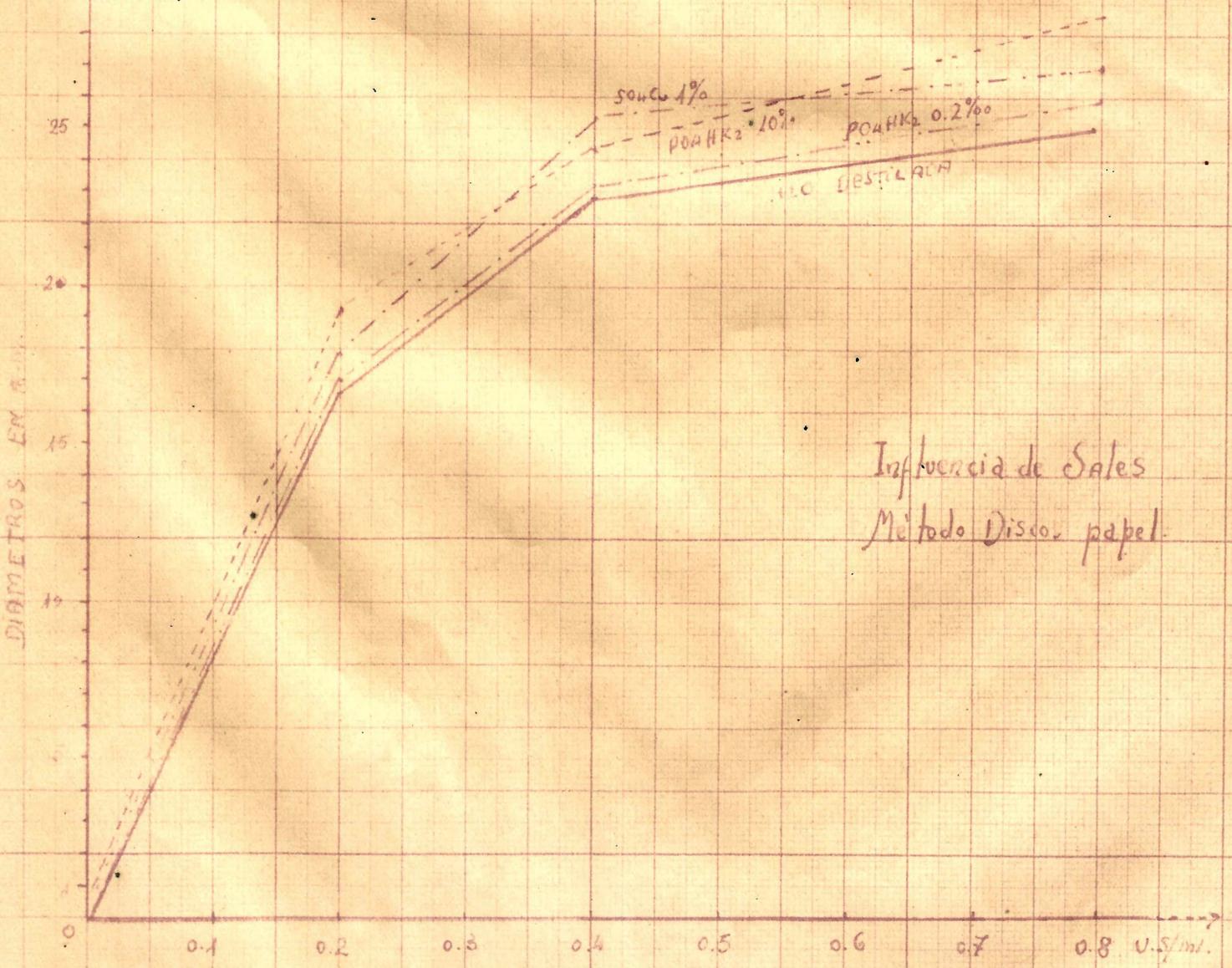
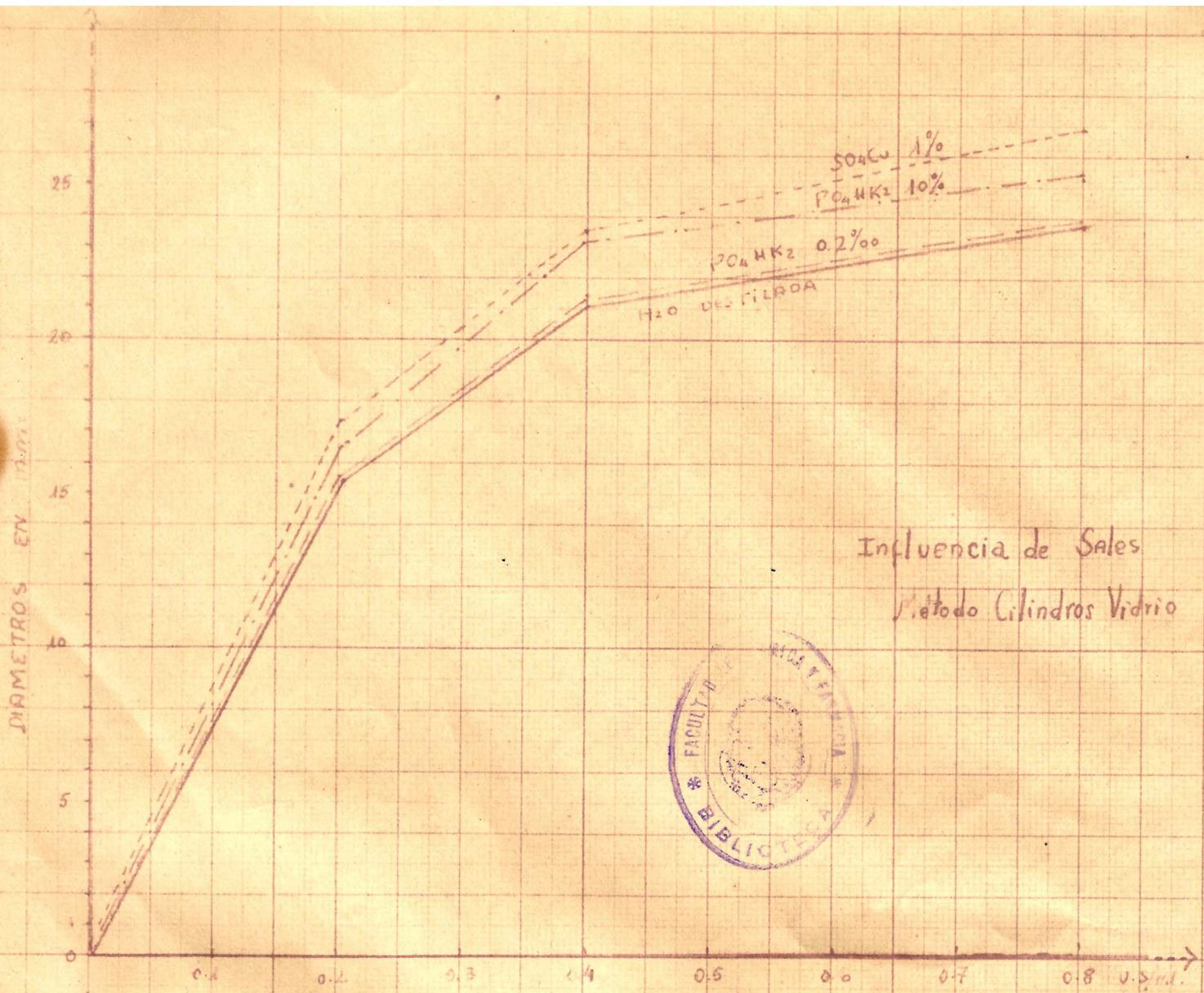
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	15,6	21,6	23,1	17,0	24,0	26,0
	16,4	22,0	24,4	17,2	23,3	25,9
	<u>15,7</u>	<u>21,2</u>	<u>24,0</u>	<u>17,0</u>	<u>22,9</u>	<u>26,3</u>
mm promedio	15,9	21,6	23,8	17,0	23,4	26,0

Influencia del agregado de  $SO_4Cu$  al 1 %.

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	17,4	23,6	27,2	19,9	24,2	29,2
	17,0	23,9	27,0	20,1	24,1	29,9
	<u>17,2</u>	<u>23,0</u>	<u>26,9</u>	<u>19,6</u>	<u>24,0</u>	<u>29,1</u>
mm promedio	17,5	23,5	27,0	19,8	24,1	28,7

Con  $SO_4Cu$  al 1,5 %.

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	20,2	25,2	30,1	21,6	26,4	31,8
	21,0	26,3	30,6	22,4	27,0	31,4
	<u>20,2</u>	<u>25,7</u>	<u>30,4</u>	<u>21,6</u>	<u>27,0</u>	<u>31,9</u>
mm promedio	20,4	25,7	30,3	21,8	26,8	32,0



Influencia del agregado de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$  al 10 %.

