Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
C E I S A

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA

Producción y Evaluación "In Vitro" de un Suero Antipenicilinasa

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

25 ENE. 1999

Trabajo dirigido, presentado como requisito parcial para optar al título de Médico Veterinario.

Por :

ARMANDO CELEMIN AGUDELO

JAIME JOSE FERNANDEZ ARBOLEDA

Bogotá, D.E., Septiembre de 1982

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA

RECTOR DE LA UNIVERSIDAD	:	Dr. Francisco Varela Anjel
VICE RECTOR ACADEMICO	:	Dr. Antonio Ramírez Soto
SECRETARIO GENERAL	:	Dr. Guillermo Sicard Montejo
DECANO DE LA FACULTAD	:	Dr. Aureliano Hernández Vásquez
VICEDECANO DE LA FACULTAD		Dr. Enrique Mejía Cuartas
SECRETARIO DE LA FACULTAD		Dr. Jairo Guillermo Rey Rey
DIRECTOR DEL TRABAJO	:	Dr. Víctor Cotrino Badillo
CO DIRECTOR DEL TRABAJO	:	Dra. Olga C Mariño Jannaut
PROFESOR DE LA MATERIA	:	Dr. Hernán Morales Alarcón
JURADOS	:	Dra. Judith Figueroa de Almanza
		Dr. Eladio Jaramillo Morales

Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
C E I S A

" El Presidente de Tesis, el Consejo de Tesis y el Jurado Examinador no serán responsables de las ideas emitidas por el Candidato".

(Artículo 104 del Reglamento de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia.)

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Lucía Fajardo de Laboratorio Wyeth que nos proporcionó la penicilinasa, sin la cual no hubiese sido posible la realización del presente trabajo.

A las Doctoras Olga C. Mariño y Olga Esperanza Rueda de Clavijo que ampliamente nos colaboraron en la parte de inmunología del trabajo.

A LOS NUESTROS

TABLA DE CONTENIDO

		Página
1.	INTRODUCCION	1
2.	REVISION DE LITERATURA	3
2.1	HISTORIA DE LA PENICILINA	3
2.2	ESTRUCTURA QUIMICA	5
2.3	MECANISMO DE ACCION DE LOS PRODUCTOS ANTIMICROBIANOS	8
2.3.1	Por Antagonismo competitivo	8
2.3.2	Por inhibición de las funciones de la membrana celular.	9
2.3.3	Por inhibición de síntesis de proteínas	9
2.3.4	Por inhibición de síntesis de ácido nucléico	10
2.3.5	Por inhibición de la síntesis de la pared celular	11
2.4	RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS	15
2.5	PENICILINASA (B-LACTAMASA)	17
2.6	RESISTENCIA BACTERIANA TRANSFERIBLE	23

Página

3.	MATERIALES Y METODOS	34
3.1	PREPARACION DE SUERO ANTIPENICILINASA	34
3.2	TITULACION DEL SUERO ANTIPENILINASA	35
3.2.1	Inmunoelectroforesis	35
3.2.2	Inmunodifusión doble	36
3.2.3	Inmunodifusión radial	37
3.3	PRUEBAS BACTERIOLOGICAS	38
3.3.1	Selección de cepas de Staphilococcus aureus	39
3.3.2	Determinación del M.I.C.	39
3.3.3	Titulación de penicilinasa	39
3.3.4	Titulación de suero antipenicilinasa	42
3.3.5	Actividad del SAP frente a cepas de S. aureus productoras de penicilinasa	45
3.3.6	MIC de resistentes con SAP puro	47
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	51
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
	BIBLIOGRAFIA	61

INDICE DE TABLAS

		Página
1.	Comparación de las propiedades físico-químicas de las tres penicilinasas. Composición aminoácida.	20
2.	Ratas de hidrólisis de penicilinas por exopenicilinasa de B. cerus 596 H.	21
3.	Medición de anillos de precipitación en mm	54
4.	Valores MIC de cepas sensibles y resistentes	57

INDICE DE FIGURAS

		Página
1.	Fórmula estructural de la penicilina y modo de acción de las enzimas	6
2.	Estructura general de la porción mucopeptídica de la pared celular bacteriana	13
3.	Mecanismo de Transformación	28
4.	Mecanismo de Transducción	30
5.	Mecanismo de conjugación	33
6.	Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC)	41
7.	Titulación de penicilinasa comercial	43
8.	Titulación del suero antipenicilinasa (SAP)	46
9.	Actividad del SAP frente a cepas productores de penicilinasa	49
10.	MIC de resistentes con SAP puro	50
11.	Inmunodifusión radial Suero 1/4	55

Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
C I S A

INDICE DE FOTOGRAFIAS

		Página
1.	Inmunodifusión radial -Suero 1/32	52
2.	Inmunodifusión radial - Suero 1/64	53

1. INTRODUCCION

Con el descubrimiento de la penicilina, comenzó una era de profundos cambios en la terapia antibacteriana pero la lucha no ha terminado.

La aparición de cepas resistentes hizo que la penicilina fuera quedando un poco en desuso y se intensificara la investigación para modificar su estructura inicial. A pesar de las nuevas propiedades terapéuticas logradas, la resistencia bacteriana por los diferentes mecanismos genéticos conocidos, continua siendo una limitante en la terapia antimicrobiana.

Con el conocimiento de los mecanismos de transferencia genética, la resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema universal que se ratifica por los numerosos casos clínicos reportados.

La ciencia ha respondido a este reto produciendo nuevos antibióticos con propiedades aparentamente efectivas frente a este tipo de bacterias pero sin la seguridad de mantener su acción antimicrobiana en forma permanente.

Teniendo en cuenta las propiedades antigenéticas que tienen algunas de las sustancias inhibidoras de antibióticos producidas por las bacterias es factible lograr la neutralización de éstas por medio de reacciones antígeno anticuerpo.

Los objetivos de este trabajo fueron : evaluar las propiedades inmunógenas de la penicilinasa para la producción de un suero antipenicilinasa y determinar su comportamiento " in Vitro" frente a microorganismos sensibles y resistentes a la penicilina.

2. REVISION DE LITERATURA

Por la variedad de aspectos a consultar en esta investigación, la revisión de literatura se ha subdividido en varios tópicos.

2.1 HISTORIA DE LA PENICILINA

En el año de 1929 Alexander Fleming en el hospital St. Mary de Londres comunicó su observación de que las colonias de un cultivo de Staphilococcus aureus se inhibían en presencia de un hongo contaminante. Este hongo, el Penicilliun notatum, al crecer en medio de cultivo líquido tenía efecto bactericida "In Vitro" frente a varios tipos de microorganismos (3, 16, 19, 22, 23).

El Doctor Fleming bautizó el principio antibacterial con el nombre de penicilina. Sus esfuerzos para extraer la sustancia bacteriolítica fallaron, pero en 1940 después de muchas investigaciones y bajo el estímulo de la segunda guerra mundial, Howard Walter Florey, Ernest Boris Chain y colaboradores, lograron producir cantidades significativas de las primeras penicilinas a partir de P. notatum.

En 1941 ya se conseguía penicilina G para pruebas terapéuticas limitadas. Las cantidades disponibles eran tan pequeñas al comienzo, que el antibiótico se recuperaba de la orina de los pacientes (3, 19, 33).

En 1942 por las pocas facilidades de Inglaterra ocasionadas por la guerra, varios centros de Estados Unidos se dedicaron a producir penicilina en forma industrial y para 1943 ya se conseguían cantidades suficientes del antibiótico para servir a las fuerzas de los aliados, y para 1944 el antibiótico era disponible para personal civil (3, 19, 33).

Hasta 1958, el producto se obtuvo por fermentación del P. notatum y del P. chrysogenum. En este año Batchelor y otros grupos independientes de investigadores conocieron, aislaron, e identificaron el núcleo básico de la penicilina, que es el ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), por acción de amidasas bacterianas en la penicilina normal (3, 16, 19).

Al núcleo de 6-APA, fué posible añadir sintéticamente una multitud de cadenas laterales, produciendo una gama de penicilinas las cuales superaron las desventajas de la penicilina G. Se han elaborado casi 3.000 derivados pero solamente unos pocos son de importancia terapéutica. Figura 1 (16, 19).

2.2 ESTRUCTURA QUIMICA

La estructura básica de todas las penicilinas, es un anillo de tiazolidina que contiene azufre (a), unido a un anillo B-lactámico (b) del cual depende la actividad antimicrobiana, y una cadena lateral R" que determina la característica individual de cada penicilina, y R' lugar de la formación de la sal, obteniéndose así penicilina sódica, potásica, procaínica y benzatínica. Figura 1) (3, 16, 19).

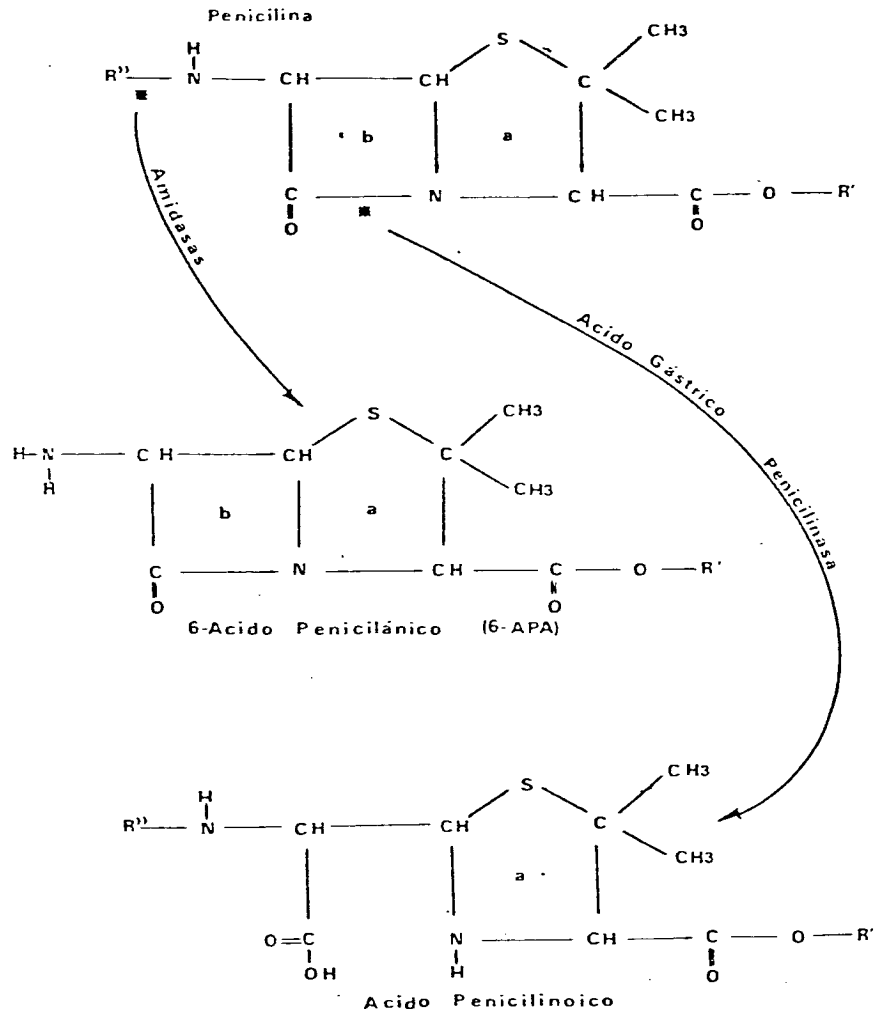
De casualidad se encontró que al añadir varios productos químicos al proceso de fermentación, se producían nuevas variedades de penicilina, que por acuerdo internacional se designaron con las letras del alfabeto B, F, G, K, X, O, etc. (3, 16, 19).

La penicilina G por su actividad y estabilidad se ha mantenido en producción mientras que otros tipos han sido suspendidos. (3, 16, 19).

Diferentes desventajas han sido encontradas en la penicilina G :(3-19)

- Es ácido lábil y por lo tanto se destruye después de administración oral.
- Es destruída por la penicilinasa (B-lactamasa).
- Tiene un espectro relativamente corto.
- Se excreta rápidamente del organismo.
- Se difunde insuficientemente en algunos compartimentos del or-

Figura 1. Fórmula estructural de la penicilina y modo de acción de las enzimas.



ganismo ejemplo : fluído cerebro-espinal, líquido sinovial.

