

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

ANNALES

DE LA

FACULTAD DE QUIMICA

VOL. 6

1 9 6 0

1961/11/961
ej. 2

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES BIOQUIMICAS DE 75 CEPAS DE "MICROCOCCUS PYOGENES" *

I.— Correlación entre sus caracteres y la susceptibilidad a 8 antibióticos

V. RICAUD DE PEREYRA y B. WERNER DE GARCÍA

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia las características morfológicas, tintoriales, bioquímicas y susceptibilidad a 8 antibióticos de 75 cepas de *Micrococcus pyogenes* coagulasa positivos, aisladas de procesos patológicos humanos.

A pesar de presentar susceptibilidades diferentes a los distintos antibióticos ensayados, los caracteres estudiados en las 75 cepas fueron coincidentes.

No hay aparente correlación entre la susceptibilidad o resistencia a dosis terapéuticas de los antibióticos ensayados y los caracteres morfológicos, tintoriales y bioquímicos del *M. pyogenes*.

La acción de los antibióticos sobre las bacterias está dirigida, en general, sobre su sistema enzimático, siendo muchos los investigadores que han trabajado sobre el tema.

La mayor parte de la experimentación realizada, se refiere a la acción que ejercen los antibióticos en el momento en que están actuando, pero son muy pocos los estudios sobre posibles cambios o modificaciones en los sistemas enzimáticos, con carácter hereditario.

En el presente trabajo se estudia las propiedades bioquímicas y la susceptibilidad a los antibióticos, de 75 cepas de *Micrococcus pyogenes* aislados de procesos patológicos humanos, tratando de buscar posibles correlaciones.

* Trabajo realizado en la Cátedra de Microbiología General, de la Facultad de Química. Montevideo, Uruguay.

MATERIAL Y METODOS

El material (75 cepas de *M. pyogenes* coagulasa positivas) fue aislado de procesos patológicos humanos (exudados, supuraciones, hemocultivos).

Las cepas se estudiaron desde el punto de vista de: utilización de fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno; reducción de nitratos a nitritos; producción de indol, hidrógeno sulfurado y acetil-metil-carbinol; acción proteolítica sobre la gelatina; acción sobre la leche tornasolada; reacción del rojo de metilo; producción de acidez a expensas de glucosa, lactosa, sacarosa y manitol; acción hemolítica sobre glóbulos rojos de carnero, conejos y humanos. Paralelamente se estudió la susceptibilidad de estas cepas a los siguientes antibióticos: penicilina, neomicina, clorotetraciclina, bacitracina, estreptomina, cloromicetina, eritromicina y novobiocina, empleando para este fin la técnica descripta por Vincent y Vincent (17).

RESULTADOS OBTENIDOS

Las propiedades bioquímicas de las 75 cepas fueron iguales, encontrándose diferencias solamente en su acción sobre los glóbulos rojos. Los cuadros I y II, resumen los resultados.

Cuadro I

PROPIEDADES BIOQUIMICAS

Fosfato de amonio	Nitratos	Gelatina	Leche tornasol	RM	VP	Indol	SH ₂	Glucosa	Sacarosa	Lactosa	Manita
—	+	+	Acido y coag.	+	+	—	—	A ₁	A ₁	A ₁	A ₁

Para el estudio de la acción sobre los glóbulos rojos se siguió la técnica clásica de aislamiento en superficies de placas de agar sangre al 5%. Elek y Levy (16) usan una técnica similar, dándole carácter cuantitativo por la medida del halo de hemólisis. Estos autores prue-

Cuadro II

ACCION SOBRE LOS GLOBULOS ROJOS

Carneros	Humanos	Conejo	Nº cepas positivas	% de positivas
+	+	+	28	37,3
+	—	—	6	8
+	+	—	2	2,6
+	—	+	15	20
—	+	+	8	10,6
—	+	—	1	1,3
—	—	+	6	8
—	—	—	9	12

Positivos: 51 (68 %) 39 (52,7 %) 57 (76 %)

+ Hemólisis.
— Sin acción.

ban sangre de carnero y de conejo, en concentración de 2 % y trabajan comparativamente con la técnica en placas (medio sólido) y en tubos (medio líquido).

Para el estudio de la susceptibilidad a los antibióticos se empleó la técnica de Vincent y Vincent (loc. cit.).

Cuadro III

SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

	P		Ne		A		B		E		Cl		Er		Nb	
	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s	r	s
Nº de cepas	54	21	7	68	31	44	48	27	39	26	23	52	28	47	0	75
%	72	28	9,3	90,6	49,3	58,6	64	36	52	34,6	30,6	69,3	37,3	62,6	0	100

r = resistente.

s = susceptible.