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	16,9	23,8	26,9	19,0	24,0	27,0
	16,2	23,4	27,7	19,4	23,9	27,8
	16,0	23,6	26,1	19,2	24,4	27,6
mm promedio	16,3	23,0	26,9	19,2	25,4	27,4

Se hizo otro ensayo con solución de antibiótico que tenía 2 U.S./ml en buffer fosfatado e hicimos diluciones con solución de  $\text{SO}_4\text{Cu}$  0,001 N para tener variaciones entre 0,2 y 0,8 U.S.

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
	15,4	21,6	23,2	16,2	24,0	24,9
	15,9	22,4	23,6	16,4	23,6	25,0
	15,9	21,4	24,0	16,9	23,1	25,6
mm promedio	15,9	21,8	23,6	16,5	23,5	25,1

Otra serie se hizo en presencia de buffer pero diluyendo la solución de antibiótico con  $\text{SO}_4\text{Cu}$  0,01 N.

16,1	22,4	24,0	17,6	24,1	26,0
16,9	23,9	24,1	18,1	24,0	26,4
16,7	22,6	24,3	18,0	24,1	27,1
16,5	22,9	24,1	17,9	24,0	26,5

Cuando trabajamos en presencia de sulfanilamida al 0,1 % se obtuvieron los siguientes valores :

0,2	0,4	0,8	0,2	0,4	0,8
16,1	23,0	25,0	18,0	25,0	26,6
17,2	24,1	24,9	18,2	25,1	27,1
17,3	23,8	25,7	17,3	24,4	27,4
16,8	23,6	25,2	17,8	24,8	27,0

En presencia de sulfapiridina al 0,1 % :

15,7	22,0	24,0	17,1	24,2	25,1
16,2	22,9	24,1	17,9	24,3	26,0
16,9	22,7	23,7	17,6	24,0	26,2
16,2	22,5	23,9	14,6	24,1	25,7

Trabajando finalmente con distintas concentraciones de alcohol, se concluye que, con alcohol absoluto no se obtienen mayores modificaciones en el diámetro de las inhibiciones, comparando siempre con los valores de antibiótico en agua destilada, pero en alcohol al 60 % los diámetros aumentan visiblemente.

Método de Rake y Jones

Fundamento : Se basa en la inhibición de la hemólisis de los hematíes de conejo que produce el estreptococo hemolítico  $\beta$ . (12)

Material de trabajo :

Microorganismo de prueba : se trabajó con una cepa de estreptococo hemolítico  $\beta$ . Se cultivó una cepa N° 203 en un tubo de caldo con 1 % de sangre desfibrinada de conejo a 37° durante 3 horas.

Medio de cultivo : Caldo-sangre. Se sembraron 6 cc de caldo-sangre con 0,3 cc del cultivo.

Solución patrón de estreptomina : Se preparó una solución que contenía 1 U.S. por ml.

Técnica : Se preparó una serie de 8 tubos y se puso en cada uno de ellos, respectivamente; 0,1 - 0,08 - 0,06 - 0,04 - 0,03 - 0,02 - 0,015 y 0,01 ml. Se tienen así cantidades decrecientes de antibiótico que varían de 0,1 U.S. en el tubo 1 hasta 0,01 en el N° 8.

A cada uno de estos tubos se agregaron 0,2 ml del caldo sangre sembrado con el cultivo.

Como cultivo testigo, se puso 0,1 ml de agua destilada en un tubo al que se agregó 0,2 ml de caldo-sangre inoculado.

Como testigo de la inhibición del microorganismo se pusieron 0,7 ml de la solución patrón de estreptomina en un tubo ( 0,7 U.S. ) y se agregaron 0,2 ml del caldo-sangre inoculado.

Se mezcló el contenido de cada tubo y se pusieron a bañomaría a 37°. El resultado se leyó a los 70 minutos.

El cultivo testigo mostró hemólisis. El segundo testigo sólo mostró la hemólisis producida por la hemolisina preformada, pero no hemólisis adicional, ya que la proliferación del estreptococo fué inhibida. Como punto final se tomó el último tubo de la serie que no mostró hemólisis.

Los primeros signos de la hemólisis se aprecian con mayor facilidad haciendo girar rápidamente los tubos y arrojando algunos eritrocitos en el caldo transparente que sobrenada. Si hay huellas de hemolisina, estos eritrocitos hemolisan rápidamente. Se agitan estos tubos y se colocan en b.m. 2 ó 3 minutos; se produce una hemolisis homogénea.

El último tubo que no mostró hemólisis fué el N° 5.

Resultado : tubo N° 5 que corresponde a 0,03 U.S.

Trabajando con una solución incógnita se dispondría de otra serie de 8 tubos y se colocarían 0,1 cc de solución salina 9% en cada uno. Se agregaría 0,1 cc de la solución problema al N° 1 y luego de mezclar se pasaría 0,1 al N° 2, así siguiendo hasta el N° 8, despreciando los últimos 0,1 cc. Las diluciones serían :

1:2 - 1:4 - 1:8 - 1:16 - 1:32 - 1:64 - 1:128 - 1:256.

Se procedería a colocar en cada tubo 0,2 de caldo-sangre sembrado, luego a b.m.

Conociendo la cantidad de antibiótico que inhibe la proliferación del microorganismo y sabiendo a qué dilución del problema no hay hemólisis - tomando el último tubo - se puede conocer la concentración de estreptomycinina por ml.

---

Entre otros métodos que pueden utilizarse en la valoración de estreptomycinina, menciono el de Fleming, que usó el autor para el dosaje de penicilina ( Lancet 1:732-1943 ).

Este método es una adaptación de la técnica de Wright, mediante portaobjetos en celdas, para medir la actividad bactericida de la sangre desfibrinada.

Las celdas del portaobjetos se preparan así: se esteriliza un portaobjetos común, pasándolo varias veces por la llama de un Bunsen. Se cortan 5 tiras de papel ( 1/12 mm de grosor ), se sumergen en vaselina caliente y se colocan a distancias iguales sobre el portaobjetos de modo que las dos tiras externas correspondan a los extremos del porta. Se esteriliza un segundo portaobjetos y se coloca encima del primero de modo que sobresalga por sus bordes superior y derecho.

Se disponen ocho tubos estériles. En cada uno se colocan : 1,5 de caldo estéril al primero, y 1,0 a los restantes. Se agrega 0,5 cc del líquido problema al N° 1, se mezcla y se pasa 1 cc al N° 2, se mezcla el N° 2 y se pasa 1 cc al N° 3, y así hasta el N° 7, del cual después de mezclar desecho 1,0 cc.

Diluciones : 1:4 - 1:8 - 1:16 - 1:32 - 1:64 - 1:128 - 1:256.

El tubo N° 8 queda como cultivo testigo.

Se prepara una solución de estreptomycinina patrón en suero fisiológico frío de modo que su potencia sea de 1 unidad /ml.

Se dispone una segunda serie de 8 tubos de ensayo estériles y se pone 1,5 ml de caldo en el N° 1 y 1,0 en los restantes. Se agrega 0,5 ml de la solución de antibiótico al N° 1, se mezcla y se pasa 1 ml al N° 2, continuando así hasta el N° 8, del cual después de mezclar se desecha 1 ml. En esta forma se obtiene una serie de diluciones, cuya potencia es : 0,25 - 0,125 - 0,063 - 0,031 - 0,016 - 0,008 - 0,004 - 0,002 unidades.

Se cultiva *Staphylococcus aureus* en caldo durante 24 horas y se diluye este cultivo al 1:80.000 con caldo estéril. Con pipeta estéril se ponen 0,05 ml a los tubos de ambas series y se mezcla el contenido de cada uno de ellos. Con cuentagotas estéril se llenan las 8 celdas de ambos portaobjetos con las 7 diluciones sembradas y el cultivo testigo, usando la misma pipeta luego de lavarla con ácido fénico al 5 % y enjuagarla con agua destilada estéril y un poco de la dilución siguiente. Cuando las celdas están llenas, se coloca en posición el portaobjetos superior y se cierran cuidadosamente los extremos y lados pincelándolos con parafina caliente.

Se llenan las 8 células del otro juego de la misma manera, con las 8 diluciones sembradas de estreptomicina patrón.

Se incuban a 37° durante 18 horas y se investigan las colonias de estafilococo con objetivo de poco aumento.

Se multiplica la mayor dilución que ha inhibido la proliferación del líquido problema por la mínima dilución inhibidora de estreptomicina expresada en unidades, lo que nos da el número de unidades por ml.