- Puede originar respuesta alergénica.

Para disminuir las desventajas de la penicilina G y con el conocimiento de su estructura por síntesis química se lograron las penicilinas semisintéticas que en forma general se pueden agrupar en :

- Las ácido-resistentes pero susceptibles a penicilinasa : penicilina V y Feneticilina.

- Las ácido-resistentes y resistentes a penicilinasa : Nafcilina, Oxacilina, Dicloxacilina, Flucloxacilina.

- Las ácido-lábiles y resistentes a penicilinasa : Metilina

- Sensibles a penicilinasa y de amplio espectro : Ampicilina, Indanil carbecilina (3, 19).

Las sales de penicilina, generalmente las de sodio y potasio son estables durante muchos meses en forma de polvo, pero se desdoblan rápidamente en ácido penicilinoico y otros metabolitos después de su reconstitución, por esto las soluciones deben ser frescas para asegurar terapia adecuada y reducir al mínimo la aplicación de compuestos alergénicos en potencia (3, 19).

En cambio las suspensiones de penicilina G benzatínica y procaínica son estables durante muchos meses, siempre y cuando se mantengan en un rango de pH entre 5.5 y 7.5.

La conferencia internacional para la normalización de la penicilina celebrada en Londres (1944), definió los procedimientos para calcular la potencia y estableció un patrón internacional para la misma. La unidad de penicilina es por definición la actividad específica de la penicilina contenida en 0.6 ug. de su correspondiente standard internacional. Un miligramo de penicilina G sódica es igual a 1667 U.I. Las penicilinas semisintéticas derivadas del 6-APA se cuantifican en miligramos (3, 19).

2.3 MECANISMOS DE ACCION DE LOS PRODUCTOS ANTIMICROBIANOS.

Los productos antimicrobianos tienen diferentes mecanismos de acción sobre la bacteria.

2.3.1 Por antagonismo competitivo.

Por la especificidad de acción que tienen las enzimas sobre un solo sustrato para activarlo, metabolizarlo, o liberarlo, un compuesto químico similar pero no idéntico al sustrato, puede ser capaz de combinarse con el centro activo de la enzima permaneciendo unido

y bloqueando la acción del sustrato verdadero. A este grupo pertenecen las sulfonamidas (3, 19).

2.3.2 Por inhibición de las funciones de la membrana celular.

El citoplasma de todas las células vivas está circunscrito por la membrana citoplásmática, la cual sirve como una barrera de permeabilidad selectiva controlando la composición interna de la célula. Si se rompe la integridad funcional de la membrana citoplasmática, los nucleótidos póricos y pirimídicos, así como las proteínas escapan de la célula y sobreviene daño celular o muerte. Este efecto lo cumplen las polimixinas sobre bacterias Gram negativas y los poliénicos frente a los hongos (3, 19, 22).

2.3.3 Por inhibición de síntesis de proteínas.

Se ha establecido que el Cloranfenicol, Tetraciclinas, aminoglucósidos, Macrólidos y Lincomicina inhiben la síntesis de proteínas por parte de las bacterias en una de sus diferentes fases (3, 19, 22).

El cloranfenicol interfiere el acoplamiento del RNAm a los ribosomas bloqueando la formación de nuevos enlaces peptídicos, esto es atribuído a la inhibición de la peptidil transferasa (3, 19, 22).

Las tetraciclinas parece que bloquean la adherencia del complejo

RNAt-Aminoácido al ribosama sin interferir la síntesis de RNAm ni RNAr (3, 19, 22).

Los Macrólidos inhiben la síntesis protéica bacteriana, uniéndose al ribosoma bacteriano, tal vez compitiendo con los aminoácidos por los sitios de combinación (3, 19, 22).

Las Lincomicinas afectan la iniciación de las cadenas peptídicas. (3, 19, 22).

Los Aminoglucósidos causan degradación progresiva de los polisomas, por ligarse a los ribosomas, en especial a la parte que absorve los RNAt, cualquier molécula de RNAm ligada al antibiótico que alcance los ribosomas, es mal interpretado en el curso de la síntesis protéica (3, 19, 22).

2.3.4 Por inhibición de síntesis de ácido nucléico.

Las Actinomisinas forman complejos con el DNA combinándose con los residuos de Deoxiguanosina. Este complejo inhibe la RNA-polimerasa bloqueando la formación de RNAm. Las Actinomocinas también inhiben la autoduplicación de los virus con DNA (3, 19, 22).

La Mitomicina bloquea la síntesis de DNA debido a un enlace cruzado firma de las tiras complementarias del DNA.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA

Estas dos sustancias inhiben tanto células bacterianas como animales y no son suficientemente selectivas para ser empleados en quimioterapia. (3, 19, 22).

2.3.5 Por inhibición de la síntesis de la pared celular.

En contraste con las células animales, las bacterias poseen una cubierta exterior rígida, que mantiene la forma de la célula y la protege a los cambios osmóticos (8, 22).

La presión en las bacterias Gram positivas es 3 a 5 veces mayor que en las Gram negativas, por lo tanto la lesión de su pared celular conlleva a la lisis completa de la célula por el cambio osmótico (8, 22).

La pared de la mayoría de las bacterias es una estructura compleja que contiene una gran cantidad de macromoléculas; siendo en las bacterias Gram positivas, el mucopéptido la más importante y la responsable de la rigidez estructural de la célula (8, 22).

En las bacterias Gram negativas el mucopéptido está frecuentemente alternado entre capas de componentes lípidos y protéicos.

Aunque los detalles exactos de la estructura química del mucopéptido varía de una especie bacteriana a otra, la estructura básica se ajusta al modelo de la Figura 2 (8, 22).

Las diferencias específicas están asociadas principalmente a la posición de la Lisina y a la naturaleza del enlace de unión entre la Lisina y la D-alanina terminal, ya que la lisina puede ser reemplazada por otras sustancias tales como el ácido diaminopimélico, la omitina, y el ácido alfa, beta, diaminobutírico. El puente de unión cruzada (a) Figura 2 puede contener aminoácidos adicionales tales como glicina o serina (8, 22).

El mucopéptido es esencialmente una gran molécula construída sobre una red de cadenas moleculares. Uno de los tipos de cadenas (B) es un polímero mucopolisacárido de unidades alternantes de N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico (8, 22).

Los pasos fundamentales en la síntesis del mucopéptido son :

a. Uridina difosfato-ácido-N-acetilmurámico (UDPMurNac) + L-ALA ---------- UDPMurNAc. ALA

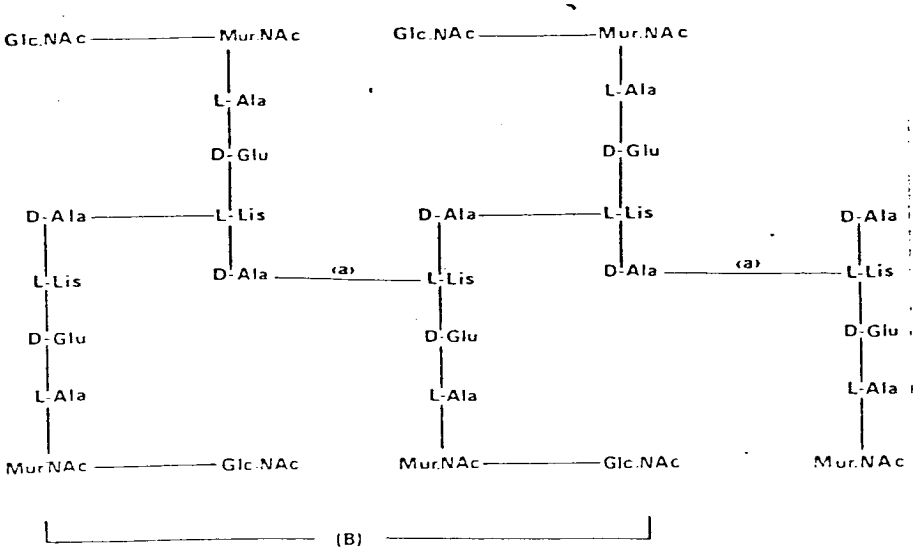
b. UDPMurNAc.Ala + D-Glu --------UDPMurNac.Ala.Glu-

c. UDPMurNAc.Ala.Glu + L-Lis ----- UDPMurNAc.Ala.Glu.Lis.

d. UDP.MurNAc.Ala.Glu.Lis. + D-Ala.D-Ala-UDPMurNAc.Ala. Glu.Lis.Ala.Ala.

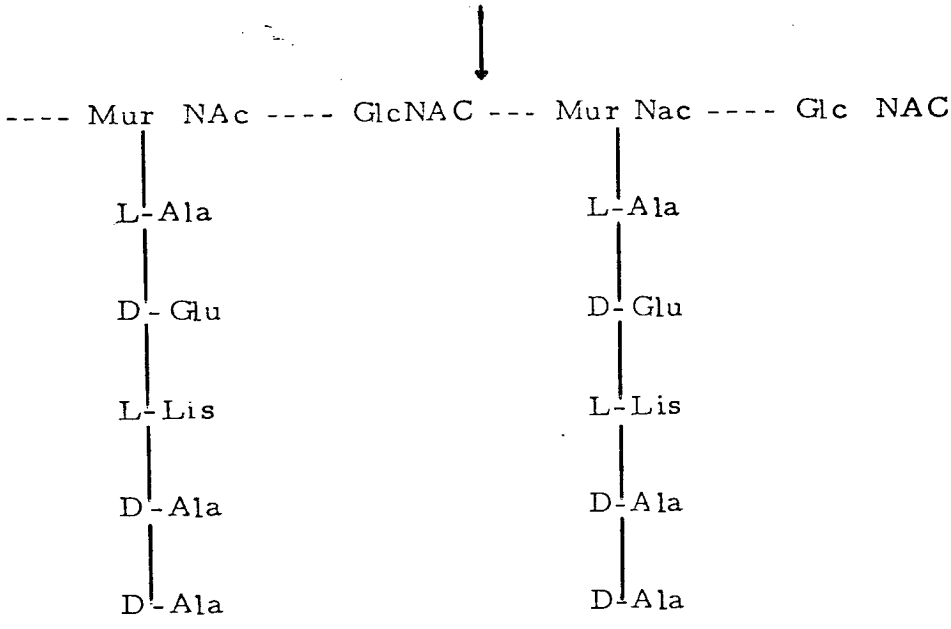
Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
C E I S A

Figura 2. Estructura general de la porción mucopeptídica de la pared celular bacteriana.



e. Uridina difosfato-N-Acetil glucosamina (UDP Glc NAc)

UDP Mur NAc. Ala. Glu. Lis. Ala. Ala



f. 6-(a) GlcNAc. MurNAc. L-Ala. D-Glu-L-Lis. D-Ala_D-Ala.

\+

GlcNAc. MurNAC. L-Ala-D-Glu. L-Lis. D-Ala-D-Ala.

g. 6-(b) GLCNAc. MurNAc. L-Ala-D-Glu-L-Lis. D-Ala

+D-ALA

GlcNAc. MurNAc. L-Ala. D-Glu. L-Lis-D-Ala-D-Ala

GlcNAc. MurNAc. L-Ala. D-Glu. L-Lis. D-Ala

+ D-Ala

GlcNAc. MurNAc. L-Ala. D-Glu. L-Lis-D-Ala

Las dos D-alaninas terminales están insertadas en forma de D-Ala. D-Ala. Esta síntesis se produce a partir de la D-Alanina mediante una enzima separada, la D-Alanil-alanina sintetasa.

El siguiente paso e) es la condensación de la uridina difosfato-N-acetil muramilpentapéptido formado por la reacción d) con la uridina difosfato-N-acetil glucosamina (8, 22).

Luego tiene lugar una reacción cruzada de acoplamiento f) en la que dos series de polímeros del tipo sintetizado en la reacción e) se acoplan para formar la estructura final del mucopéptido. En el proceso se rompe el enlace terminal D-Ala. D-Ala de la cadena pentapéptida del ácido murámico y se libera D-Alanina (8, 22).