P: penicilina; Ne: neomicina; A: aureomicina (clorotetraciclina); B: bacitracina; E: estreptomina; Cl: cloromicetina; Er: eritromicina; Nb: novobiocina.

Al encontrarse diferencias en las cepas, en relación con su acción sobre los glóbulos rojos, se buscó la posible correspondencia entre este hecho y la susceptibilidad a los antibióticos. Los cuadros IV y V resumen los resultados.

Cuadro IV

% DE CEPAS RESISTENTES A CADA ANTIBIOTICO,
QUE CORRESPONDEN A CADA GRUPO DE ACCION HEMOLITICA

Carnero	Humano	Conejo	P	Ne	A	Ba	E	Cl	Er	Nb
+	+	+	33,3	42,8	45,1	43,1	41	30,4	32,1	0
+	—	—	7,4	0	6,4	14,2	10,2	4,3	7,1	0
—	+	+	12,9	14,2	6,4	5,7	10,2	0	3,5	0
—	—	+	7,4	0	6,4	2,8	5,1	8,6	3,5	0
—	—	—	14,8	14,3	6,4	8,5	7,3	8,6	10,7	0
+	+	—	1,8	0	3,2	2,8	2,5	4,3	3,5	0
+	—	+	20,3	14,3	22,5	20	20,5	43,4	35,7	0
—	+	—	1,8	14,3	3,2	2,8	2,5	0	3,5	0

Cuadro V

% DE CEPAS RESISTENTES A CADA ANTIBIOTICO,
CON ACCION HEMOLITICA SOBRE CADA UNO DE LOS TIPOS DE G. R.

	10 U.I. P	20 μ g Ne	40 μ g A	20 U. Ba	100 μ g E	40 μ g Cl	10 μ g Er	20 μ g Nb
Carnero positivas	62,8	57,1	77,2	80,1	74,2	82,4	78,4	0
Humano positivas	49,8	71,3	57,9	54,4	56,2	34,7	42,6	0
Conejo positivas	73,9	71,3	80,4	71,6	76,8	82,4	74,8	0

DISCUSION

Al estudiarse el mecanismo de acción de los antibióticos, se ha comprobado que en general inhiben sistemas o grupos definidos de sistemas enzimáticos. Para que su efecto sea bacteriostático o bactericida debe dirigirse sobre un proceso metabólico de importancia vital para la bacteria. Aparte de esto, puede ejercer acciones menores, que sólo conducen a modificaciones secundarias (no vitales).

Las 75 cepas de *Micrococcus pyogenes* coagulasa positivos estudiadas por nosotros, no han mostrado diferencias en cuanto a sus caracteres morfológicos, tintoriales y bioquímicos, presentando sin embargo susceptibilidades diferentes a los distintos antibióticos ensayados. Solamente cabe destacar el hecho de que, dentro de las cepas resistentes a la dosis terapéutica máxima, el mayor porcentaje corresponde al grupo con acción hemolítica simultánea para glóbulos rojos de carnero, conejo y humanos (30-45 %). Los porcentajes correspondientes a los otros grupos están por debajo del 20 %. Nuestros resultados concuerdan con los datos de Barber (10) para penicilina. Este autor estudió 200 cepas de estafilococo coagulasa positivos, llegando a la conclusión de que, entre las cepas resistentes y sensibles a la penicilina no existen diferencias morfológicas, culturales, bioquímicas y de acción patógena en conejos.

Boniece, Holmes y Wick (11) estudiaron la coagulasa de estafilococos, observando la acción que sobre ella ejercen los antibióticos y quimioterápicos.

En cepas resistentes a la eritromicina encuentran un aumento en el tiempo de coagulación de la sangre citratada, en presencia de pequeñas cantidades de la droga. Citan un efecto similar de la tetraciclina y cloromicetina. Agnew, Kaplan y Spink (12) llegan a conclusiones similares. De acuerdo con nuestros resultados, una vez retiradas las drogas, los tiempos de coagulación son normales.

Creemos interesante mencionar algunos trabajos relacionados con el mecanismo de acción de los antibióticos probados por nosotros. Wisseman y col. (1) estudian la cloromicetina encontrando que interfiere con la normal asimilación del amonio y suprimiendo la oxidación del glicerol.

Gale y Paine (2, 3) citan como importante la concentración de dicha droga con respecto a su efecto; a bajas concentraciones, pequeño efecto sobre asimilación de glutamato pero significativa inhibición de la síntesis de las proteínas (76 %). A mayor concentración, franca acción inhibitoria sobre asimilación de glutamato y acción total sobre la síntesis de las proteínas.

