

NIVELES DE LA D (—) ALFA-AMINO-BENCIL PENICILINA EN EL SUERO DE OVINOS

Por Moisés Puente Castro

INTRODUCCION

Desde que FLEMING en el año 1929, demostró, que una cepa de *Penicillium notatum* Westling, producía un antibiótico, hoy llamado penicilina y dotado de gran actividad bactericida frente a gérmenes gran positivos, han sido precisas numerosas investigaciones y experiencias clínicas para llegar al estado actual de los conocimientos que de éste y otros antibióticos poseemos en la lucha contra gran número de infecciones que atacan al hombre y a los animales.

Todas las penicilinas conocidas tienen un núcleo común, el ácido 6-aminopenicilánico, diferenciándose unas de otras por los grupos acílicos unidos a él. La posibilidad de obtención en el laboratorio del ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicilina G natural, abrió un nuevo campo a la química de las penicilinas; la reacción del ácido 6-aminopenicilánico con distintos cloruros de ácidos, ha permitido la obtención de una gran variedad de penicilinas llamadas semisintéticas, que han venido a resolver el problema creado por las naturales debido a la aparición de cepas de estafilococos resistentes, productoras de una penicilinasa capaz de atacar la molécula en el anillo alfa-lactámico y destruir su actividad antimicrobiana. Tienen además la ventaja, en principio, de poder ser administradas por vía oral, al ser estables en medio ácido, propiedad que no poseían las anteriores.

En los últimos años ha adquirido gran importancia, en la lucha contra numerosas infecciones, la D (-) alfa-amino-bencil penicilina (ampicilina), por su amplio espectro sobre gérmenes gran positivos y gran nega-

tivos. Tienen un peso molecular de 349,2 y está constituida por el 55,00 % de C; el 5,48 % de H; el 12,02 % de N; el 18,32 % de O y el 9,18 % de S.² Actualmente en el mercado hay ampicilinas en forma soluble: la ampicilina sódica y las insolubles como la ampicilina dibencil etileno diamínica (benzatina) y la ácida.

DOYLE y col. 3,4 (3) y (4) además de sintetizar varias penicilinas semi-sintéticas, hacen un estudio de la estabilidad física en concentraciones de 1 mcg/ml. en etanol-agua al 50 % y a 35°C entre todas las conocidas y llegaron a la conclusión que la ampicilina es mucho más estable que las penicilinas G y V.

Los primeros trabajos desde el punto de vista farmacológico sobre la D (-) alfa-amino-bencil penicilina, fueron llevados a cabo por LOINSON y STEVENS, KNUDSEN, BROW y ACRED en el año 1961, BUNN⁵ y AUBAGEN⁶ comprobando que es eficaz contra una gran variedad de gérmenes gran positivos y negativos y a bajas concentraciones es altamente bactericida.⁷ En algunos casos produce por vía oral algunas reacciones alérgicas y anafilácticas y en muchas ocasiones la toxicidad atribuida a este antibiótico, puede estar enmascarada por la acción de agentes stresantes o por la propia enfermedad, apreciándose, aunque raramente, alteraciones hepáticas y en el tránsito del contenido intestinal que se traduce en diarrea; otras veces y en virtud de su acción neurotóxica aparece ligera depresión medular. Por vía parenteral suele ser bien tolerada.⁸

A dosis de 10 a 20 mg. por kilo de peso corporal (en este trabajo utilizamos 15 mg.) y de dos a cuatro veces por día,⁹ produce buenos efectos terapéuticos contra las distintas variedades de estafilococos; pasterelas eschericha coli, proteus, pseudomonas, aerobacter aerogenes, etc. TURNER y LARKIN,¹⁰ citando a KERR y BRANDER, señalan que este antibiótico se muestra eficaz en la prevención de la salmonelosis de los terneros a dosis de 50-100 y 200 mg por animal y día, vía oral y siempre que se mantenga su administración durante un mínimo de catorce días. Todos los terneros que recibieron ampicilina presentaron un índice de reposición superior a los testigos.