La enzima de la reacción f) se llama glucopéptido transpeptidasa y la de la g), es la D-Alanina carboxipeptidasa (8, 22).

Las penicilinas y cefalosporinas inhiben tanto la reacción f) como la 6b, en las series antes mencionadas y gracias a ello bloquea el acoplamiento cruzado en la síntesis mucopéptida (reacción de traspeptidación), es decir inhibe la actividad de la traspeptidasa debido tal vez a una semejanza del antibiótico con la Acil D-Alanil-D-alanina (8, 22).

2.4 RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS.

La verdadera resistencia es aquella que lleva al antibiótico a no poder obrar sobre su sitio de acción específico en la bacteria. En la resistencia natural, las bacterias de una misma especie no dejan pe-

netrar el antibiótico a través de la pared, ó la membrana, o no po - seen la estructura molecular atacable por el producto, ó tienen la capacidad enzimática para destruirlo (3, 19, 32).

En contraposición la resistencia adquirida aparece por mutación en cepas habitualmente sensibles, debido a modificaciones en la información del ADN cromosómico. Esta resistencia de acuerdo a su origen puede ser cromosómica y extracromosómica dependiendo si la información proviene del ADN cromosómico, o de un ADN diferente denominado Plasmida (6, 21, 32).

Existen varios mecanismos por los cuales las bacterias son resistentes a la penicilina :

- Algunas bacterias poseen polisacáridos en la membrana, que evitan el contacto de la penicilina con la traspeptidasa apropiada sin que se produzca efecto o destrucción del antibiótico.

- Por procesos enzimáticos la resistencia a la penicilina se debe a : Producción de penicilina (B-lactamasa) por parte de aquellos microorganismos que por tener el rasgo genético, o por la producción de amidasas, que separan la cadena R del grupo amígeno del 6 -APA destruye en gran parte la actividad biológica del producto (3, 19, 22).

- Un caso especial se presenta en bacterias que cultivadas " In. Vitro " se hacen refractarias a la penicilina donde no se ha demostrado la producción de penicilinasa ni tampoco explicado el mecanismo de resistencia (19).

2.5 PENICILINASA (B-LACTAMASA)

La base principal de la resistencia " In Vivo " a las penicilinas ya sea adquirida o natural, es la producción de penicilinasa, enzima descrita por primera vez en 1940 por Abraham y Chain. (16).

La penicilinasa hidroliza la penicilina formando ácido penicilinóico, al romper el anillo B-lactámico (b) Figura 1, que no tiene actividad antibacteriana, pero sí poder antigénico (3, 4, 16, 19).

La penicilinasa no parece ser producida primariamente en respuesta específica a la exposición de compuestos que poseen el anillo betalactámico, ya que la enzima puede detectarse en cepas de Bacillus licheniformis, Klebsiella pneumoniae, y Staphilococcus spp, que no fueron expuestos a antibióticos B-lactámicos, hecho indicativo de un tipo de resistencia natural (2, 18, 32).

En este caso las B-lactamasas están localizadas probablemente en la membrana periplásmica y en menos proporción en la pared, teniendo como actividad normal la de intervenir en un paso intermedio en el

metabolismo de la pared celular (18).

La penicilinasa es una enzima elaborada por diversos microorganismos y sus mayores concentraciones se han demostrado en S. aureus, E. coli, Neisseria gonorhoeae (1, 2, 4, 10, 11, 12, 18, 23, 25, 30, 31).

El organismo libera cerca de la mitad de la penicilinasa (exopenicilinasa), que es altamente soluble. La otra fracción no soluble está ligada a la membrana (Penicilinasa de la membrana), que se libera durante la conversión de la célula a protoplasto (3, 8).

Al liberar esta última dela célula por acción de la tripsina se obtiene una enzima similar a la exoenzima, (Penicilinasa- T).

La penicilinasa de la membrana posee una cadena fosfolipopéptida de 25 aminoácidos en el NH2 terminal. Esta parece ser la responsable de las propiedades hidrofóbicas y de la fijación de la enzima a la membrana plasmática (38).

La exopenicilinasa a diferencia de la anterior carece de la cadena fosfolipopéptida en su composición (36, 37, 38).

La penicilinasa-T muy sejemante a la exopenicilinasa, se diferencia de ésta, por la ausencia del aminoácido lisina en el NH2 terminal (37).

Las propiedades físico-químicas y las diferencias en cuanto a composición de los tres tipos de penicilinasa son descritas en la Tabla 1.

La rata de reacción catalítica de las penicilinasas está fuertemente influenciada por la estructura del sustituyente N-Acil de la cadena lateral de la penicilina Tabla 2 (4).

Bajo este criterio las penicilinas se clasifican en dos tipos : Tipo S de conformación compacta, la cual es favorable a la reacción catalítica, y tipo A de conformidad abierta que no es favorable a esta acción Tabla 2 (4).

Las penicilinasas se pueden clasificar de acuerdo a la rata de inhibición frente a la cloxacilina ó al P-cloromercuribenzoato, (P-CMB). Por este sistema las penicilinas se han clasificado en 5 tipos incluyendo 14 subtipos :

- Penicilinasa Tipo 1

Predominantemente activas contra cefalosporinas, parece ser producida por mediación de cromosomas (10, 12, 13, 15).

- Penicilinasa Tipo II

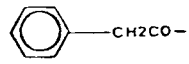
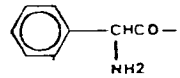
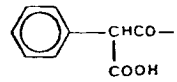
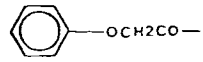
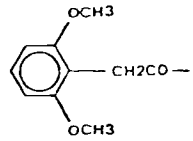
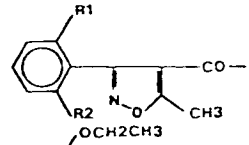
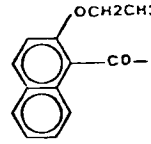
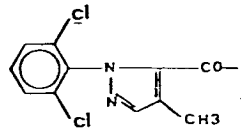
Predominantemente activa contra penicilina (12, 15).

Tabla 1.- Comparación de las propiedades físico-químicas de las tres penicilinasas. Composición aminoácida.

	PENICILINASA		
	Membrana	T	Exopenicilinasa
Peso molecular con:			
-Filtración en gel con: Taurodeoxicolato	48.000	29.000	29.000
-Filtración en gel con: Tritón X - 100	100.000	29.000	29.000
-Electroforesis con: Dodecil sulfato	33.000	29.000	29.000
Km para Bencil penicilina	0.1 mM	0.12 mM	0.12mM
pH de máximo estabilidad 50°C, 30 minutos	4.0	4.0	4.0
pH óptimo	6.5	6.5	6.5
Temperatura óptima	45°C	50°C	50°C
Energía de activación	7.3 Kcal.	7.5 Kcal	7.3 Kcal.
Pérdida de actividad durante 10 minutos en ausencia de tritón X-100	92%	3%	4%
Pérdida de actividad por tratamiento con iodo a 0°C, 20 minutos	80%	44%	42%
Solubilidad en agua	NO	SI	SI

	COOH terminal	NH2 terminal
Penicilinasa de la membrana	-Met-Asn-Gly-Lys	Cadena fosfolipopeptido
Exopenicilinasa	-Met-Asn-Gly-Lys	-Lys-Thr-Glu-Met.
Penicilinasa-T	-Met-Ans-Gly-Lys	-Thr-Glu Met-Lys.

Tabla 2. Ratas de hidrólisis de penicilinas por exopenicilinasa de B. cereus 569H

Sustrato	Radical N-Acil	Tipo derivativo	Curso de reacción
Acido 6-Aminopenicilánico	NO	-	Lineal
Bencil penicilina		S	Lineal
Ampicilina		S	Lineal
Carbenicilina		S	Lineal
Fenoximetil penicilina		S	Lineal
Meticilina		A	Bifásico
Oxacilina (R1, R2=H) Cloxacilina (R1=H, R2=Cl) Dicloxacilina (R1, R2=Cl) Flucloxacilina (R1=Cl, R2=F)		A	Bifásico
Nafcilina		A	Bifásica
Pirazocilina		A	Bifásico

Penicilinas tipo S: Conformación compacta, Tipo A: Conformación abierta.

- Penicilinasa Tipo III

Con aproximadamente igual actividad frente a las penicilinas y cefalosporinas, sensible a inhibición por cloxacilina y resistente a p-CMB. Su producción es mediada por factores R. (10, 12, 25, 26).

- Penicilinasa Tipo IV

Con perfil de sustrato similar al tipo III, pero resistentes a cloxacilina y sensibles a p-CMB (12).

- Penicilinasa Tipo V

Con actividad sobre cloxacilina y resistente a p-CMB (12).

Estudios del punto isoeléctrico de las penicilinasas de 242 cepas provenientes de 5 géneros de bacterias Gram positivas, y de 16 Gram negativas han comprobado que la beta-lactamasa cromosomal parece ser específica para género, especie, y subespecie (18).

La separación de las enzimas por análisis del punto isoeléctrico puede ser usada para taxonomia bacterial, ya que las beta-lactamasas son producidas universalmente por las bacterias (18).

Las penicilinasas mediadas cromosómicamente y las mediadas por

factores R son dos entidades separadas, ya que dos grupos de bandas han sido observadas en patrones de punto isoeléctrico de cepas conocidas como productoras de factores R (18).

Estudios recientes han demostrado que estas enzimas presentan variaciones con respecto a propiedades tales como : Actividad específica, inducibilidad a inhibidores, peso molecular, perfil de sustrato y sobre todo composición aminoácida (12, 18).

Las penicilinasas son antigénicas y su especificidad inmunológica está asociada con el tipo de bacteria que la produce (12, 18).

2.6 RESISTENCIA BACTERIANA TRANSFERIBLE.

Durante muchos años se explicó la resistencia bacteriana a los antibióticos en base a las leyes genéticas tradicionales. Con el descubrimiento de fragmentos de DNA libres e independientes de los cromosomas denominados plasmidas por J. Lederberg en 1952 se explican muchos de los efectos observados (21, 32).

Con el descubrimiento de estos fragmentos, de los caracteres que codifican a los antígenos, hemolisinas, enteroxinas y enzimas destructoras de las moléculas antibióticas se logrará llegar a un mejor y más controlado uso de los antibióticos en la terapia (5, 17, 20, 29, 32).

En 1946 el mismo investigador en estudios del bacteriófago temperado, había demostrado el intercambio de material genético por el mecanismo de transducción (21, 32).

En 1959 A. Akiba y K. Ochiai en el Japón durante el transcurso de una epidemia de disentería donde se comprobó transferencia de resistencia múltiple de una bacteria a otra de diferente especie, descubrieron que la resistencia a los antibióticos es de tipo transferible (Factor R) (2, 5, 7, 17, 29, 32).

En el fenómeno de conjugación el factor F y en el de transducción el factor lambda, son dos elementos genéticos que tienen un huésped común (E. coli), mientras lambda es un virus capaz de producir patogenia a la célula huésped (Bacteriófago), el factor F por todos sus caracteres es benigno. Estos dos elementos a pesar de ser partículas diferentes, tienen similitud de comportamiento, por ésto se les clasificó en una nueva clase de elementos genéticos denominados episomas, los cuales contienen diferentes determinantes de resistencia (8, 21, 32).

Los episomas tienen capacidad de combinarse con el genoma normal de la célula : El factor F en la proximidad del carácter lactosa y el factor lambda al lado del gen galactosa (8, 21, 32).

Los episomas pueden replicarse ya sea independientemente en el ci-

toplasma, o como parte integrante del cromosoma bacteriano. Esto excluye a ciertos genes que no tienen replicación autónoma cuando están ligados al cromosoma y a aquellos fagos que son exclusivamente citoplasmáticos (8, 21, 32).

En 1958 Jacob y Wollman consideraron que la cantidad de mutaciones observadas, debería existir toda una serie de elementos ADN del tipo episoma, pero independientes y exclusivamente citoplasmáticos (8, 21, 32).

Hipótesis confirmada en 1959 por A. Akiba y K. Ochiai con el descubrimiento del factor R (21, 32).

El factor R, como el factor F, es transferible de célula a célula por contacto, pero difiere en que el factor R es un elemento genético independiente del cromosoma.