---

Métodos químicos

Reseña : Los métodos químicos para el dosaje de estreptomycinina están basados en la formación de maltol o en la obtención de una hidrazona de estreptomycinina fluorescente; éste último de gran sensibilidad. Un método colorimétrico basado en una reacción análoga del grupo aldehído de estreptomycinina ha sido ensayado por Marshall y otros. Se estudió la concentración de antibiótico en tejidos; luego de dosis terapéuticas dicha concentración era de 1 a 20  $\gamma$  por gr de tejido, medida por el método fluorescimétrico. En el ensayo en blanco con el filtrado libre de proteínas de sangre, se determina una constante, pero cuando el mismo método fué aplicado para trabajar con tejidos, los valores en blanco fueron varios. El desproteínizado de tejidos contiene grandes cantidades de glicógeno que interfiere en el ensayo, por eso tiene que ser eliminado tratando la solución con un volumen igual de alcohol etílico, siendo luego menester eliminar el volumen de alcohol. Se observó que la presencia de cantidades apreciables de alcohol disminuye la sensibilidad del método. (13). (14).

La hidrazona de estreptomycinina tiene un color amarillo. En el método fluorométrico se necesita efectuar una curva de calibración, pero se observó que ésta variaba en los días templados. Se demostró - Marshall y colaboradores - que la intensidad de fluorescencia de la hidrazina de estreptomycinina depende de la temperatura. Cuando la temperatura es marcadamente distinta de aquella a la que fué calibrado el aparato, se hace necesario el uso de un factor de corrección.

Marshall y Blanchard desarrollaron un método colorimétrico de valoración de estreptomycinina basado en la reacción de su grupo carbonilo con la semicarbazida. Boxer y Jelinck siguieron un método fluorométrico basado en la formación de una hidrazona con la hidrazinacridina, como se dijo antes.

Un hecho importante fué observado por Schenck y Spreman. Cuando se calienta estreptomycinina en dilución alcalina, se forma maltol.

Para determinar estreptomycinina en orina por la formación de maltol, se requieren los siguientes reactivos :

NaOH 5 N

SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 5 N

Cl<sub>3</sub>Fe ( 2 gr de sal hexahidratada en 100 de

HCl 2 N )

Reactivo fenolado preparado de acuerdo a la técnica de Folin ( Folin, J.B.Chem. 73, 627 (1927) ).

$\text{CO}_3\text{Na}_2$  20 % sol. acuosa.

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Se colocan en un frasco con tapa una muestra de la solución problema ( conteniendo cerca de 4 ml y entre 50 y 2500 U.S. ). Agregar a la solución 1 ml de NaOH 5 N y calentar el frasco en un baño de agua, durante 3 minutos. Luego enfriar la solución a la temperatura ambiente y agregar 5 ml de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  5 N y 1 gr de sulfato de amonio. Destilar la solución y recolectar un volumen de 10 ml. Si la muestra contiene menos de 500 U.S., agregar 1 ml de solución de cloruro férrico al destilado. Medir en la banda de absorción del ultravioleta en 550 m el color producido. Hacer un blanco agregando 1 ml del mismo reactivo a 10 ml de agua destilada.

Si la muestra contiene menos de 500 U.S., añadir 1 ml de reactivo férrico al destilado. Dejar actuar 2 minutos y agregar 3 ml de la solución de carbonato de sodio al 20 %. Medir la banda de absorción. Se hace un blanco.

Teniendo la curva de calibración con cantidades conocidas de estreptomocina, es fácil hallar la concentración del problema.

Se encontró que el 94 % del maltol se encontraba en las primeras fracciones del destilado, por lo que se consideró suficiente destilar 10 ml. Se destila por arrastre con vapor de agua. El reactivo férrico se usó para desarrollar el color con el maltol formado. Es un color muy estable.

Es importante agregar el sulfato de amonio, cuya finalidad es elevar el punto de ebullición, después de haber agregado el  $\text{SO}_4\text{H}_2$ . Cuando se procedió de otra forma, el rendimiento de maltol fué bajo.

---

Nosotros hemos ensayado el método químico muy rápido y sencillo que describe Scudi J.V. y que consiste en tratar la solución de estreptomocina en presencia de acetilacetona, álcali y aldehído de Erlich, calentando al b.m. (15)

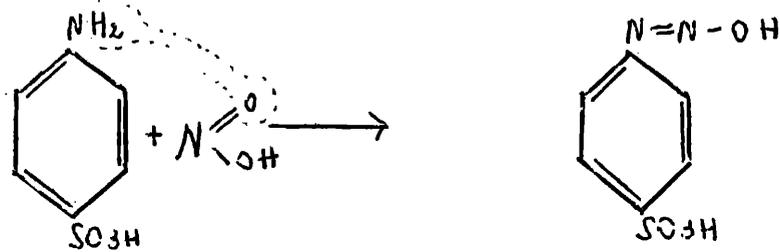




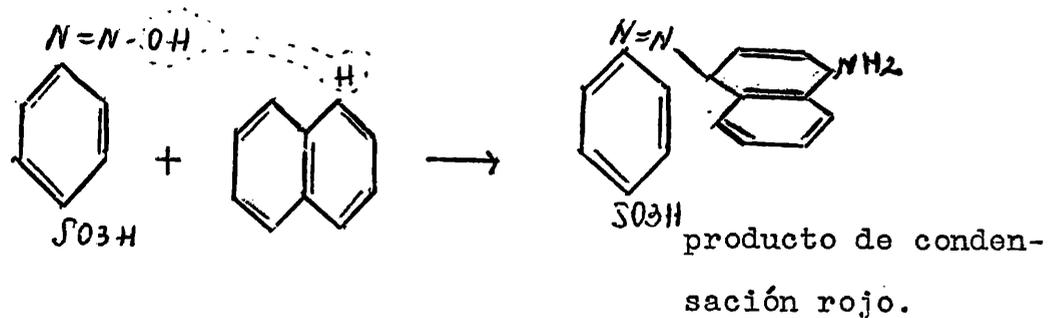
dos :



3 ) El ácido nitroso reacciona con el p-amino bencenesulfónico dando un para diazoico.



4 ) que en presencia de acetato de naftilamina :



#### Operaciones :

De la cepa mantenida en refrigerador, en agar inclinado, se hicieron subcultivos en caldo durante 24 horas.

El medio de cultivo utilizado estaba compuesto de :

Bactodripton	10 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Nitrato de sodio	0,5 gr
Agua destilada c.s.p.	1.000 ml

Los ingredientes fueron disueltos en el agua con calor suave, la solución se filtró corrigiendo el pH a 7 y se esterilizó a 120° por 15 minutos. Una vez frío, por cada 100 ml del medio preparado se inoculó 0,2 ml de caldo de cultivo de 24 horas, mezclando cuidadosamente.

Se dispuso de una serie de tubos de ensayo pequeños y en cada uno de ellos se colocó 1 ml del medio inoculado; en el 1r. tubo se colocó 1,5 ml. Al primer tubo se le agregó 0,5 ml de una solución de estreptomina que tenía 10 U.S./ml, de modo que quedó diluida al cuarto. Se mezcló bien y se pasó 1 ml de ésta al segundo tubo, así el antibiótico quedó diluido al medio, así fuimos realizando la serie de diluciones. Preparamos un tubo testigo que tendrá solamente 1 ml del medio sembrado y 1 ml de agua destilada.

Diluciones : 1 ml : 10 U.S.      Inicial : 1:4. Diluciones al medio :

1,25 - 0,625 - 0,317 - 0,158 - 0,079 - 0,0395 - 0,019 -  
- 0,009 - 0,0045 - 0,0022.

Todos los tubos fueron incubados a 37°C. Después de 8 horas y media aproximadamente, el tubo testigo mostró reducción de nitrato a nitrito; la reacción <sup>colori-</sup>volumétrica se hizo en cada tubo, mezclando previamente partes iguales de los reactivos A y B y agregando 0,1 ml a cada tubo. El último tubo que mostró reducción de nitrato fué el correspondiente a la dilución 0,079.

Con otras series de tubos preparados de igual forma, procedimos a incubarlos a distintos tiempos y observamos las características que se muestran en el cuadro I.

Cuadro I

Influencia del tiempo de incubación a 37° en un medio sembrado con *Staphylococcus aureus* cepa N° 209.

Tiempo	Diluciones de antibiótico ( U.S./ml )							Testigo
0	2,50	1,25	0,625	0,317	0,158	0,079	0,039.....0,0022	0
8 hs30	--	--	--	--	( -- )	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>
12 hs	--	--	--	--	( -- )	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>
15 hs	--	--	--	--	( -- )	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>
20 hs	--	--	--	--	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... NO <sub>2</sub>	débil NO <sub>2</sub>
26 hs	--	--	--	--	a las 10 m. NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... NO <sub>2</sub>	débil --
48 hs	--	--	--	--	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... --	--
55 hs	--	--	--	--	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... --	--
70 hs	--	--	--	--	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> ..... --	--

NO<sub>2</sub> : indica que hubo reducción de nitrato a nitrito.

-- : indica que no hubo reducción.

-- : al principio la reacción colorimétrica fué positiva, luego se hizo negativa. ( Dieron amarillo con Nessler ).