ACRED, LARKIN y MIZEN¹¹ han dado a conocer después de la administración por vía oral de 50 mg. por ternero de diez días de edad, los niveles de ampicilina en el contenido del rumen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado, grueso y recto, así como en los tejidos de estos órganos, en bilis, orina y suero, a la hora, dos, cuatro, seis, diez, y veinticuatro horas después de su administración, expresando los valores obtenidos en microgramos por gramo o mililitro. GEORBE y col.¹² entre otros muchos dan a conocer los niveles que la ampicilina alcanza en el suero humano y su excreción por la bilis. ROLINSON y STEVENS (1961) y BRANDER (1963),¹³ así como LARKIN y MAUREN,¹⁴ demuestran que la ampicilina actúa in vitro sobre salmonelas y organismos coliformes procedentes de terneros y

que las condiciones mínimas inhibitorias mínimas (MIC) son de 0,25 mcg. a 5 mcg. y que in vivo son necesarias concentraciones superiores.

Nuestro trabajo tiene como finalidad dar a conocer los niveles de ampicilina sódica y benzatina en el suero de reses lanares después de su administración oral y parenteral a dosis de 15 mg. por kilo de peso corporal, teniendo en cuenta su reciente aparición en el mercado nacional y para uso veterinario.

MATERIAL Y METODOS

El material empleado para la realización de este trabajo fue el siguiente:

Placas rectangulares con marco de aluminio, de 32 × 12 cm.; cilindros de acero inoxidable de 8 mm. (± 0,1) de diámetro exterior, 6 mm. (± 0,1) de diámetro interior, con altura de 10 mm. (± 0,1) y de bordes planos; agar; peptona; lacto caseitone; extracto de carne y levadura; glucosa; agua destilada estéril; fosfato potásico dibásico (PO_4HK_2); fosfato potásico monobásico ($\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$); autoclave; Sarcina lutea, fotocolorímetro; caldo Difco Penassay; ampicilina sódica y benzatina; potenciómetro, proyector de 500 diámetros de aumento, estufa de cultivo, reses lanares. fue entre otro el material más utilizado.

Las penicilinas naturales producidas por la actividad de ciertos microorganismos y las semisintéticas pueden dosificarse en medios líquidos orgánicos, mediante métodos químicos; de todos los descubiertos sólo el iodométrico basado en que la molécula de penicilina activa no absorbe el yodo, mientras que el producto de la inactividad alcalina, penicilinato sódico, si lo absorbe, es el que más se emplea en la actualidad.¹⁵

Sin embargo los de más uso y con los que se obtienen mejores resultados son los biológicos, basados en el grado de inhibición del germen test en medio sólido (método por difusión en agar), o en medio líquido (método turbimétrico), no utilizado en la práctica.

El que seguimos en el presente trabajo está basado en el halo de inhibición que la ampicilina produce sobre un cultivo sólido de Sarcina lútea¹⁶ utilizado como organismo de prueba.

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: Difco Penassay Seed Agar (B-263-02); agar-base (agar 15 gr., agua destilada c.s. para 1.000 ml.); y agar siembra (extracto de carne 1.5 gr.; extracto de levadura 3 gr.; Lacto caseitone 4 gr.; peptona 6 gr.; glucosa 1 gr.; y agua destilada c.s. para 1.000 ml.). Los dos últimos medios de cultivo fueron sometidos a una esterilización a 120°C durante 20 minutos y con pH final de 6,6-6,8.

La solución tampón de fosfatos empleada¹⁷ estuvo formada por: fosfato potásico dibásico 20 gr., fosfato potásico monobásico 80 gr. y agua

destilada c.s. para 1.000 ml. Al igual que los medios de cultivo descritos, precisa una esterilización a 120°C durante 20 minutos y un pH final de 6,00.