El término episoma resultó restrictivo, por lo tanto en 1963 se sugirió que era más apropiado el término plasmida propuesto por Lederberg (11, 21, 32).

Los elementos genéticos extracromosómicos móviles de las bacterias vinieron a llamarse plasmidas en vez de episomas (11, 21, 32).

Para precisar aún más este nuevo concepto, Jacob, Brenner y Cuzin

Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
C E I S A

en el año 1963 propusieron la denominación de replicón, para aquellos elementos genéticos que se pueden replicar, como el plasmida y el cromosoma bacteriano. (32)

Los plasmidas con un tamaño 20 veces menor que el cromosoma bacteriano, contienen la información necesaria y los sistemas capaces de promover o detener la replicación (32).

Los primeros plasmidas descubiertos (Factor R) determinaban resistencia a uno o dos antibióticos; hoy en día no es raro encontrar plasmidas que confieren resistencia a 10 antibióticos diferentes (2, 5, 7, 17, 29, 32).

El análisis de este fenómeno durante los últimos años reveló otra propiedad sorprendente de los plasmidas y los sistemas genéticos relacionados, como es el fenómeno de la transposición de genes (6, 21).

Estos nuevos elementos genéticos, con capacidad para transferir físicamente de un lugar a otro del material genético de una célula, sin necesidad de secuencias complementarias de ADN y sin utilizar las enzimas implicadas en los mecanismos usuales de recombinación, se denominaron transposones, que son los responsables de la acumulación de genes de resistencia en los plasmidas y de grandes reorganizaciones de material genético en las bacterias (6, 21).

La resistencia a los antibióticos puede ser transmitida por los me-

canismos de transformación, transducción y conjugación.

En la transformación, el ADN de una cepa lisada añadido a un cultivo de bacterias de la misma especie, conlleva a la asimilación de genes extraídos que son reemplazados por genes homólogos. Figura 3.

El mecanismo de transformación es observado en diferentes especies y puede sobrevenir tanto en forma espontánea como experimental (6, 21, 32).

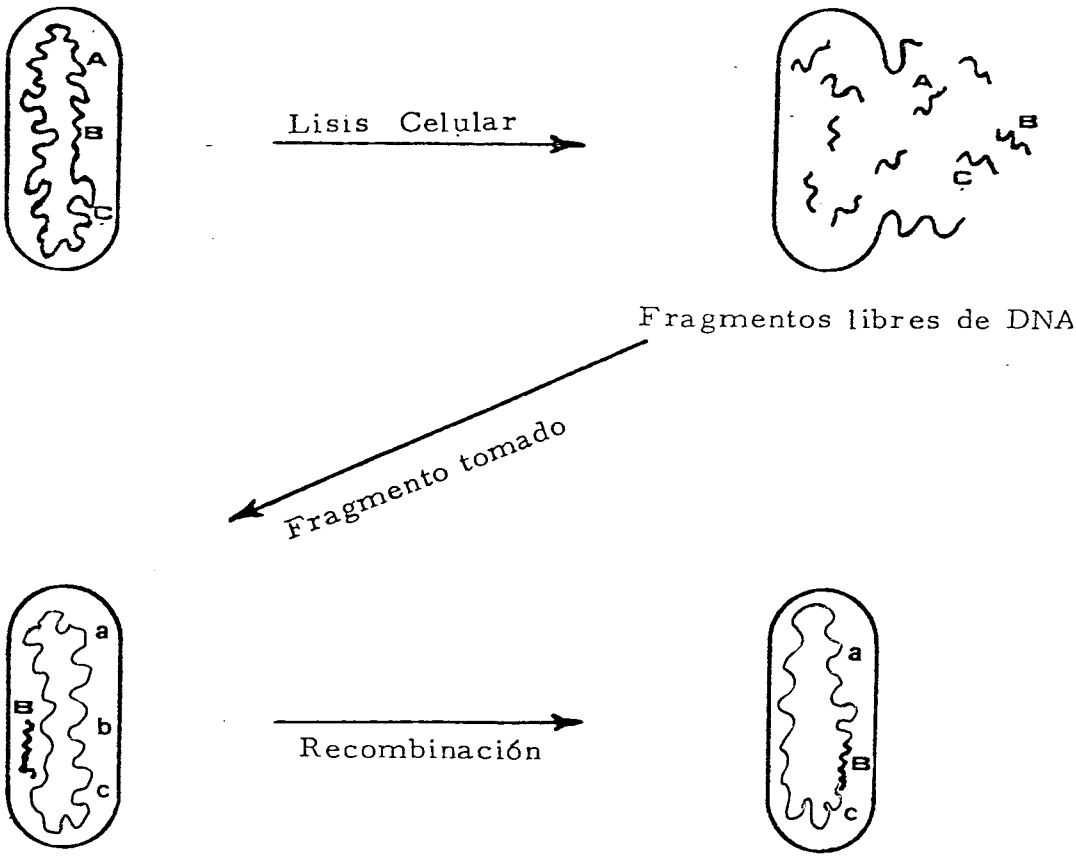
Debido a que la bacteria receptora no puede asimilar sino muy pequeños fragmentos de ADN, por el mecanismo de transformación no puede transferirse sino uno o dos caracteres de resistencia a los antibióticos. (6, 21, 32).

Durante el proceso de acción de un bacteriófago en una bacteria la partícula viral puede permanecer en reposo en el interior de la célula coexistiendo pacíficamente (Bacteriófagos atemparados) (6, 21, 32).

En la transducción los bacteriófagos atemperados introducen elementos genéticos de una bacteria infectada anteriormente y en el transcurso de mitosis sucesivas, estos genes pueden recombinarse con los genes homólogos de la bacteria huésped (6, 8, 21, 32).

Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
CEISA

Figura 3.



El fenómeno de transducción es específico de la especie. A pesar de ser posible en una gran variedad de bacterias, se produce con muy poca frecuencia Figura 4. (6, 8, 21, 32).

En razón de la poca cantidad de ADN cromosómico que puede contener el fago, son pocos también los elementos codificadores de resistencia que se pueden transferir por el fenómeno de transducción, aunque a veces el bacteriófago puede transferir un plasmida y con él todos los caracteres de resistencia (32).

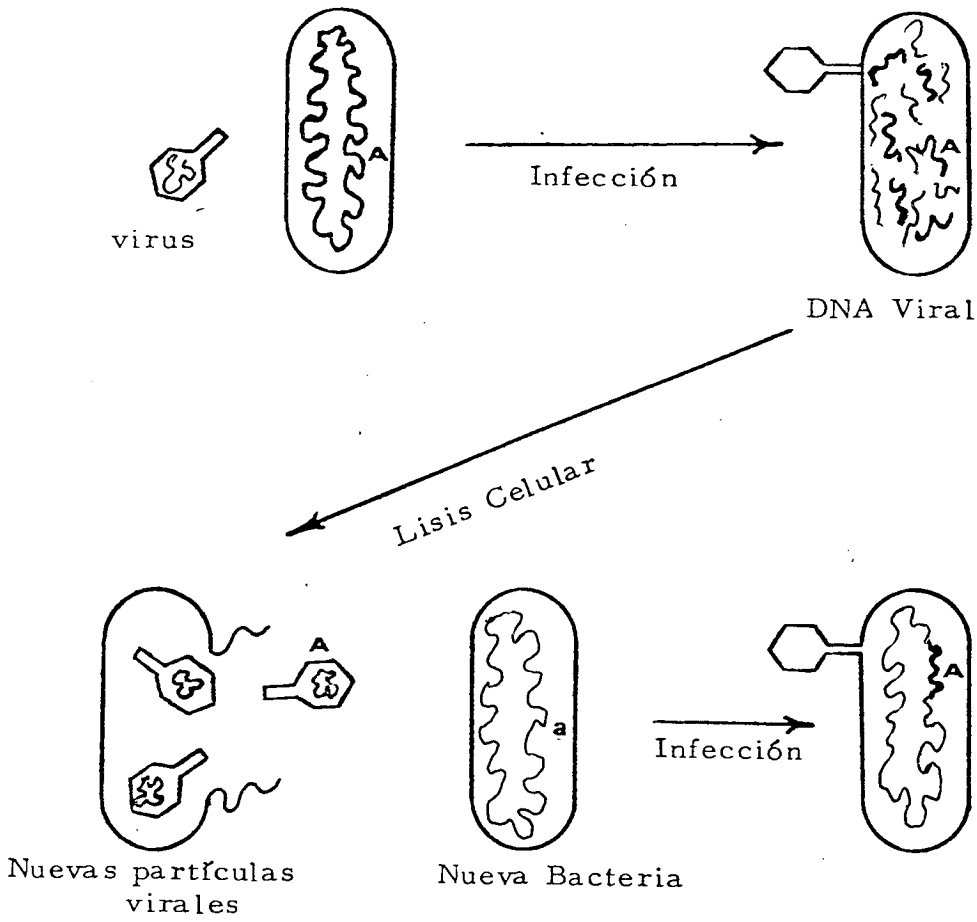
Para explicar el fenómeno de conjugación es necesario analizar las propiedades del factor F y del factor T o de transferencia conocido como factor R (6, 8, 21, 24, 32). Figura 5.

El factor F (Fertilidad), proporciona las condiciones necesarias para establecer un contacto intercelular por medio de un puente de conjugación en el cual puede o no haber intercambio genético.

Este mecanismo se efectúa de una bacteria donador (F) macho, a una receptora (F-), hembra (6, 8, 21, 24, 32).

El factor F se encuentra en dos formas diferentes en la bacteria libre en el citoplasma, comportándose como un plasmida, o ligado al cromosoma bacteriano (6, 8, 21, 24, 32).

Figura 4. Esquema que explica la transducción



Cuando está libre en el citoplasma, puede ser eliminado de las bacterias por las sales de acridina; no así cuando está ligado al cromosoma, como en las bacterias " Hfr" (6, 8, 21, 24, 32).

Si el factor F está libre en el citoplasma, es transferido solo por conjugación a la bacteria receptora (F-), dando como resultado una bacteria con la característica de la donadora.

Cuando el factor F está ligado al cromosoma bacteriano, es capaz de movilizar al cromosoma a nivel de su inserción y penetrar en la bacteria hembra. Muy pocas veces se produce transferencia completa y por lo general F no alcanza a penetrar en el receptor y en consecuencia el producto final es un F- (6, 8, 21, 24, 32).

Esta conjugación se realiza con gran frecuencia, por lo tanto las bacterias macho que poseen el factor F integrado en el cromosoma, son denominadas "Hfr" por su gran frecuencia de recombinación genética (6, 8, 21, 24, 32).

Dentro de la categoría de las bacterias " Hfr", si el cromosoma lleva los caracteres de resistencia a los antibióticos, éstos pueden ser involucrados en el cromosoma de la bacteria hembra (6, 8, 21, 24, 32).

En esta conjugación hay transferencia de grandes fragmentos de DNA y en algunos casos del cromosoma completo, que hacen aparecer re-

sistencias cromosómicas múltiples en bacterias sensibles después de una sola conjugación (6, 8, 21, 24, 32).