Nosotros interpretamos este fenómeno de la siguiente forma : Como vemos en el cuadro, después de 8 horas y 30 minutos de incubación el testigo, que no tenía antibiótico, mostró reducción de nitrato a nitrito. El tiempo fué considerado el necesario para hacer las lecturas y así obtuvimos una serie de tubos que daban color con el reactivo y otros que, por tener concentraciones altas de antibiótico que impedían la acción diastásica, no desarrollaban color. A las 15 horas de incubación el testigo mostró también reducción pero el rojo vivo que dió a las 8 hs 30 min.

fué un poco más débil. A las 20 horas el color rojo del testigo se fué debilitando y nos encontramos con que el último tubo que mostraba reducción de nitrato a nitrito no era ahora el de dilución 0,079, sino el anterior a él, de dilución 0,158; ahí el rojo se desarrolló a los 10 minutos de haber agregado el reactivo. Pensamos entonces que en el testigo la acción de la diastasa proseguía en la incubación y continuando con su acción reductora llevaba a los nitritos hasta amoníaco. En los otros tubos, con cantidades decrecientes de antibiótico, ocurre en algunos algo semejante, como vimos a las 26 horas de incubación, en que desapareció el color rojo que daba el reactivo en el testigo; el tubo de dilución 0,0022, que antes diera rojo vivo, luego algo debilitado, no mostró ya coloración cuando se practicó la reacción a las 48 horas de incubación. Continuando la incubación después de este período, no se registró ninguna otra variante. Entonces, en el tubo de dilución 0,0022, la concentración de antibiótico es tan débil que ya no puede impedir la acción reductora de la diastasa, de nitrato a nitrito y su posterior pasaje a amoníaco. En los otros tubos, la concentración de antibiótico no puede impedir el primer paso, nitrato a nitrito, pero sí el segundo, de nitrito a amoníaco, es decir que la estreptomycinina, en concentraciones de : 0,019 a 0,317 U.S./ml, permitió la acción de la diastasa reductora en su primera parte pero la frena en la segunda. En cuanto al desarrollo retardado de color en el tubo de dilución 0,158 después de 10 minutos de haber agregado el reactivo, debemos admitir que, si bien esa concentración impide la acción diastásica hasta las 15 horas de incubación, no puede hacerlo más adelante, ya que la pequeña reducción que experimenta el nitrato se hace visible a las 15 horas, pero con retardo. Las otras concentraciones de antibiótico así pueden anular la acción diastásica.

Es importante entonces, para practicar el dosaje, tener en cuenta el mínimo tiempo necesario para que el testigo muestre reducción.

Concluimos entonces asegurando :

- 1 ) la presencia de una diastasa reductora del *Staphylococcus aureus*, por la reducción de nitrato a nitrito.
- 2 ) por el pasaje de nitrito a amoníaco, ya que los tubos que dieron positivo primero con los reactivos A y B y luego negativo, mostraron color amarillado en este último estado, cuando se trataron con 0,20 ml de reactivo de Nessler. ( Un blanco con agua dió negativo al Nessler ).

Generalmente, toda acción enzimática es inhibida cuando se encuentran sales de metales pesados. Esta propiedad se cumple también

con la diastasa reductora del *Staphylococcus aureus*, según vemos en el cuadro N°2.

Se pesó una dosis de estreptomycinina, haciendo una serie de diluciones usando una solución de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 1 %, de modo que 1 ml : 10 U.S. Colocamos en una serie de tubitos de hemólisis las siguientes dosis : 1,5 ml del medio inoculado con el microorganismo ( *S. aureus* cepa N° 209 ) en el 1r. tubito; 1 ml a los restantes. Al 1r. tubito agregamos 0,5 del antibiótico que así resultó diluido al 1/4 y mezclando bien pasamos 1 ml al segundo tubo y así sucesivamente. El testigo sólo contenía 1 ml del medio más 1 ml de solución de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 1 %.

## Cuadro II

1 ml : 10 U.S.

U.S./ml

	2,50	1,25	0,625	0,317	0,118	0,079	0,039	.....	0,0022	T
	--	--	--	--	--	--	--		--	--

En este caso ni el testigo ni otro tubito de la serie mostraron reducción de nitrato a nitrito. La acción diastásica fué frenada totalmente. Haciendo otras diluciones pero con solución de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 0,1 % los resultados fueron :

	2,50	1,25	0,625	0,317	0,118	0,079	0,039	.....	0,0022	T
8 hs 30	--	--	--	--	--	--	--		--	--
12 hs	--	--	--	--	--	--	--		--	--
17 hs	--	--	--	--	--	--	--		--	$\text{NO}_2$
21 hs	--	--	--	--	--	--	--		$\text{NO}_2$	$\text{NO}_2$

Es decir que el testigo recién mostró reducción a las 17 hs y el primer tubo que mostró el mismo efecto lo hizo a las 21 horas. Es innegable que la acción diastásica fué muy retardada.

Trabajando con  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  al 1 % el testigo muestra reducción a las 13 horas 30 min. y el 1r. tubo de la serie a las 15 horas. El  $\text{Cl}_2\text{Zn}$  ejerce menos influencia que el  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  en igual concentración.

## VI      Aplicación de los métodos de dosaje

Como aplicación práctica de los métodos de dosaje se procedió a determinar la concentración de antibiótico en un líquido orgánico.

Comenzamos, como siempre, por trazar una curva de referencia a partir de una solución de estreptomina reciente que tenía 2 U.S./ml en agua destilada y procediendo a realizar diluciones con un buffer fosfatado al 0,2 %.

Solución que tenía 2 U.S./ml	Buffer	Concentración final U.S./ml
2,0	0	2,0
1,6	0,4	1,6
1,2	0,8	1,2
0,8	1,2	0,8
0,4	1,6	0,4
0,2	1,8	0,2

Siguiendo las indicaciones ya dadas, preparamos agar nutricio, cuyo pH se llevó a 7 y fué esterilizado a 120° durante 15 minutos. Se inoculó 0.1 ml de caldo de cultivo de 24 horas de *Staphylococcus aureus* cepa N° 209 y se repartió en cajas de Petri. Una partida de cajas fué utilizada para la curva patrón, otra para el método de los cilindros y otra para el de los discos de papel. Se las conservó en refrigerador.

### VALORES PARA LA CURVA PATRÓN

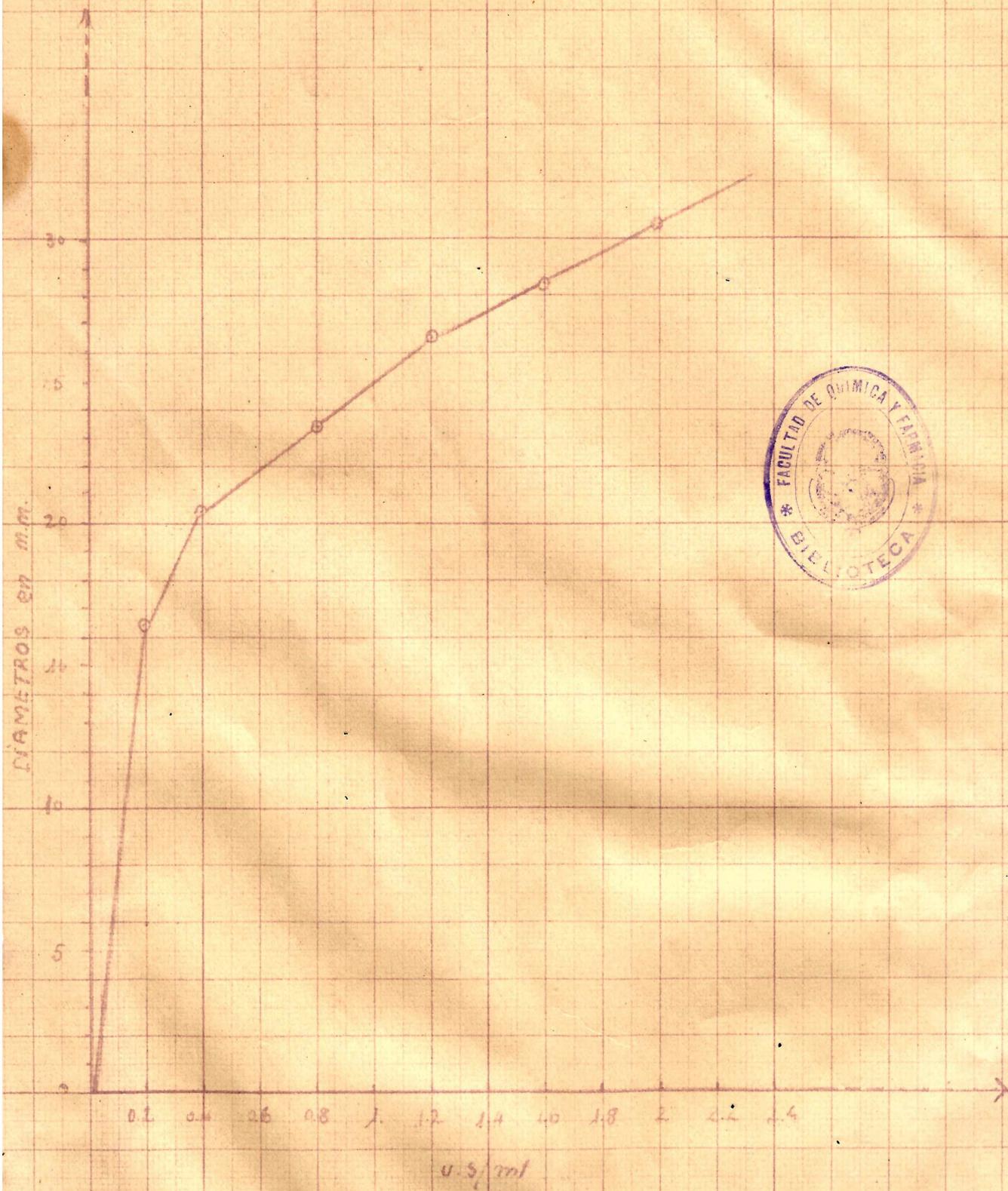
U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
	16,4	19,9	23,0	26,0	27,9	30,9
	15,9	20,2	23,6	27,1	28,2	29,6
	17,1	20,1	24,1	27,2	28,4	30,8
	16,4	20,0	23,5	26,7	28,1	30,4