El germen test fue la *Sarcina lútea* (ATCC 9.341; F. D. A. 1001) y cultivado en caldo Penassay a temperatura de 32°C durante 24 horas. El cultivo líquido de este germen tiene que dar una transmisión aproximada del 10 % con filtro de 530 Å en fotolorímetro de una sola célula y leída en tubo de 18 mm. El blanco está constituido por el caldo Penassay estéril.

Se emplearon placas rectangulares con marco de aluminio, de fondo de cristal, tapa de aluminio agujereada y con dimensiones de 32 × 12 cm. Pueden también emplearse placas de Petri. Las placas rectangulares son colocadas sobre una mesa y cuando estén perfectamente niveladas se vierte en cada una de ellas 50 ml. de agar base. Dejadas en reposo, media hora es suficiente. Solidificado el agar se vuelve añadir a cada una de ellas, otros 20 ml. de agar siembra, previamente inoculado con la *Sarcina lútea* (0,2-0,3 por placa) y mantenido en estufa a 48°C. Treinta minutos después la capa de agar siembra está perfectamente solidificada, pudiéndose colocar sobre ella los cilindros y distribuidos como es habitual para este tipo de determinaciones. Sobre estos cilindros ponemos el patrón de ampicilina, preparado a partir de una solución madre que contenía 500 unidades por mililitro, hasta conseguir, empleando como diluyente el buffer de fosfatos, soluciones con 8 — 0.1 — 0.2 y 0.4 unidades por mililitro. Sobre otros cilindros pondremos los problemas, sueros sanguíneos de ovejas obtenidos como a continuación se indica.

Elegimos dos lotes de 24 ovejas cada uno, de uno a cuatro años de edad. Se pesaron una a una y se identificaron con un botón en oreja. A estas cuarenta y ocho ovejas les hicimos una toma de 5-7 ml. de sangre de la yugular y el suero obtenido, previa coagulación, nos sirvió para determinar si en el suero de estas reses lanares existían antibióticos u otras sustancias que inhibiera el crecimiento de la *Sarcina lútea*. Ocho de las ovejas fueron desechadas y sustituidas por otras, cuyos sueros estaban exentos de agentes inhibidores del organismo de prueba.

El primer lote de 24 ovejas fue utilizado para conocer los niveles en suero de ampicilina sódica, administrada a doce por vía parenteral y a las restantes por vía oral, a dosis de 15 mg. por kilo de peso corporal. Media hora después, una, una y media, dos, dos y media y tres se extrajeron por punción en la yugular mediante un trocar 5-7 ml. de sangre, recogida en tubo rigurosamente estéril.

El segundo lote formado por otras 24 ovejas fue utilizado para conocer los niveles de ampicilina benzatina administrada a doce por vía parenteral y a las restantes por vía oral, a dosis de 15 mg. por kilo de peso corporal. A las dos horas, cinco, nueve y catorce se extrajeron a cada una de las

ovejas y tiempos indicados por punción en la yugular 5-7 de ml. de sangre recogida en tubo rigurosamente estéril.

Previo coagulación y dilución de los sueros a 1 : 2 o 1 : 3 se colocaron en los cilindros de la placa con agar siembra inoculada con el organismo de prueba. Para cada suero problema fue empleada una placa.

Las placas son incubadas a 32°C durante 18-24 horas, al cabo de las cuales y mediante un proyector de 500 diámetros de aumento se procedió a la medida de los halos de inhibición de las soluciones del patrón y de las del problema. Los valores medios de los halos de cada una de las concentraciones del patrón y los de los sueros problemas son llevados a un papel semilogarítmico de dos ciclos, anotando en las ordenadas las concentraciones y en las abscisas los valores medios de los halos de inhibición. Trazamos una línea recta que una los cuatro puntos del patrón y de esta manera obtenemos la curva patrón sobre la que leeremos los valores medios de los diámetros de halos de inhibición de los sueros problema y el resultado expresa unidades por mililitro. El valor obtenido, si el suero fue diluido, habrá que multiplicarlo por el grado de dilución si queremos saber la potencia real de la muestra expresada en unidades por ml.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos tras la administración de 15 mg. de ampicilina sódica por vía intramuscular, en diez de las doce ovejas objeto de esta experiencia, y expresados en unidades por mililitro de suero sanguíneo, fueron los siguientes:

N.º oveja	½ h.	1 h.	1 ½ h.	2 h.	2 ½ h.	3 h.
1	8,15	4,25	3,12	1,55	1,73	0,26
2	7,23	5,10	—	2,25	0,98	0,08
3	6,95	4,60	3,41	1,34	1,54	0,29
4	7,12	5,77	2,15	2,06	0,73	0,17
5	6,90	6,02	2,95	2,47	1,03	0,60
6	7,70	3,97	3,20	1,86	1,54	—
7	7,22	4,05	3,05	2,04	1,22	0,08
8	7,95	5,57	2,50	2,07	1,17	0,20
9	8,21	6,00	3,00	2,15	2,05	0,10
10	—	4,75	2,82	1,86	2,10	0,20

De acuerdo con las normas generales en el campo de las penicilinas semisintéticas, un microgramo de ampicilina sódica, equivale a 0,94 unidades, y uno de ampicilina benzatina a 0,75 unidades.

Los valores medios obtenidos a la media hora fueron de 7,48 U/ml.; a la hora de 5,00 U/ml.; a la hora y media de 2,90; a las dos horas de 1,96; a las dos horas y media de 1,40 y a las tres horas de 0,22 U/ml. Están representados en la gráfica número 1.

En las sesenta muestras de suero obtenidas de las otras doce ovejas que recibieron la misma dosis de ampicilina sódica por vía oral, los resultados fueron negativos en cincuenta y ocho de los sueros problema y sólo en dos de ellos se encontraron valores de 0,098 y 0,015 U/ml.

En el segundo lote de 24 ovejas a las que se administró la misma dosis de ampicilina benzatina por vía intramuscular y oral, los resultados obtenidos, expresados en U/ml. de suero sanguíneo fueron en las que la recibieron por vía intramuscular los siguientes:

N.º oveja	2 h.	5 h.	9 h.	14 h.
1	1,09	0,79	0,12	0,05
2	0,66	0,31	0,16	0,15
3	—	0,37	0,09	0,03
4	1,17	0,82	0,19	0,08
5	1,23	0,97	0,24	0,21
6	0,65	0,29	0,07	0,02
7	0,74	0,21	0,10	0,09
8	1,00	0,75	0,19	0,18
9	0,97	0,26	0,07	0,02
10	0,84	0,31	0,12	0,10

Los valores medios en diez de las doce ovejas fueron los siguientes: a las dos horas 0,928; a las cinco horas 0,508; a las nueve horas 0,135 y a las catorce horas 0,093 U/ml. de suero y que se representa en la gráfica número 2.

Los obtenidos en diez de las doce ovejas que la recibieron por vía oral, fueron los siguientes:

N.º oveja	2 h.	5 h.	9 h.	14 h.
1	0,019	0,050	0,025	—
2	0,000	0,024	0,014	—
3	0,000	—	0,019	—
4	0,000	0,028	0,012	—
5	0,003	0,047	0,023	—
6	0,027	0,061	0,051	0,007
7	—	0,018	0,000	—
8	0,112	0,043	0,026	—
9	—	0,022	0,013	—
10	0,007	—	0,016	—

Los valores medios fueron: a las dos horas 0,0068; a las cinco horas 0,0370; a las nueve horas 0,0199 y a las catorce horas no pudieron dosificarse ninguna cantidad a excepción de la oveja N.º 6. Los resultados están reflejados en la gráfica número 3.