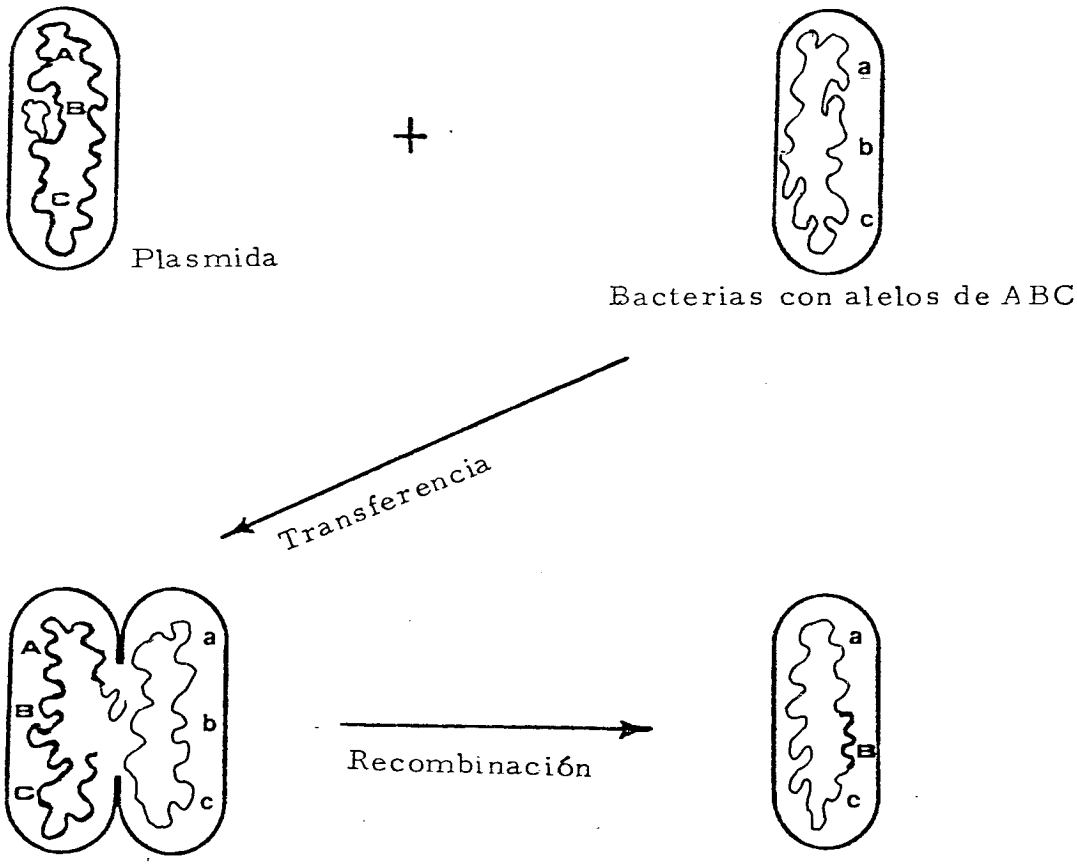
El factor R por su carácter extracromosómico es eliminado por las sales de acridina y cuando se produce conjugación las bacterias receptoras experimentan inmediatamente el fenómeno de resistencia (32).

Esto explica el hecho de que algunas bacterias con factor R, puedan rápidamente contaminar toda una población de bacterias sensibles, en las cuales la resistencia se manifiesta rápidamente.

Por su mecanismo de reproducción autónoma, los plasmidas (factor R) transmiten directamente de la bacteria madre a la bacteria hija en función al proceso normal de la división celular.

El factor R no tiene especificidad de especie, permitiendo fenómenos de conjugación entre especies diferentes de bacterias tales como : E. Coli, Klebsiella sp., Shigella sp. , Salmonella sp., Proteus sp., Pasteurella sp., Pseudomonas sp. (6, 8, 21, 24, 32).

Figura 5. En el siguiente esquema se explica el mecanismo de conjugación.



3. MATERIALES Y METODOS

3.1 PREPARACION DEL SUERO ANTIPENICILINASA

Para la preparación del suero antipenicilinasa, se utilizó como antígeno una penicilinasa comercial, con una concentración de diez millones de unidades cinéticas por milímetro, que contenía 3.150 mcg/ml. de proteína, determinada por la técnica de Folín Ciocalteau (27).

Con este antígeno se prepararon tres tipos de inóculo :

- Inóculo No. 1.

Una parte de penicilinasa 500 mcg/ml. y una parte de adyuvante completo de Freund.

- Inóculo No. 2

Una parte de penicilinas 500 mcg/ml. y una parte de adyuvante incompleto de Freund.

- Inóculo No. 3

Una parte de penicilinasa 250 mgc/ml y una parte de solución salina.

Seis conejos (3 machos y 3 hembras) de dos meses de edad se sometieron al siguiente plan de inoculación (27).

Día 1o. Inoculación I.M. de 1 ml. de inóculo No. 1, en cuatro sitios diferentes a la dosis de 0.25 ml en cada uno.

Día 30. Inoculación I.M. del inóculo No. 2, en cuatro sitios diferentes a la dosis de 0.25 ml. en cada uno.

Días 60, 68 y 75. Inoculación I.V. de 1 ml. del inóculo No. 3.

Ocho días después de la última inoculación se sangraron los conejos por punción cardiaca, obteniendo aproximadamente 20 ml. por cada conejo. El suero se separó con centrifugación y se mantuvo en congelación a -20°C., para posterior análisis.

3.2 TITULACION DEL SUERO ANTIPENICILINASA.

El antisuero se procesó para determinar especificidad y concentración por las técnicas de inmunoelectroforesis, inmunodifusión doble e inmunodifusión radial (27, 35).

3.2.1 Inmunoelectroforesis.

Prueba cualitativa para determinar especificidad del antisuero obtenido. Debido a resultados negativos por no estar la enzima dentro del espectro del sistema tampón, se descartó la técnica.

3.2.2 Inmunodifusión doble.

Para esta determinación se utilizó la técnica de Ouchterlony con los siguientes elementos :

Agarosa en buffer veronal pH 8.6

Laminas portaobjeto.

Moldes circulares para perforación con 6 celdas periféricas de 3 mm y una central de 3 mm y separadas entre sí 3 mm.

Cajas de petri

Suero antipenicilinasa en diluciones en base 2 hasta 1/64.
Como antígeno, penicilinasa a partir de la concentración comercial de 3.150 mcg/ml.

La prueba se deja correr de acuerdo a la técnica utilizada en el laboratorio de Inmunología del LIMV.

3.2.3 Inmunodifusión radial.

Para inmunodifusión radial se utilizaron los siguientes elementos :

Caja plástica desechable con 6 celdas de 3.5 cm. de diámetro Molde circular para perforar con cuatro celdas de 3 mm de diámetro.

Agarosa al 1.8% en buffer veronal pH 8.6, adicionada de azida sódica a una concentración final de 1/10.000 .

Suero antipenicilinasa pura.

Utilizando tubos con 3 ml. de agarosa al 1.8% mantenidos a 50°C en baño maría se preparan soluciones del suero de acuerdo al esquema siguiente :

			Concentración Final
Tubo # 1	3 ml de suero puro	3 ml de agarosa	1/2
Tubo # 2	3 ml de suero 1/2	3 ml de agarosa	1/4
Tubo # 3	3 ml de suero 1/4	3 ml de agarosa	1/8
Tubo # 4	3 ml de suero 1/8	3 ml de agarosa	1/16
Tubo # 5	3 ml de suero 1/16	3 ml de agarosa	1/32
Tubo # 6	3 ml de suero 1/32	3 ml de agarosa	1/64

Las diferentes mezclas se colocaron en las celdas de la caja permitiendo su solidificación por 24 horas a temperatura ambiente.

Como antígeno se utilizó diluciones de penicilinasa desde puro hasta 1/8. Este se deposita en las celdas de 3 mm, se incuba a temperatura ambiente y se lee a las 48 y 72 horas.

3.3 PRUEBAS BACTERIOLOGICAS.

Para evaluar el comportamiento "In Vitro" del antisuero obtenido, frente a microorganismos sensibles y resistentes a la penicilina se realizaron los siguientes procesos :

3.3.1 Selección de cepas de Staphilococcus aureus

Se seleccionaron 16 cepas de S. aureus de diferentes casos clínicos de humanos y de animales, clasificados en base a las pruebas de catalasa, oxidación de glucosa, fermentación de manitol, hemólisis y coagulasa. Para conocer la sensibilidad o la resistencia a la penicilina las diferentes cepas se sometieron a antibiograma por el método de difusión en agar, utilizando sensidiscos de 10 U.I. de penicilina de acuerdo con la técnica aceptada por la OMS (9).

Después de una incubación de las cajas durante 18 horas, se hizo la lectura midiendo los halos de inhibición y el resultado se interpreta de acuerdo a la tabla de sensibilidades (9).

Las cepas resistentes a la penicilina por la prueba anterior se sometieron a la prueba rápida en placa para determinar la capacidad de

producción o no de penicilinasa (28, 30, 34).

3.3.2 Determinación de la mínima concentración inhibitoria (M.I.C.)

De las 16 cepas iniciales se seleccionaron 2 cepas sensibles, #29 y 42, y 7 resistentes productoras de penicilinasa,
las # 1, 2, 3, 4, 5, 72 y 80.

Estas 9 cepas se sometieron a la prueba de sensibilidad a la penicilina por la técnica de (M.I.C.), utilizando los siguientes rangos de concentración para cada tipo de cepa : Cepas sensibles 0.0062 a 0.2 mcg/ml y las resistentes entre 3.2 a 102.4 mcg/ml.

Para la cepa No. 80 por su alta resistencia fue necesario calcular el MIC utilizando un rango entre 100.0 a 600.0 mcg/ml de penicilina. El resultado es leído en la más baja concentración de penicilina con completa inhibición de crecimiento.

La figura 6. resume la técnica empleada.

3.3.3 Titulación de penicilinasa.

Para la titulación de penicilinasa comercial se utilizaron las cepas sensibles # 29 y 42.

Teniendo en cuenta los valores MIC para las cepas seleccionadas : 0.0125 mcg/ml para la # 29 y 0.025 mcg/ml para la # 42, se tomó como factor constante una concentración de 0.2 mc mcg/ml de penicilina que por ser superior 16 y 8 veces respectivamente a los MIC de cada una garantizaba efecto sobre estas cepas.

En base a ésto se preparó una solución de penicilina con una concentración de 0.4 mcg/ml.

Se prepararon 6 diluciones de penicilinasa en caldo Mueller Hinton con las siguientes concentraciones en U.I/ml : 40, 36, 32, 28, 24, 20.

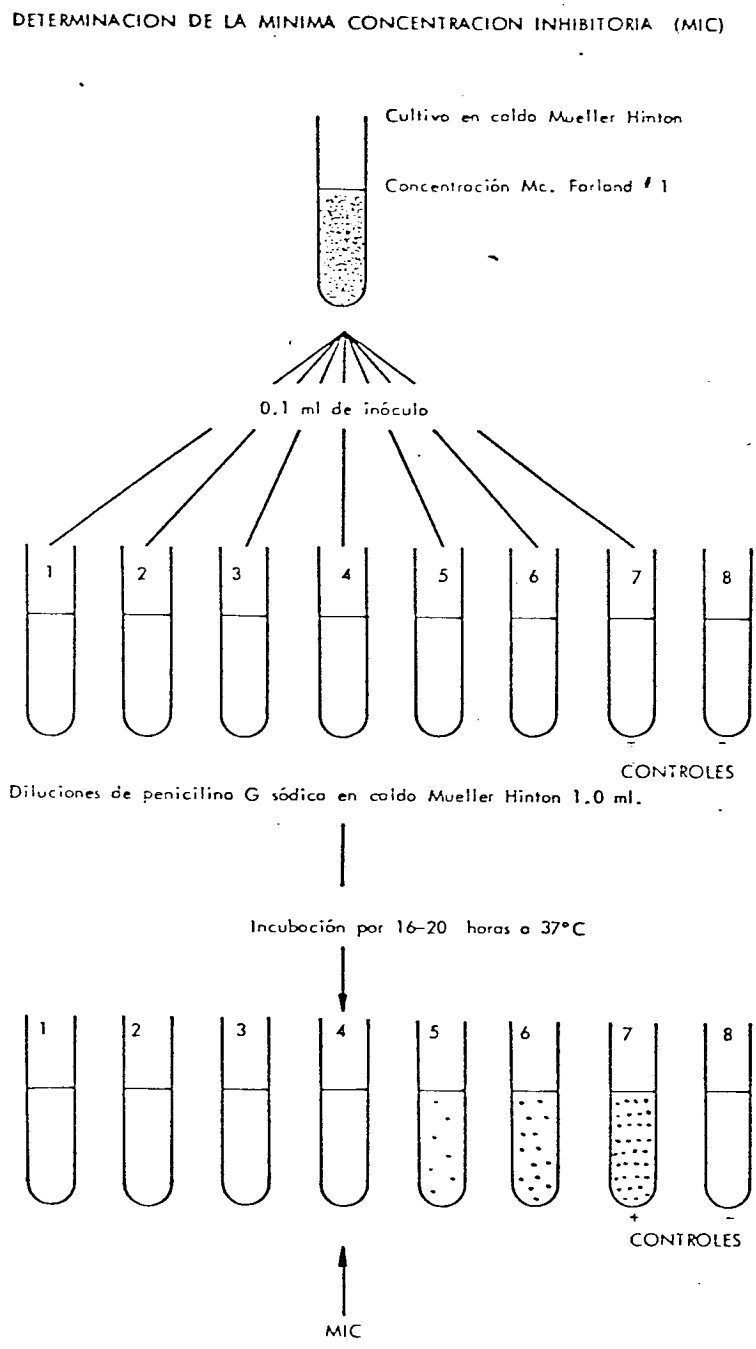
A partir del cultivo cada una de las cepas en caldo M. H. y con una incubación de 18 horas a 37°C, se preparó una suspensión de bacterias equivalentes al Mc. Farland # 1.