Se dispuso de un frasco de estreptomina Merck conteniendo 1.000.000 U.S. : 1 gr. Inyectamos a él 20 ml de agua destilada, de modo que : 20 ml : 1.000.000 U.S.

1 ml : 50.000 U.S.

Se aspiró con jeringa 1 ml y se llevó a 50 ml con agua destilada de modo que : 1 ml : 1.000 U.S.

Por la vena marginal de la oreja inyectamos a un conejo 1 ml de esa solución. Esperamos 10 minutos. Se extrajo sangre de la vena marginal de la otra oreja recogiéndola en un tubo estéril y conservando



c) CURVA PATRON  
Método Cilindros de Vidrio

vando en refrigerador hasta que coaguló. Se valuó el antibiótico en el suero. Trabajando con el método de los cilindros de vidrio fué necesario diluir el suero 1:6 para que sus valores cayeran dentro de los valores patrones.

1r. cilindro :	28,1	Por gráfico tengo 1,6 U.S./ml.
2do. " :	29,5	Multiplicando por la dilución
3ro. :	<u>28,4</u>	se obtiene : 1,6 . 6 : 9,6 U.S./ml.
	28,6	

Con el método de los discos de papel, se trazó la curva patrón correspondiente, que dió los siguientes valores:

U.S./ml	0,2	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
	17,1	20,1	23,9	27,4	28,9	32,2
	17,6	21,1	24,2	27,6	29,1	32,9
	<u>16,4</u>	<u>20,6</u>	<u>24,4</u>	<u>26,9</u>	<u>29,0</u>	<u>30,9</u>
	17,0	20,6	24,1	27,3	29,3	32,0

Aplicando el método del papel de filtro :

1r. disco :	30,4	Por gráfico corresponde una concen-
2do. " :	29,1	tración de 1,7 U.S./ml. Multiplicando
3r " :	<u>30,6</u>	por la dilución 1:6 nos dió :
	30,0	1,7 . 6 : 10,2 U.S./ml.

Con el método de Rake y Jones empleando directamente el suero sin diluir, en todos los tubos de la serie no se producía hemólisis debido a la alta concentración antibiótica del suero.

Diluimos el suero 1:20 con agua destilada estéril. El último tubo que impidió la proliferación microbiana correspondió a la dilución 1:16.

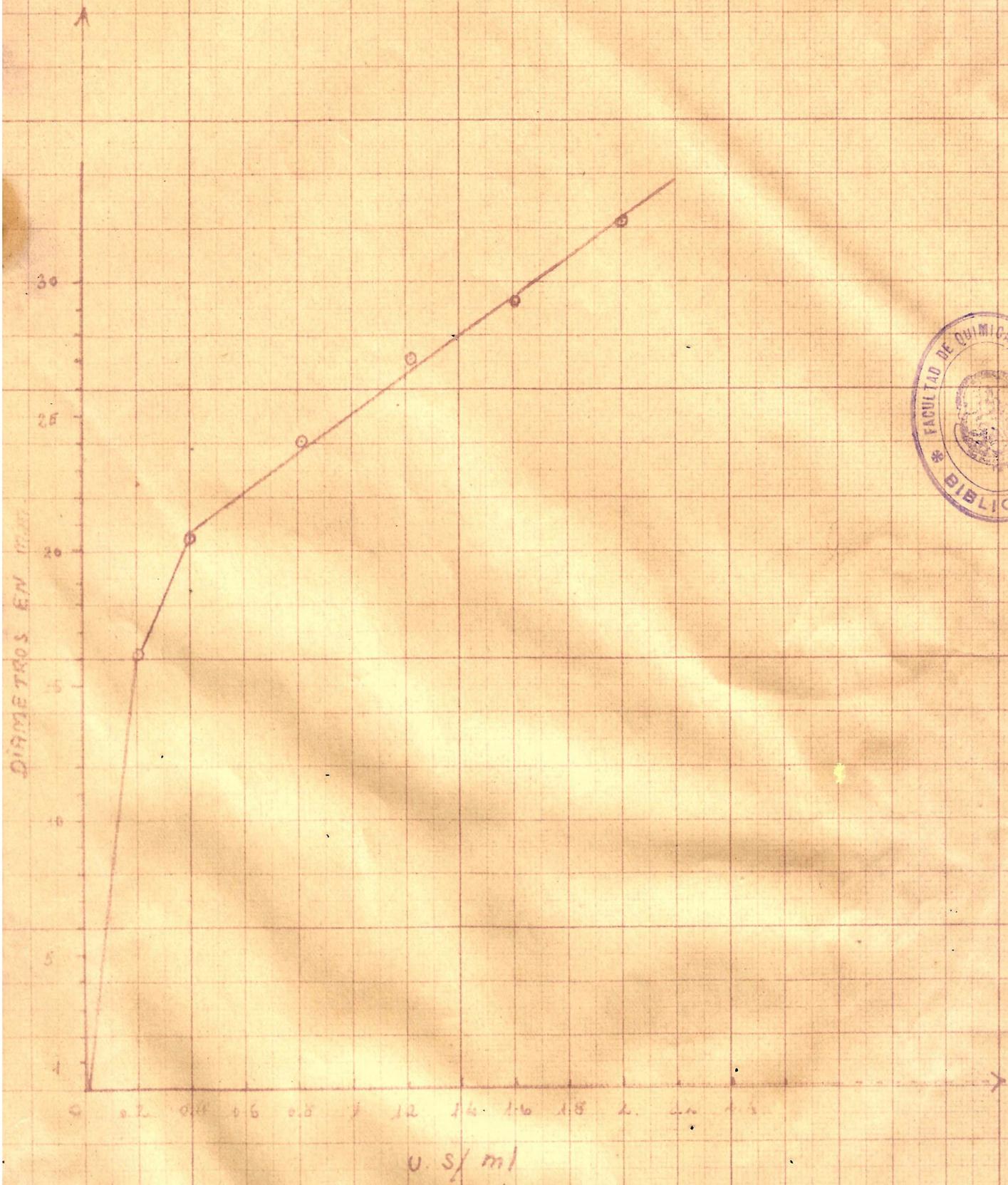
$$16 \cdot 0,02 : 0,32 \cdot 20 : 6,5 \text{ U.S./ml.}$$

0,02 corresponde a la mayor dilución inhibidora del antibiótico.

Por el método de la diastasa reductora, la mayor dilución inhibidora fué : 0,009 y la mínima dilución del suero que impidió la reducción fué : 1/128.

$$0,009 \cdot 128 : 1,152 \cdot 10 : 11,52 \text{ U.S./ml}$$

Se hizo finalmente el dosaje por el método químico de Scudi. Se preparó una solución patrón de manera que 1 ml : 50 U.S. Hicimos una serie de diluciones colocando 5 ml en el 1r. tubo del testigo y 2,5 ml de agua destilada en los restantes; pasamos 2,5 ml del 1r. tubo al 2do. y así sucesivamente; el último tubo tenía solamente agua destilada.



D) CURVA PATRON  
 Método de los discos de papel

44 )

Tubo	1	2	3	4	5	6c	7	8	9	10	T
U.S.	250	125	62,5	31,2	15,6	7,8	3,9	1,9	0,95	0,47	agua d.