Karp y Snyder (4) demuestran que clorotetraciclina y oxitetraciclina, en concentraciones de 100 a 300 microgramos, inhiben la oxidación del glutamato por ciertas *Rickettsias*.

La estreptomina tiene multiplicidad de efectos sobre el metabolismo bacteriano; los resultados pueden ser inducidos por mínimas

concentraciones con acción bacteriostática. Wrught y Burk (5) estudian diversas acciones de estreptomycin sobre metabolismo de *E. coli*, encontrando una inhibición marcada de la respiración y los procesos de deaminación.

Fitzgerald y Bernheim (6) citan inhibición de oxidación del ácido benzoico por *Mycobacterium* no patógenos, bajo la acción de pequeñas cantidades de estreptomycin. Gale y Taylor (7) encuentran alteraciones en el metabolismo de los amino ácidos por acción de la penicilina y Hotchkiss (8) se refiere a su acción sobre el metabolismo de los péptidos.

Parte de estas acciones están siendo estudiadas por nosotros y serán objeto de una nueva comunicación.

Diversos autores han estudiado la correlación entre propiedades bioquímicas de las bacterias y su resistencia a los antibióticos. Kylin y Lindberg (9), trabajando con 385 bacterias del grupo coliforme, encontraron que las diferentes combinaciones de IMVIC presentan susceptibilidades diferentes a los antibióticos.

Observaciones de Ruziczka y Orth (13) indican a oxitetraciclina y clorotetraciclina como actuando primariamente sobre el crecimiento bacteriano, causando marcados cambios en la morfología. Hahn y Wisseman (14) encuentran acción inhibitoria de oxitetraciclina y clorotetraciclina sobre aparición de enzimas adaptativas de *E. coli* al crecer en un medio con lactosa. La penicilina es citada como introduciendo cambios evidentes en la morfología, afinidad tintorial, etc.

En general todas estas modificaciones son producidas por cantidades relativamente grandes de antibióticos y observadas en su presencia. Las cepas estudiadas por nosotros se mostraban resistentes o susceptibles a dosis terapéuticas, las que no son muy altas; por otra parte, el estudio de sus propiedades se realizó en ausencia del antibiótico, no notándose en esas condiciones ninguna diferencia entre las cepas.

SUMMARY

Morphologic, tinctorial and biochemical characteristics as well as susceptibility to eight antibiotics of 75 coagulase-positive *Micrococcus pyogenes* strains isolated from human pathologic processes are studied in this paper.

Although showing different susceptibilities to the various antibiotics tested, the characteristics studied in the 75 strains coincided.

No apparent correlation between the susceptibility or resistance to therapeutical doses of the antibiotics and morphologic, tinctorial and biochemical characteristics was found.

Referencias

- (1) **Wisseman, C. L. Jr.; Ley, H. L. Jr. and Hahn, F. E.:** Bact. Proc., p. 94, 1952.
- (2) **Gale, E. F. and Paine, T. F.:** Bioch. J., 47: 26, 1950.
- (3) **Gale, E. F. and Paine, T. F.:** Bioch. J., 48: 298, 1951.
- (4) **Karp and Sneider, J. C.:** Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 79: 216, 1952.
- (5) **Wright, K. and Burk, D.:** Antibiotics and Chem., 1 (6): 379, 1951.
- (6) **Fitzgerald, R. J. and Bernheim, F.:** J. Bact., 54: 671, 1947.
- (7) **Gale, E. F. and Taylor, E. S.:** J. Gen. Microbiol., 1: 314, 1947.
- (8) **Hotchkiss, R. D.:** J. Exptl. Med., 91: 351, 1950.
- (9) **Kylin, O. and Lidberg, C.:** Antibiotics and Chem., 6: 803, 1956.
- (10) **Barber, M.:** J. Path. and Bact., 59: 373, 1947.
- (11) **Boniece, W. S.; Holmes, D. H. and Wick, W. E.:** Antibiotics and Chem., 6 (9): 550, 1956.
- (12) **Agnew, S.; Kaplan, M. and Spink, W.:** Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 65: 38, 1947.
- (13) **Ruziczka, A. and Orth, E.:** Umschan Wiss. u. Tech., 51: 432, 1952.
- (14) **Hahn, F. E. and Wisseman, C. L.:** Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 76: 533, 1951.
- (15) **Fujita, H.:** Mie Med. J., 7: 169, 1957.
- (16) **Elek, S. D. and Levy, E.:** J. Path. and Bact., 62: 541, 1950.
- (17) **Vincent, J. C. and Vincent, H. N.:** Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med., 55: 162, 1944.