En el primer tubo la serie de 6 se coloca 0.5 ml de penicilinasa con 40 U.I./ml, en el segundo 0.5 ml. con 36 U.I./ml., y así sucesivamente. A todos los tubos se adiciona en forma constante 0.5 ml de penicilina con 0.4 mcg/ml y 0.1 ml del cultivo estandarizado.

El tubo # 7 es control positivo de crecimiento y contiene 1 ml de caldo M.H. y 0.1 ml de cultivo.

El tubo No. 8 es control negativo de crecimiento y contiene 1 ml de

Figura 6. Determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC)



solución de penicilina con 0.4 mcg/ml y 0.1 ml del cultivo.

Todos los tubos se incubaron por 16-20 horas a 37°C, y la lectura se hizo sobre el último tubo que tenía un crecimiento similar al control positivo, para conocer la menor concentración de penicilinasa que inactiva 0.2 mcg/ml de penicilina.

La figura 7 resume la técnica empleada.

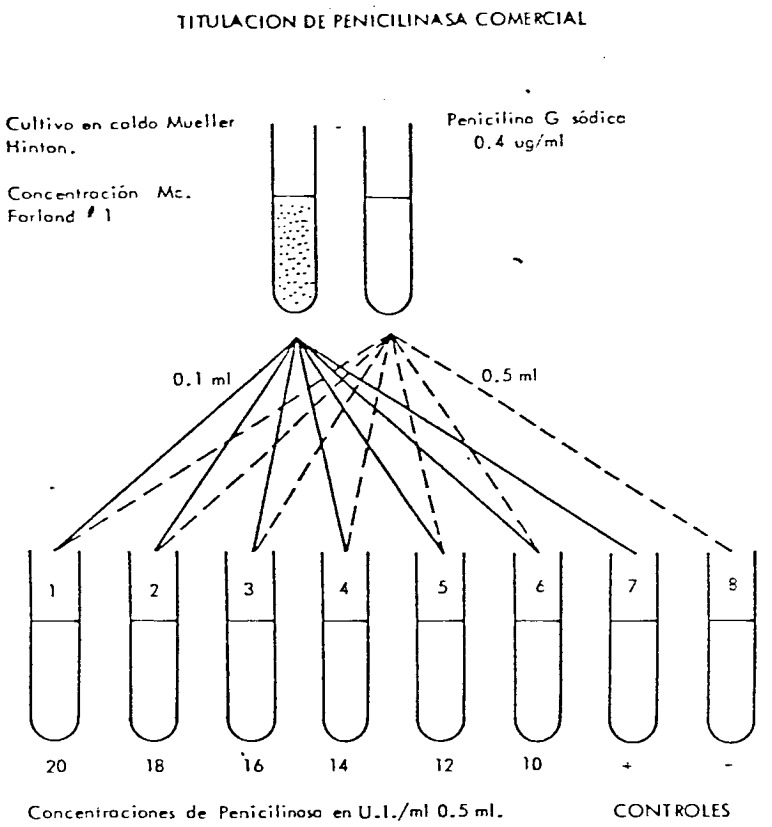
3.3.4 Titulación de suero antipenicilinasa.

En esta titulación se tomaron como constantes las concentraciones de penicilina, 0.2 mcg/ml y penicilinasa 16 U.I./ml, que fueron los resultados en las respectivas titulaciones, y como variable suero antipenicilinasa (SAP) en diluciones en base 2 hasta 1/512.

Para observar posibles diferencias en el mecanismo de reactividad, la técnica se montó bajo las siguientes condiciones :

1. Suero antipenicilinasa no inactivado agregado simultáneamente con la penicilinasa y la penicilina.
2. Suero antipelicinilasa no inactivado agregado conjuntamente con la penicilinasa y sometido a incubación de 30 minutos a 37°C, y posterior adición de penicilina.
3. Suero antipenicilinasa inactivado a 56°C por 30 minutos adicionado simultáneamente con la penicilinasa y la penicilina.

Figura 7. Titulación de Penicilinasa Comercial.



4. Suero antipenicilinasa inactivado a 56°C por 30 minutos, adicionado a la penicilinasa, incubación por 30 minutos a 37° C y posterior adición de penicilina.

Se hicieron 10 diluciones de suero antipenicilinasa a partir del puro hasta 1/512.

La penicilinasa se diluyó en caldo M.H. hasta obtener 64 U.I./ml.
La penicilina se diluyó en caldo M.H. hasta obtener 0.4 mcg/ml.
A partir del cultivo de cada una de las cepas en caldo M.H. se preparó una suspensión de bacterias equivalente al Mc. Farland #1. En el primer tubo de la serie de 10 se coloca 0.25 ml del suero puro, en el segundo 0.25 ml del suero 1/2 y así sucesivamente.

A todos los tubos se adiciona en forma constante 0.25 ml. de penicilinasa.

A todos los tubos se adiciona 0.5 ml de penicilina en forma constante, y 0.1 ml del cultivo estandarizado.

El tubo # 11 es control positivo de crecimiento y contiene caldo M.H. y cultivo.

El tubo # 12 es control negativo de crecimiento y lleva 1 ml de penicilina a la concentración de 0.4 mcg/ml y 0.1 ml del cultivo estandarizado.

Todos los tubos se incubaron por 16-20 horas a 37°C, y la lectura se hizo por examen visual, en el tubo donde no hubo crecimiento, determinando así la mínima concentración del suero que inactiva 16 U. I. de penicilinasa, dejando actuar libremente a la penicilina.

La Figura 8 resume la técnica empleada.

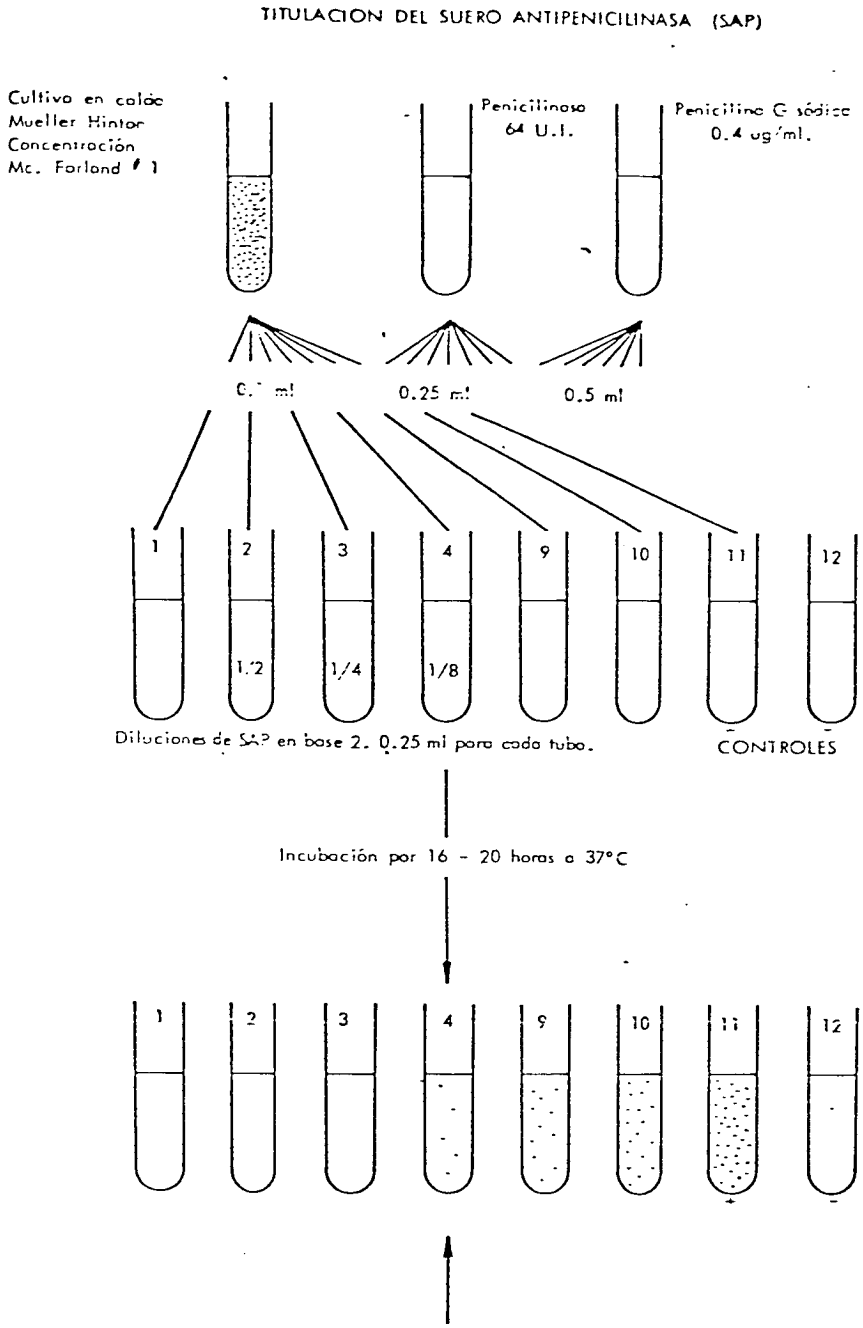
3.3.5 Actividad del SAP frente a cepas de S. aureus productoras de penicilinasa.

Conocida la especificidad del SAP, utilizando cepas sensibles y penicilinasa homóloga, se procedió a evaluar su actividad frente a la penicilinasa producida por 7 cepas de S. aureus previamente seleccionadas. Se tomó como factor constante 32 mcg/ml de penicilina, concentración que garantizaría el crecimiento de todas las cepas a utilizar en base a éstos se preparó una solución de penicilina con una concentración de 64 mcg/ml en caldo M. H.

Se hicieron 5 diluciones de SAP desde puro hasta 1/16, según la titulación de la penicilinasa homóloga.

A partir del cultivo de cada una de las cepas en caldo M. H. y con una incubación de 18 horas a 37°C se preparó una suspensión de bacterias equivalente al Mc Farland # 1.

Figura 8.


TITULACION DEL SUERO ANTIPENICILINASA (SAP)
Cultivo en caldo Mueller Hinton Concentración Mc. Farland # 1
Penicilinasa 64 U.I.
Penicilina G sódica 0.4 ug/ml.
0.25 ml
0.5 ml
1
2
3
4
9
10
11
12
1/2
1/4
1/8
Diluciones de SAP en base 2. 0.25 ml para cada tubo.
CONTROLES
Incubación por 16 - 20 horas a 37°C

Para cada tubo de la serie de 5 se coloca 0,5 ml. de penicilina en forma constante.

El SAP es colocado en cada tubo a razón de 0,5 ml. y 0,1 ml. del cultivo estandarizado.

El tubo # 6, control positivo de crecimiento contiene caldo 1 ml y 0,1 ml de inóculo.

El tubo # 7 es control negativo de crecimiento y lleva 0,2 mcg/ml. de penicilina, 16 U.I. de penicilinasa y SAP 1/8 más 0,1 ml. del cultivo de una cepa sensible, para demostrar que el SAP está activo.

La lectura se hizo a las 16-20 horas de incubación a 37°C, evaluando crecimiento o no por enturbiamiento en los tubos.

Debe ser leída la prueba en el tubo donde no haya crecimiento, determinando así la mínima concentración del SAP que podría eventualmente bloquear la penicilinasa producida por la bacteria.

La figura 9 resume la técnica seguida.