La ampicilina sódica es un antibiótico muy soluble. Después de su administración a ovinos por vía parenteral, pasa rápidamente a la sangre. Los máximos niveles en suero los encontramos a la media hora, a partir de la cual van descendiendo. Entre dos horas y media y tres los niveles hallados son inferiores al MIC, razón por la cual es precisa una segunda dosis si queremos mantener su poder bactericida. Cuando se la administramos por vía oral, se disuelve con rapidez en los proventriculos y el medio químico la destruye antes de que pueda alcanzar el torrente circulatorio. Esta puede ser, entre otras, la razón por la que no la encontramos en el suero de los animales objeto de nuestra experiencia.

La ampicilina benzatina, al contrario, es poco soluble y después de su administración por vía parenteral en ovinos, los niveles hallados son mucho más bajos, pero se mantienen casi hasta las nueve horas después, dentro de los límites en los que este antibiótico ejerce poder bactericida. Cuando se la administra por vía oral, dada su baja solubilidad, la reacción química del contenido de los proventriculos la destruye con mayor dificultad y por ello puede dosificarse en el suero aunque en proporciones de escaso poder bactericida. En apoyo de esta tesis que sustentamos, hemos de citar el trabajo de POOLE y col.¹⁸ que después de experiencias en el perro encuentran valores de 11 y 20,6 cuando administraban ampicilina ácida trihidrato y ampicilina anhidra. De todas formas creemos no puede descartarse en nuestro caso la influencia del catión benzatílico sobre la absorción y más aún la importancia que las cargas de la molécula de ampicilina tienen sobre la absorción por vía oral.¹⁹

Los hechos observados y los resultados obtenidos nos llevan a las siguientes conclusiones:

a). La ampicilina sódica administrada por vía parenteral a los ovinos, pasa con rapidez al torrente circulatorio, pero los niveles bactericidas son de corta duración, razón por la cual es necesario repetir la dosis antes de las tres horas.

b). La ampicilina sódica administrada por vía oral a los ovinos no produce efectos terapéuticos generales al ser destruida por el medio químico de los proventrículos, antes de que alcance el torrente circulatorio.

c). La ampicilina benzatina en los ovinos por vía parenteral, se mantiene en niveles óptimos entre las cinco y nueve horas después de su administración.

d). La ampicilina benzatina administrada por vía oral a los ovinos alcanza en suero sanguíneo su máxima concentración a las cinco horas, pero sus niveles tienen escaso poder bactericida.

RESUMEN

El presente trabajo tiene como finalidad dar a conocer los niveles hallados en el suero sanguíneo de reses ovinas a las que se administró por vía oral y parenteral la D (-) alfa-amino-bencil penicilina (ampicilina) sódica y benzatina a dosis de 15 mg. por kilo de peso vivo.

La ampicilina sódica y benzatina fue determinada a partir del suero de los ovinos, siguiendo el método biológico basado en el grado de inhibición de la *Sarcina lutea* germen test, cultivada en medio sólido de agar y sobre placas rectangulares.

El interés de este trabajo reside en poner a disposición de los clínicos veterinarios, los niveles de este antibiótico, de reciente aparición en el mercado nacional, en orden a la utilización terapéutica en la clínica de los ovinos.

RESUME

Le but de ce travail est de faire connaître les niveaux trouvés dans le sérum hémolytique de bovins auxquels on avait administré 15 mg./Kg. poids de l'animal, de D (-) -amino-benzyl-pénicilline (Ampicilline) de Sodium et Benzatine, par la voie orale et parentérale.

L'Ampicilline de Sodium et l'Ampicilline Benzatine furent déterminées à partir de sérum d'ovins en suivant la méthode biologique basée sur le degré d'inhibition de la *Sarcina lutea* cultivée dans un milieu solide d'agar et sur des plaques rectangulaires.

L'intérêt de ce travail à mettre à disposition des vétérinaires cliniciens les niveaux de cet antibiotique, récemment paru dans le marché national, destiné à être utilisé comme agent thérapeutique dans le traitement des ovins.

SUMMARY

The purpose of this work is to let know the levels found in hemolytic serum of ovine animals to which Sodium and Benzathine D (-) -aminobenzyl-penicillin (Ampicillin) were given orally and parenterally at doses of 15 ml/Kg body weight.