Se hizo la reacción colorimétrica. El tubo N° 8 dió rosado muy débil, el N° 9 y el 10 no acusaron color, tampoco el testigo. Trabajando con 5 ml de suero se repitió el ensayo; el color se asemejó al del tubo 3. El cálculo fué :

T/D . U.S./ . 100/V  
 25/23 . 62,5 . 100/5      1.350 U.S. % : 13,5 U.S./ml  
 Promediando tenemos :

9,6	
10,2	
6,5	
11,52	
<u>13,50</u>	
51,32	10,26 U.S./ml.

A las 24 horas se extrajo sangre de nuevo repitiendo las operaciones.

Método de los cil. : 29,0 mm  
 29,8  
30,1  
 29,0 mm; por gráfico : 1,5 U.S./ml

Método de los discos : 30,4  
 30,9  
30,8  
 30,3; por gráfico : 1,65 U.S./ml

Método de la inhibición de los hematies :

La mayor dilución inhibidora de antibiótico : 0,009

La menor " " del problema : 1/256. 256 . 0,009 : 2,3 U.S./ml

Por el método químico :

T/D . U.S. . 100/V      25/20 . 100/5 : 1,95 U.S./ml.

Promediando :

1,5	
1,65	
1,28	
2,3	
<u>1,95</u>	
8,68	1,73 U.S./ml.

Luego :

A los 10 min. de la inyección de estreptomina se encontraron 10,26 U.S./ml

A las 24 horas : 1,73 "  
 8,53 "

O sea : se eliminó por vía renal el 85 % de estreptomina.

Resumen :VII

El presente trabajo tiene por objeto agrupar un conjunto de métodos para el dosaje de estreptomicina. Hemos ensayado el método de los cilindros de vidrio y el de los discos de papel, ambos basados en la difusión de la estreptomicina a través del agar nutricio sembrado con un microorganismo de prueba. Se estudió la acción de algunas sales y sustancias orgánicas en el dosaje y para obtener resultados comparativos hemos comenzado por preparar una solución patrón de estreptomicina en agua destilada; sembrar un medio nutricio y disponerlo en una serie de cajas de Petri conservándolas en refrigerador. Con las placas así dispuestas hicimos la curva patrón y al mismo tiempo hicimos otros ensayos con las mismas concentraciones de antibiótico pero diluidas con distintas concentraciones de sales extrañas. Trabajando con fosfato monoácido de potasio al 10 y al 20 % se logró un aumento de las zonas de inhibición. Cuando se hizo el ensayo con esta sal pero en muy baja concentración, 0,2 %, los valores obtenidos fueron sensiblemente iguales a los obtenidos trabajando con agua destilada. El sulfato de cobre en concentraciones bajas influye visiblemente en los resultados aumentando los diámetros de las zonas de inhibición, También aumentan las áreas con carbonato de sodio al 10 %. El sulfato de cobre fué la sal que dió áreas más aumentadas. Parecería que estas sales ejercieran una acción bactericida contra el estafilococo, facilitando así la acción del antibiótico. Empleando el sulfato de cobre en concentraciones muy bajas y en presencia de un buffer, se obtiene prácticamente los mismos resultados que con agua destilada. El buffer redujo la acción del  $\text{SO}_4\text{Cu}$  frente al microorganismo. Si se practicara un dosaje del antibiótico en el suero de un individuo sin tratamiento y en el de otro tratado con sulfanilamida o sulfapiridina, no tendríamos los mismos resultados pues como se vió, la presencia de estas sustancias orgánicas produce un aumento en las zonas de inhibición, mayor en el caso de la sulfanilamida que en el de la sulfapiridina.

Se estudió la influencia del pH sobre la valoración, para lo cual trabajamos con dos microorganismos : *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes hemolyticus*. Primero se fundió agar nutricio y se repartió en varios erlenmeyers, modificando el pH de cada uno entre 6 y 8; el material fué esterilizado, enfriado y sembrado con 0,1 ml de caldo de cultivo de 24 horas de estafilococo y otra serie con estreptococo, Con una solución patrón de antibiótico en agua destilada se trazaron curvas. Se observó que la estreptomicina se mostró más eficaz por encima del punto neutro que por deba-

jo de él. No podemos atribuir este efecto a un mayor o menor desarrollo de los gérmenes, ya que éstos desarrollan normalmente entre los límites de pH tomados. Esta conclusión es muy importante, ya que el descenso de la actividad de la estreptomycinina en medio ácido constituye un problema para su aplicación clínica.

Así, por ejemplo, en lesiones tisulares puede producirse aumento de pH local y una concentración de antibiótico básico suficiente para inhibir el desarrollo de los gérmenes puede mostrarse incapaz de hacerlo en el foco de la lesión. Varias explicaciones se han dado para tratar de explicar este fenómeno.

Unos suponen que la base libre, dada su mayor penetrabilidad a través de la estructura celular, es más activa que su catión. Otros suponen que la base sólo es activa en forma ionizada, pero como en el caso de las bases fuertes la concentración catiónica no varía mayormente entre pH 6 y 8, hay que admitir que las variaciones en la concentración del medio no influyen sobre la droga sino sobre los gérmenes. La explicación más aceptable de este fenómeno es la que supone una competencia por los grupos polares del cuerpo bacteriano, entre las formas ionizadas de la sustancia activa y los hidrogeniones. Los cambios en la superficie celular por modificación de la reacción del medio, al inhibir la fijación del catión antibiótico sobre el cuerpo bacteriano, constituyen el principal factor de este mecanismo. (11)

Se estudió la influencia que pueden tener la aerobiosis y la anaerobiosis; en el caso de la *Escherichia coli* vimos que en aerobiosis se hizo necesaria una mayor concentración de antibiótico para impedir el crecimiento. El método basado en la inhibición de la hemólisis de los hematíes de conejo que produce el estreptococo hemolítico fué ensayado; es un método rápido ya que las lecturas se hacen a la hora aproximadamente. Se hace una reseña de métodos químicos para el dosaje del antibiótico, basados en la formación de maltol o en la obtención de una hidrazina de estreptomycinina fluorescente. Nosotros ensayamos un método rapidísimo, descrito por Scudi, basado en la reacción de la acetilacetona, portadora de un grupo metileno activado por hallarse entre dos grupos carbonilos, la que en presencia de estreptomycinina y álcali da al b.m. color rosado. El grupo N-metil-1-glucosamina parece ser el responsable de la reacción.

Se menciona un nuevo método original para el dosaje de estreptomycinina, basado en la acción reductora de la diastasa producida

por el *Staphylococcus aureus*, la cual al actuar en un medio con nitrato lo lleva a nitrito, el cual es evidenciado colorimétricamente. Se estudió la acción de algunas sales metálicas en la actividad de la diástasa reductora. En este método es importante tener en cuenta el tiempo de incubación y cuándo el testigo muestra reducción de nitrato, pues se observó que al principio la reacción es positiva de nitrato, pero luego se debilita y se negativiza al fin por pasaje de nitrito a amoníaco, al seguir la acción reductora diastásica; el  $\text{NH}_3$  se evidenció con reactivo de Nessler.

Finalmente se hizo una aplicación de los métodos dosando el antibiótico en la sangre de un conejo al que se inyectó una dosis conocida y observando la eliminación a los 10 minutos y a las 24 horas de haber sido inyectado. Por el método de los discos de papel de filtro se obtienen resultados más altos que por el de los cilindros de vidrio. El método basado en la inhibición de la hemólisis de los hematíes del conejo arrojó resultados más bajos con respecto a los otros métodos; el método de la diástasa reductora dió los valores más elevados. El método químico en un caso arrojó valores más altos que con los otros métodos y en el otro dosaje se mantuvo por debajo del método de los nitritos pero por encima de los demás valores.

Conclusiones :VIII

Comparando los métodos de los discos de papel y de los cilindros de vidrio, el primero resulta algo más conveniente por lo siguiente

1 ) La adaptación de los cilindros de vidrio al agar tiene sus inconvenientes; no deben estar muy sumergidos ni muy adheridos, si no, la difusión se hace irregular.

2 ) En el método de los discos de papel, la colocación de éstos sobre el agar resulta sencilla, los platillos pueden manejarse sin mayores precauciones y pueden estar invertidos durante su incubación. Es importante aquí aplicar rápidamente la muestra, ya que el papel absorbe la humedad del agar.

El nuevo método de la diastasa promete ser útil, rápido y al alcance de cualquier laboratorio.

Se vió que en los métodos de difusión la presencia de sales extrañas puede influir aumentando el área de inhibición, pero en un buffer fosfatado y a pequeñas concentraciones de sales, su efecto es casi nulo o nulo. El pH tiene enorme importancia. La actividad de la estreptomina se mostró mayor por encima que por debajo del punto neutro. En lesiones tisulares, donde hay aumento de  $\text{cH}$  local, una dosis terapéutica eficaz para impedir el desarrollo de los gérmenes en la sangre puede resultar ineficaz en el foco de la lesión.

En el método de la diastasa, la presencia de metales pesados reduce o anula la acción diastásica, según sea su concentración.