3.3.6 MIC de resistentes con SAP puro.

Como no se observó actividad del SAP frente a la penicilinasa produ-

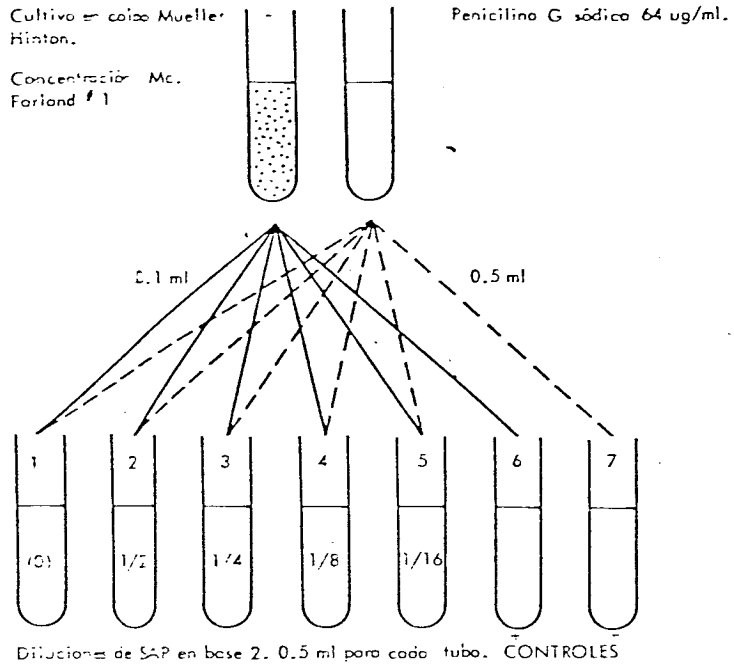
cida por cepas de S. aureus en ninguna de las diluciones del suero probado se decidió evaluar las posibles variaciones del valor MIC de las cepas resistentes adicionando SAP puro.

Para la determinación del MIC con SAP se montó como control la misma secuencia con diluciones de penicilina en suero de conejo libre de anticuerpos contra penicilinasa, con la finalidad de mantener constante las características nutricionales del medio de crecimiento.

Las diluciones de penicilina fueron las mismas que se utilizaron en el MIC anterior, y la técnica igual.

La figura 10 resume la técnica seguida.

Fig. 9. ACTIVIDAD DEL SAP FRENTE A CEPAS PRODUCTORAS DE PENICILINASA



Incubación por 16 - 20 horas a 37°C.

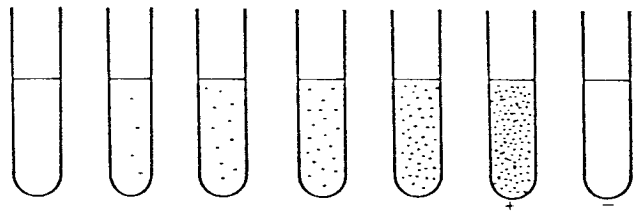
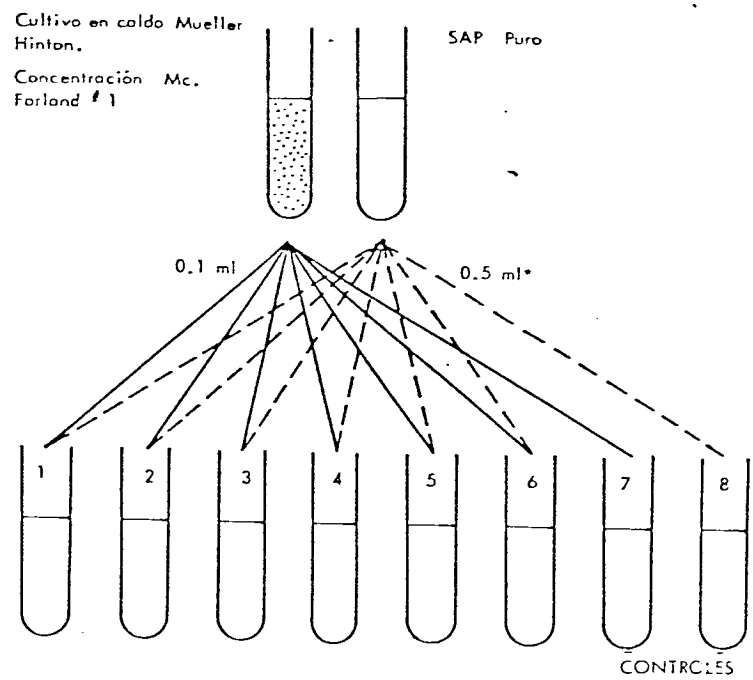


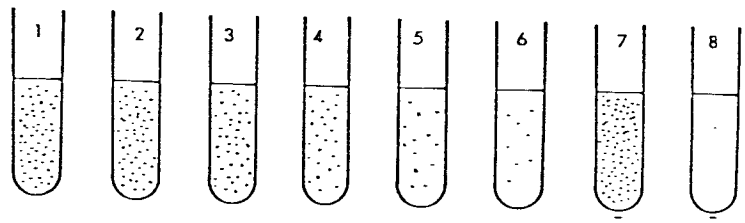
Fig. 10 MIC DE RESISTENTES CON SAP PURO



Diluciones de penicilina G sódico en caldo Mueller Hinton 0.5 ml

* Tubos controles con suero de conejo libre de anticuerpos contra penicilinasa.

Incubación por 16 - 20 horas a 37°C.

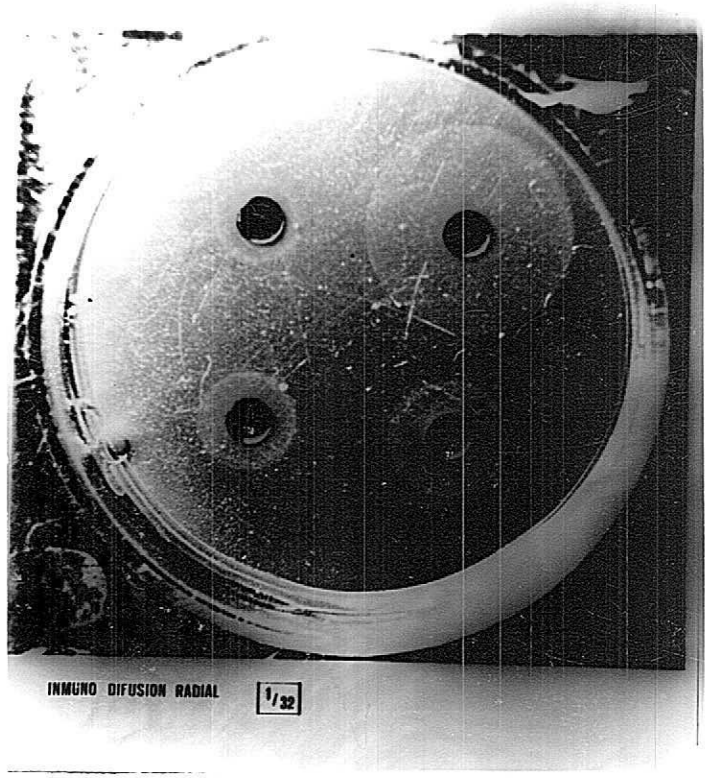


4. RESULTADOS Y DISCUSION

En la prueba de inmunodifusión doble se observaron bandas de precipitación hasta la dilución 1/64 del SAP, demostrándose así su especificidad.

En la prueba de inmunodifusión radical se observaron anillos de precipitación hasta la dilución 1/64 del SAP Fotografías 1 y 2, Calculada y graficada el área de los anillos se determinó la concentración óptima del suero, aplicando los principios de Mancini Tabla 3. El resultado de una curva más uniforme en la dilución 1/4 se tomó como la concentración más efectiva del SAP, figura 11.

Fotografía 1. Inmunodifusión radial 1/32



Fotografía 2. Inmunodifusión radial 1/64

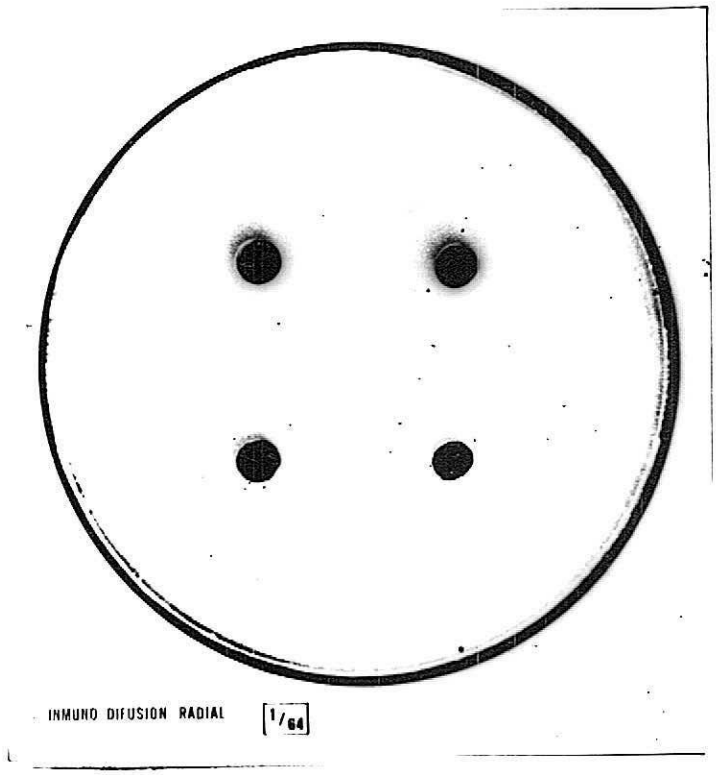
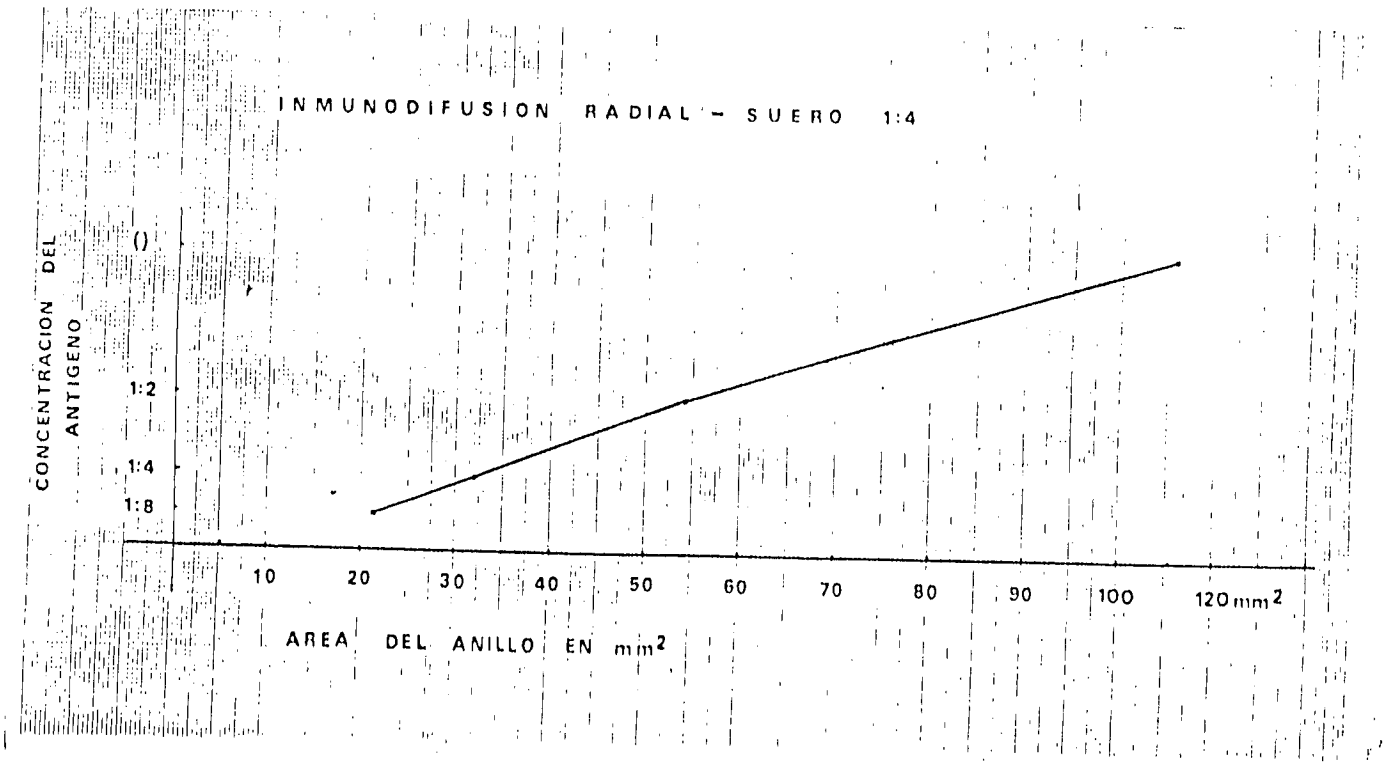


Tabla 3 Medición de anillos de precipitación en mm

SAP	Antígeno puro	Antígeno 1/2	Antígeno 1/4	Antígeno 1/8
1/2	9.2	6.8	5.6	4.5
1/4	11.6	8.3	6.4	5.2
1/8	5.6	4.7	4.0	3.4
1/16	6.7	5.6	4.7	4.3
1/32	8.4	7.0	5.7	4.7
1/64	6.5	5.0	4.6	4.2

Figura 11. Inmunodifusión radial - suero 1 : 4



Los MIC realizados para determinar la sensibilidad de las diferentes cepas, se hicieron por el método de dilución en caldo, calculando la más baja concentración de antibiótico que produce completa inhibición de crecimiento bacterial. Tabla 4.