Sodium Ampicillin and Benzathine Ampicillin were determined from ovine serum by using the biological method based upon the inhibition grade of *Sarcina lutea* cultivated in an agar solid medium and on rectangular plates.

The interest of this work is to show to the clinic veterinarians the levels of the above mentioned antibiotic which has been lately put into national market and is available as therapeutical agent in the treatment of ovine animals.

BIBLIOGRAFIA

1. BARCHELOR, F. R.; DOYLE, F. P.; NAYLOR, J. H. C. and ROLINSON, G. H. (1959).—Synthesis of penicillin: 6-amino penicillanic in penicillin fermentations. *Nature*, 183, 257.
2. INDEX MERK (1968).—8.^a edit. pág. 75.
3. DOYLE, P. F.; FOSKER, G. R.; NAYLER, J. H. C. and SMITH (1962).—Derivatives of 6-aminopenicillanic acid. Part I alfa Aminobenzylpenicillin and Some Related compounds. *J. Chem. Soc.* 4, 1440.
4. DOYLE, P. F. and NAYLER, J. H. C. (1961).—Some novel acidstable Penicillins. *Nature* 191, 1091.
5. BUNN, P. A. (1961).—Antimicrobial agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. *Ann. Arbor Mich.* 739.
6. HUBAGEN, E. (1962).—Ampicillin-Biotin, A. Wide Spectrum Penicillin. *Arzneimittel-Forsch.* 12, 791-801.
7. WIDDONWSON, L. W. and HUBNER, R. A. (1969).—Use of Ampicillin in Small Animal Practice. *Vet. Med.* 64, 507-510.
8. A. M. A. Council on Drugs: New Drugs. American Medical Assn. (1967).—Chicago, pág. 14-15.
9. GOODMAN, L. S. and GILMAN, A. (1965).—*The Pharmacological Basis of Therapeutics III*. Macmillan Co. New York, 1176-1179; 1209, 1212 y 1213.
10. TURNER, T. W. and LARKIN, P. J. (1966). Treatment of Alimentary infections of the Dog and Cat With Ampicillin. *Brit. Vet. J.* 122, 74-80.
11. ACRED, P.; LARKIN, P. J. and MIZEN, I. (1966).—The distributions of orally administered Ampicillin in calves. *Vet. Rec.* 4; 103-104.
12. GEORGE, C.; HENEGAR, MILTON SIVEMAN, ROBERT J.; GARNER, JOHN C. KUKRAL, and FREDERICK W. PRESTON (1961).—*Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Edit. Finland Savage. American Society Microbiology. pág. 348-351.

13. BRANDER, G. C. (1963).—International Veterinary Congress Hanover.
14. LARKIN, J. P. and MAUREEN HICKS (1967).—Diagnosis and Treatment of Chronic Salmonella Typhimurium Infection in Sows. *Vet. Rec.* 10; 231-233.
15. GROVE C. DONAL and RANDALL, A. W. (1955).—*Assay Methods of antibiotics. A Laboratory Manual*. Edit. Medical Encyclopedia, Inc. New York. pág. 16.
16. GROVE C. DONAL and RANDALL, A. W. (1955).—*Op. cit.* (15) pág. 200.
17. GROVE C. DONAL and RANDALL, A. W. (1955).—*op. cit.* (15) pág. 200.
18. POOLE, J. W.; OWEN, G.; SILVERIO, J.; FRYHOF, J. N. and ROSENMAN, S. B. (1968).—*Current Therap. Res.*, 10, 292.
19. DAHNE, W.; FREDERIKSEN, E.; GUDERSEN, E.; LUND, F.; MORCHI, P.; PETERSEN, H. J.; ROHOLT, K.; TYBRING, L. and GODTFREDSEN, W. O. (1970).—Acylomethyl Estes of Ampicilin. *J. Med. Chem.*, 4, 607.