Una importante aplicación que puede tener el dosaje de estreptomina aparte de la de investigar la cantidad en sangre, plasma, líquido cefalorraquídeo, etc, en relación con las dosis y vías de administración, es la de establecer la estreptomina resistencia al Koch. Puede ocurrir que un individuo tratado con este antibiótico mejore de su afección en los primeros meses pero luego el germen se vaya haciendo resistente al antibiótico, por lo que este tratamiento perderá su efecto.

Se podría determinar la estreptomina resistencia al Koch, haciendo un aislamiento del germen del esputo del individuo, en medio Petraghani; siguiendo los pasos anteriores se dosarán las unidades por ml de sangre del enfermo, trabajando con una cantidad conocida de gérmenes por ml del cultivo. Se medirán las zonas de inhibición, si usamos los métodos de difusión. Al tiempo, se haría otro dosaje midiendo las zonas de

inhibición. Si estas aumentan de tamaño, significaría que el germen se ha hecho sensible a la estreptomycin; si las zonas disminuyen, el germen se ha hecho resistente al antibiótico.

---

*Dr. J. M. de la Barrera*

Este trabajo ha sido realizado en los Laboratorios de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección científica del Dr; Don José María de la Barrera, a quien mucho agradezco.

---

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Sordelli Alfredo - Los antibióticos y su industria. (Conferencia).  
Industria y Química, Vol. XII N°s. 5 y 6.
- (2) Barrera J.M. - Estreptomina, pediatría de las Américas.  
Vol. N° 9, pg. 488-90 inc. 8.
- (3) Marshall E.K. jr., Blanchard K.C. - Antibiotics from Streptomyces.  
British Medical Journal N° 4590, 1112-3, London.
- (4) Epstein S. y Williams B. - La estreptomina y otras drogas maravillosas. Editorial Hermes, México, cap. V, pg 143 y sig.
- (5) Prescott S.C. y Dunn C. - Microbiología Industrial - M. Aguilkar, Editor, Madrid.
- (6) Titus and Fried - Chemistry of Streptomycin - Jour. Biol. Chem. 174-  
- 57 (1948).
- (7) La Semana Médica, añoLIX; 2814, N° 51 (1947). Estructura del antibiótico Estreptomina.
- (8) Brinck and Flynn - The degradation of Streptomycin and Dihydro-streptomycin with methanol. Jour. American Chem. Soc. LXVIII N° 12 inc. 8.
- (9) Kolmer y Boerner - Métodos de Laboratorio Clínico. Antibióticos, pg. 520-9 (1948).
- (10) Loo J.H., Snell P.S. and Thornberry H.H., Journal of Bacteriology 50, 701, (1945).
- (11) Silverman M., Evans E.A. - Jour. Biol. Chem. 154, 521 (1944).
- (12) Rake and Jones - Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 24, 189 (1943).
- (13) Eisenman N., Bricker E. - Spectrophotometric Methods for determining Streptomycin. Analyt. Chem. 21 (121) 1507-8 inc. 8, Washington.
- (14) Jelinck V.C., Boxer G. - A chemical determination of Streptomycin in body tissues and urine. Jour. Biol. Chem. CLXXV N° 1, 367-75.
- (15) Scudi John V., Boxer George - Science Vol. 104 N° 2708 pg 486.
- (16) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 5th ed. London 1948.
- (17) Verna Luis - Técnicas generales y experimentación bacteriológica. El Ateneo, Bs. As.
- (18) Barzizza Carlos, Manso Soto Alberto, - Microbiología - T. 1, V ed., cap IX pg 157 y sig.

PAGINA 19

El promedio de la sumatoria de la caja V, correspondiente a 1,6 U.S./ml dice: 27,9 mm; debe decir: 27,6 mm.

El promedio de la sumatoria de la caja IX, correspondiente a 3 U.S./ml dice: 34,5 mm; debe decir: 34,43 mm.

PAGINA 21

Renglón 15: Donde dice: Hay que trabajar rápido, pues el cilindro absorbe la humedad del agar. Debe decir: Hay que trabajar rápido, pues el disco absorbe la humedad del agar.

Renglón 18: Donde dice: Por cada cápsula de Petri se usaron tres cilindros, que se humedecieron con la misma solución. Debe decir: Por cada cápsula de Petri se usaron tres discos, que se humedecieron con la misma solución.

Renglón 32: El promedio de la sumatoria de la caja III correspondiente a 0,8 U.S./ml dice: 26,8 mm; debe decir: 26,53 mm.

PAGINA 22

Renglón 30: Dice: Se sacaron las placas del refrigerador y se dispusieron tres discos de vidrio en cada una de ellas con las precauciones de práctica. Debe decir: Se sacaron las placas del refrigerador y se dispusieron tres cilindros de vidrio en cada una de ellas con las precauciones de práctica.

PAGINA 23

Renglón 11: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml (pH:6) dice: 14,7 mm; debe decir: 15,03 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 2,0 U.S./ml (pH:6) dice: 24,3 mm; debe decir: 24,43 mm.

Renglón 17: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,2 U.S./ml (pH:6,5) dice: 12,5 mm; debe decir: 12,23 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,8 U.S./ml (pH:

6,5) dice: 18,5 mm; debe decir: 17,9 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 1,6 U.S./ml (pH:

6,5) dice: 23,0 mm; debe decir: 23,36 mm.

Renglón 23: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml (pH:7) dice: 18,1 mm; debe decir: 18,2 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 1,6 U.S./ml (pH: 7,0) dice: 25,6 mm; debe decir: 26,6 mm.

Renglón 29: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml (pH:7,5) dice: 20,1 mm; debe decir: 20,43 mm.

#### PAGINA 24

Renglón 13: El promedio de la sumatoria correspondiente a 1,2 U.S./ml (pH:6,5) dice: 20,2 mm; debe decir: 20,9 mm.

#### PAGINA 27

Renglón 17: Donde dice:

$400/20.000 \cdot 1/20 \cdot 1/50 : 50.000$

Nº de gérmenes por ml : 50.000 . promedio

Debe decir:

$400/20.000 \cdot 1/20 \cdot 1/50 : 1/50.000$

Nº de gérmenes por mm<sup>3</sup> : 50.000 . promedio

Renglón 29: Donde dice: Anaerobiosis; debe decir: Aerobiosis.

Donde dice: Aerobiosis; debe decir: Anaerobiosis.

#### PAGINA 28

Renglón 8: Donde dice: ... trabajando en aerobiosis. Debe decir: ... trabajando en anaerobiosis.

#### PAGINA 29

Renglón 7: El promedio de la sumatoria correspondiente a 1,2 U.S./ml dice: 25,6 mm; debe decir: 25,3 mm.

Renglón 13: El promedio de la sumatoria correspondiente a

0,4 U.S./ml dice: 22,8 mm; debe decir: 22,6 mm.

Renglón 17: Donde dice: Método de los discos de vidrio.

Debe decir: Método de los cilindros de vidrio.

Donde dice: Método de los cilindros de papel.

Debe decir: Método de los discos de papel.

Renglón 22: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,8 U.S./ml (Método de los cilindros de vidrio) dice: 25,2 mm; debe decir: 25,5 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml (Método de los discos de papel) dice: 25,5 mm; debe decir: 24,16 mm.

Renglón 28: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml dice: 24,2 mm; debe decir: 24,53 mm (Método de los cilindros de vidrio).

El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,8 U.S./ml dice: 27,4 mm; debe decir: 27,6 mm (Método de los cilindros de vidrio)

Renglón 40: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,2 U.S./ml (Método de los cilindros de vidrio) dice: 17,5 mm; debe decir: 17,2 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,8 U.S./ml (Método de los discos de papel) dice: 28,7 mm; debe decir: 29,4 mm.

Renglón 46: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,8 U.S./ml (Método de los discos de papel) dice: 32,0 mm; debe decir: 31,7 mm.

#### PAGINA 30

Renglón 6: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml (método de los cilindros de vidrio) dice: 23,0 mm; debe decir: 23,6 mm.

El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,4 U.S./ml (método de los discos de papel) dice: 25,4 mm; debe decir: 24,1 mm.

Renglón 14: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,2 U.S./ml (método de los cilindros de vidrio) dice: 15,9 mm;

debe decir: 15,7 mm

Renglón 32: El promedio de la sumatoria correspondiente a 0,2 U.S./ml (método de los discos de papel) dice: 14,6 mm; debe decir: 17,5 mm.