En la titulación de la penicilinasa comercial, utilizando una concentración constante de penicilina 0,2 mcg/ml., frente a las cepas sensibles números 29 y 42, se encontró que 16 U.I. de penicilinasa neutralizan los 0.2 mcg/ml de penicilina.

También se observa una diferencia de respuesta entre las dos cepas debido a una posible pequeña producción de penicilinasa por parte de la cepa # 42.

El resultado encontrado difiere del verdadero valor de la actividad de la penicilinasa comercial en condiciónes óptimas de laboratorio; como son : buffer fosfato pH 7.0 a 30°C.

En la titulación del SAP frente a cantidades constantes de penicilinasa, 16 U.I. y de penicilina 0,2 mcg/ml se encontró que una dilución 1/64 neutraliza la penicilinasa cuando se enfrenta a la cepa # 29 y la dilución 1/8 cuando se enfrenta a la cepa # 42.

Esta variación en el resultado se explica, por qué la cepa # 42 tiene un valor MIC superior a la cepa # 29.

BIBLIOTECA AGROPECUARIA DE COLOMBIA

Tabla 4.

Los valores MIC para las 9 cepas utilizadas fueron :

Cepa # 29	0,0125 mcg/ml
Cepa # 42	0,025

Consideradas sensibles

Cepa # 1	51,2	mcg/ml
Cepa # 2	102,4	mcg/ml
Cepa # 3	102,4	mcg/ml
Cepa # 4	51,2	mcg/ml
Cepa # 5	102,4	mcg/ml
Cepa # 72	102,4	mcg/ml
Cepa # 80	600,0	mcg/ml

Consideradas resistentes.

Estos resultados ratifican lo observado en la inmunodifusión doble y en la inmunodifusión radial, demostrando la buena capacidad inmunológica de la penicilinasa y la buena capacidad del suero para neutralizar la penicinilasa homóloga.

Las pruebas para evaluar la actividad del SAP frente a la penicilinasa producida directamente por las bacterias, dieron resultados negativos, concluyéndose que hay diferencias inmunológicas entre las distintas penicilinasas.

En la determinación de los valores MIC, para las 7 cepas resistentes en presencia del SAP puro no se observaron diferencias, frente a la misma determinación con suero de conejo libre de anticuerpos contra penicilinasa. Este tipo de resultados ratifica las diferencias antigénicas de las distintas penicilinasas producida naturalmente.

La determinación de especificidad por inmunoelectroforesis fué negativa. Atribuible este resultado a factores inherentes al punto isoeléctrico de la enzima frente al buffer utilizado. Por los resultados obtenidos en la inmunodifusión doble como en la radial.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como se menciona en la introducción, los objetivos de esta investigación eran los de evaluar " In Vitro " la capacidad de un SAP para neutralizar la penicilinasa producida naturalmente por las bacterias, y dar las bases para hacer esta misma evaluación " In Vivo ".

La producción de SAP, la evaluación de especificidad y calidad frente a la enzima homóloga utilizada como antígeno, por las pruebas de inmunodifusión radial e inmunodifusión doble demuestran las propiedades antigénicas específicas que tienen la penicilina utilizada. Esta demostración de especificidad es ratificada al neutralizar la acción de la penicilinasa homóloga utilizando cepas de microorganismos no productores de la enzima.

Este sistema de evaluación demostró la buena especificidad y concentración del SAP producido, ya que mostró actividad hasta la dilución 1/64 en la cepa más sensible.

El enfrentamiento del SAP a penicilinasas producidas naturalmente por distintas cepas de S. aureus dió resultados negativos debido a las diferencias de los determinantes antigénicos de las penicilinasas.

Esto permite concluir que la utilización de un SAP "In Vivo" para permitir la acción de la penicilina frente a microorganismos preductores de penicilinasa, sería posible si se preparan sueros homólogos a la penicilinasa producida por la bacteria, o al menos sueros de tipo polivalente una vez conocidas las características antigénicas de las penicilinasas naturales, teniendo en cuenta además los posibles efectos colaterales de tipo inmunológico.

Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
CEISA

BIBLIOGRAFIA

1. ASHAFORD, W.A.; GOLASH, R.G.; HEMMING, V.G. 1976. Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae. Lancet 2 (7987) 657-658.

2. ANON. 1971. Resistencia bacteriana transferible. Med. J. Australia. 1: 1360.

3. BEVAN, J.A. 1978. Fundamentos de farmacología. Introducción a los principios de acción de los fármacos. 415-440. Ed. Harla 2a. edición.

4. CITRI, N.; SAMUNI, A.; ZYK, N. 1976. Acquisition of substrate-specific parameters during the catalitic reaction of penicillinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(4) 1048-1052.

5. CHRISTIE, A.B. 1970. Avances en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Practitioner. 205:514.

6. COHEN, S.N.; SHAPIRO, A.J. 1980. Transposable genetic elements. American Scientific 243(2) 36.

7. DAVEY, R.B.; PITTARD, A.J. 1971. Múltiple resistencia bacteriana transferible en cepas de Shigella aisladas en Melbourne entre 1952 y 1958. Med. J. Australia. 1:1367.

8. DAVIS B.; DULBECO, R.; EISEN, H.N.; GINSBERG, H.S.; WOOD, W.B. 1971. Tratado de microbiología. Ed. Salvat.

9. DIFCO. 1978. El antibiograma, sus técnicas y el sistema Dispens-O-Disc. Información técnica.

10. FARRAR, W.E. Jr.; O'Dell, N.M. 1976. Beta-lactamase activity in Chromobacterium violaceum. J. Infect. Dis. 134(3) 290-293.

11. _____.; _____. 1976. Beta-lactamases and resistance to Penicillins and cephalosporins in Serratia marcescens. I.intec. Dis. 134(3) 245-251

12. FARRAR, W.E. Jr.; NEWSOME, J.K. 1976. Diversity of Beta-Lactamase activity among clinical isolate of Gram-negatives bacilli. Am. J. Clin. Pathol. 65(4) 570-574.

13. FLET, F.; CURTIS, N.A.; RICHMOND, M.H. 1976. Mutant of Pseudomonas aeruginosa 18S that synthesizes type 1 D Beta-lactamase constitutively. J. Bacteriol. 127(3) 1585-1586.

14. FREUND, J., BONANTO. 1944. Adyuvante de Freund. Inmunol. 48 : 325.

15. GOOMBE, R.G.; GEORGE, A.M. 1976. A rapid method for purification of Beta-lactamase from Bacillus cereus by affinity chromatography. Anal. Biochem 75(2) 252-655.

16. HOU, J.P.; POOLE, J.W. 1971. Beta-lactam antibiotics: Their pheir physicochemical properties and biological activies in relation to structure. Journal of oharmaceutical Sciences. 60(2) 503-527.

17. KONTAMICHALOU, P. 1967. Estudios sobre factores de transferencia de resistencia. Pathol. Microbiol. 30: 71-93.

18. MATTHEW, M.; HARRIS, A.M. 1976. Identification of Beta-lactamases by analitical focusing isoelectric. : Correlation with bacterial taxonomy. J. Gen. Microbiol. 94(1) 55-67.

19. MEYERS, F.H.; JAWETS, E.; GOLDFIEN, A. 1977. Mecanismos de acción de los medicamentos antimicrobianos usados clínicamente. Manual de farmacología clínica. 589-610. Editorial El Manual Moderno. 3a. Edición.

20. MANN, P.G.; GEDEBOU, M. 1969. Transferencia de resistencia bacteriana infecciosa entre bacterias intestinales. Ethiop. Med. J. 4:181-188.

21. NOVICK, R.P. 1980. Plasmidas. American Scientific 243(6) 76.

22. MORE, R.P.; ROBSON, J.S. 1971. Tratado de enseñanza integrada de la medicina. Editorial Cientffico médica. Barcelona.

23. PHILLIPS, C.W.; ALLER, R.D.; COHEN, S.N. 1976. Penicillinase-producing Neisseria gonorrhoeae (Letter). Lancet 2 (7992) 960.

24. PHILLIPS, L.C. 1969. Microbiología 268-271. Ed. Interamericana 2a. Edición.

25. PHILLIPS, I. 1976. Beta-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. Lancet. 2 (7987-). 656-657.

26. RICHMOND, M.H. 1976. The presence of a variant of type-III. Beta-lactamase in a series of strains in a burns unit. J. Med. Microbiol. 9(3) 363-364.

27. RODRIGUEZ, G.M.; GONZALEZ , G.G.; MARIÑO, O.C. Manual de Técnicas en microbiología. Documento de trabajo No. 18.

28. ROSEMBLATT, J.E.; NEUMAN, A.M. 1978. A rapid Slide test for penicilinase. Am. J. Clin. Pathol. 69(3) 351-354.

29. RUBBO. 1969. Sentido común en quimioterapia. Med. J. Australia. 1:431.

30. SCHEIFELE, D.W.; SYRIOPOULOU, V.P.; HARDING, A.L.; EMERSON, B.B.; SMITH A.L. 1976. Evaluation of a rapid Beta-lactamase test for detecting ampicillin-resistant strains of Homophilus influenzae type B. Pediatrics. 58(3) 382-387.

31. TURNER, C.G.; RATCLIFE, J.G.; ANDERSON, D. 1976. Penicillinase-producing Neisseriae gonorrhoeae. Lancet 2 (7989) 793.

32. VIDEAU, D. 1976. Antibiotiques : Resistances multiples et resistances croisses. Cah. Med. Vet. 65(1) 31-48.

33. WEINSTEIN LOUIS. Las penicilinas bases farmacológicas de la terapéutica. 999-1030.

34. WHELDOM, D.B.; MARY, P.E. 1978. A rapid paper strip method for detection of penicillinase production by penicillin resistant strains of Staphilococcus aureus. J. Clin. Pathol. 31 (4) 388-389.

35. WILLIAM, C.A.; CHASE, M.W. 1971. Análisis de precipitación por difusión en gel. Métodos en inmunología e inmunoquímica. 3: 213-214. Academie Press N.Y. London.

36. YAMAMOTO, S.; LAMPEN, J.O. 1976. The hidrophobic membrane penicillinase of Bacillus licheniformis 749/c. J. Biol. Chem. 251(13) 4102-4110.

37. YAMAMOTO, S.; LAMPEN, J.O. 1976. Purification of plasma membrane penicillinase from Bacillus licheniformis 749/c and comparison with exoenzime. J. Biol. Chem. 251 (13). 4095-4101.

38. _____.; _____. 1976. Membrane penicillinase of Bacillus lincheniformis 749/c sequence and possible repeated tetra-peptide structure of the phopholipopeptide región. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73(5) 1457-1461.

Instituto Colombiano Agropecuario
Centro de Documentación
C E I S A

BIBLIOTECA AGROPECUARIA
DE COLOMBIA