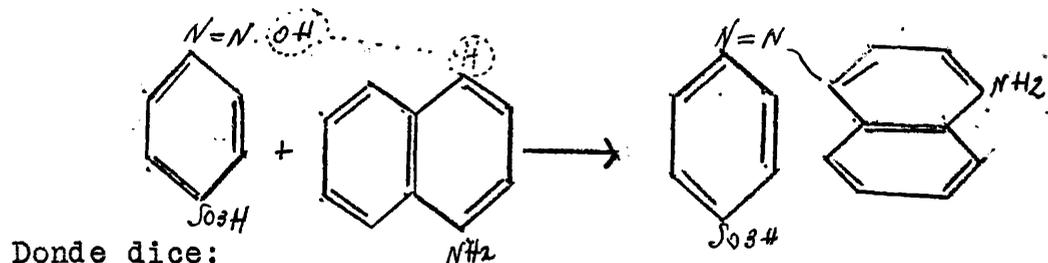
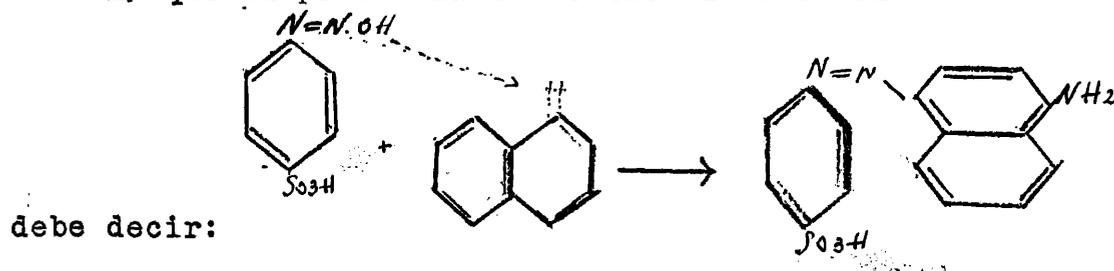
PAGINA 33

Renglón 5: Donde dice: ... cuya potencia es: 0,25 - 0,125 - 0,063 - 0,031 - 0,016 - 0,008 - 0,004 - 0,002 unidades. Debe decir: ... cuya potencia es: 0,25 - 0,125 - 0,0625 - 0,0312 - 0,0156 - 0,0078 - 0,0039 - 0,00195 unidades.

PAGINA 38

Donde dice:

4) que en presencia de acetato de naftilamina:



Diluciones: 1 ml : 10 U.S. Inicial: 1:4. Diluciones al medio: 1,25 - 0,625 - 0,317 - 0,158 - 0,079 - 0,039 - 0,019 - 0,009 - 0,0045 - 0,0022.

Debe decir:

Diluciones: 1 ml : 10 U.S. Dilución inicial: 1:4. Diluciones siguientes al medio: 1,25 - 0,625 - 0,312 - 0,156 - 0,078 - 0,039 - 0,0195 - 0,00975 - 0,00487 - 0,00243.

PAGINA 39

Renglón 5: Donde dice: El último tubo que mostró reducción

de nitrato fué el correspondiente a la dilución 0,079.

Debe decir: El primer tubo que mostró reducción de nitrato fué el correspondiente a la dilución 0,078.

Renglón 14: Donde dice: 2,50 1,25 0,625 0,317 0,158  
0,079 0,039 ... 0,0022.

Debe decir: 2,50 1,25 0,625 0,312 0,156 0,078 0,039 ...  
0,00243.

#### PAGINA 40

Renglón 2: Donde dice: ... y nos encontramos con que el último tubo ... Debe decir: ... y nos encontramos con que el primer tubo ...

Renglón 3: Donde dice: ... dilución 0,079, sino el anterior a él, de dilución 0,158 ... Debe decir: ... dilución 0,078, sino el anterior a él, de dilución 0,156 ...

Renglón 18: Donde dice: ... es decir, que la estreptomycinina en concentraciones de: 0,019 a 0,317 U.S./ml. Debe decir: ... es decir, que la estreptomycinina en concentraciones de: 0,004~~7~~<sup>8</sup> a 0,156 U.S./ml.

#### PAGINA 41

Renglón 14: Donde dice: 2,50 1,25 0,625 0,317 0,118  
0,079 0,039 ... 0,0022. Debe decir: 2,50 1,25 0,625 0,312  
0,156 0,078 0,039 ... 0,00243.

#### PAGINA 42

Renglón 19: Donde dice: Una partida de cajas fué utilizada para la curva patrón; otra para el método de los cilindros y otra para el de los discos de papel. Debe decir: Una partida de cajas fué utilizada para trazar las curvas patrones, otra para dosar el antibiótico en un suero por el método de los cilindros de vidrio y otra por el método de los discos de papel.

Renglón 22: Donde dice: Valores para la curva patrón; debe agregarse: método de los cilindros de vidrio.

PAGINA 43

Renglón 29: Donde dice: Por el método de la diastasa reductora, la mayor dilución inhibidora fué: 0,009 y la mínima dilución del suero que impidió la reducción fué: 1/128

0,009 128 1,152 10 11,52 U.S./ml

Debe agregarse: El suero fué diluido al décimo; 10 es el factor de dilución.

Renglón 35: Donde dice: Hicimos una serie de diluciones colocando 5 ml en el primer tubo del testigo y 2,5 ml de agua destilada en los restantes; pasamos 2,5 ml del primer tubo al segundo... Debe decir: Hicimos una serie de diluciones colocando 10 ml en el primer tubo de la serie y 5 ml de agua destilada en los restantes; pasamos 5 ml del primer tubo al segundo...

PAGINA 44

Renglón 6: Donde dice:

T/D U.S./100/V

Debe decir: T/D U.S./ml 100/V

Renglón 9: Donde dice: Promediando tenemos:

9,6  
10,2  
6,4  
11,52  
13,5  

---

51,32 10,26 U.S./ml

Debe decir: Promediando tenemos:

9,6 Método de los cilindros de vidrio  
10,2 Método de los discos de papel  
6,4 Método de Rake y Jones  
11,52 Método de la diastasa reductora  
13,5 Método químico de Scudry  

---

51,32 10,26 U.S./ml

Renglón 21: Donde dice: 29,0 mm; debe decir: 29,6 mm.

Renglón 26: Donde dice: Método de la inhibición de los hematíes:

La mayor dilución inhibidora de antibiótico: 0,009

La menor dilución inhibidora del problema: 1/256. 256.0,009:2,3US/ml

quedó omitido un renglón correspondiente a los valores del método de Rake y Jones, pues los que figuran como tales corresponden al método de la diastasa reductora.

Debe decir: Método de la inhibición de la hemólisis de los hematíes:

La mayor dilución inhibidora de antibiótico: 0,02

La menor dilución inhibidora del problema: 1/64

0,02 . 64 : 1,28 U.S./ml

Método de la diastasa reductora:

La mayor dilución inhibidora de antibiótico: 0,009

La menor dilución inhibidora del problema: 1/256

0,009 . 256 . 2,3 U.S./ml

Por el método químico:

Donde dice:

T/D . U.S. . 100/V : 25/20 . 100/5 : 1,95 U.S./ml .

Debe decir: El tubo problema coincidió con el tubo patrón N° 6.

25/20 7,8 . 100/5 . 195 U.S. % : 1,95 U.S./ml

Promediando:

1,5	Método de los cilindros de vidrio
1,65	Método de los discos de papel
1,28	Método de Rake y Jones
2,3	Método de la diastasa reductora
1,95	Método químico de Seudy
<hr/>	
8,68	1,73 U.S./ml

#### PAGINA 46

Reiglón 23: Donde dice: ... vimos que en aerobiosis ...

Debe decir: ... vimos que en anaerobiosis ...

#### PAGINA 47

Reiglón 15: Donde dice: ... el método de la diastasa reductora dió los valores más elevados. Debe decir: ... el método de la diastasa reductora arrojó en un caso los valores más ele-

vados con respecto a los otros métodos; en el otro caso se mantuvo por encima de los valores arrojados por el método de los cilindros de vidrio, de los discos de papel y del método de Wake y Jones; pero por debajo de los valores correspondientes al método químico.

PAGINA 48, renglón 13. Dice : m. diast. red. Debe decir: m. difusión.

#### NOTAS

En la página 47, renglón 12, las consideraciones que se hacen con respecto a los valores arrojados por los distintos métodos, deben figurar en la página 48 (en Conclusiones).

En la página 48, el párrafo que comienza en el renglón 30 hasta el final del capítulo, debe figurar en el capítulo III como introducción a los DIFERENTES METODOS DE DOSAJE.

Con posterioridad a la presentación de este trabajo, el autor halló que, el principio del método que da como propio, figura en "ANTIBIOTICS" (Florey), Volumen 1, página 152: Oxford Medical Publications.

#### Gráfico N° 5:

A: Donde dice: Curva patrón, método de los discos de vidrio

Debe decir: Curva patrón, método de los cilindros de vidrio

B: Donde dice: Curva patrón, método de los cilindros de papel

Debe decir: Curva patrón, método de los discos de papel

Gráfico entre páginas 29 y 30:

La curva que dice:  $\text{CuSO}_4$  1% corresponde a la de fosfato y vice-versa.

*Director Comunal*