

Instituto «Jaime Ferrán» de Microbiología.
Sección de Biología Bacteriana
Madrid

Existencia en suero de un nuevo factor que interviene en antibioterapia

por
A. Portolés y G. Tejerina

(Recibido para publicar el 31 de marzo de 1960)

La aplicación clínica de los antibióticos amplió extraordinariamente los horizontes terapéuticos con los sorprendentes resultados en principio obtenidos; ello dio origen a la necesidad de intensificar los conocimientos relativos, tanto al metabolismo de las bacterias sensibles y resistentes como a los mecanismos biológicos de ataque y defensa. Son fruto de las múltiples investigaciones en este campo, el extraordinario conjunto de trabajos que señalan la complejidad del problema, cuyo estudio se halla dificultado, sobre todo, por el desconocimiento de la íntima bioquímica del metabolismo bacteriano, que precisará exactamente la aparición de bacteriolisis, bactericidia, bacteriostasia o las diversas facetas de la bacterio-resistencia. La interrelación existente entre los dos factores decisivos, antibiótico-bacteria, llega a ser tan íntima en algunos momentos, que es indistinto plantear el problema desde uno u otro punto de vista, ya que los resultados a obtener pueden representar tanto el modo de acción como la sensibilidad, resistencia o dependencia.

De la importancia y alcance de estas investigaciones pueden dar idea algunas publicaciones bien autorizadas: así, GALE y cols. (1947, 1953), HOTCHKISS (1950), SIMMONDS y FRUTÓN (1950, 1951), CARR y MACHEBOEUF (1954), MILLER y

BOOR (1946, 1948), han contribuido de manera notable a aclarar el mecanismo de acción de la penicilina; MACHEBOEUF (1948), WIGHT y BURK (1951), BARKULIS (1953), LICHSTEIN y GILFILLAN (1951) y UMBREIT (1949, 1953), se han preocupado principalmente del modo de actuar la estreptomina; HAHN y cols. (1951), SAZ y cols. (1953), GALE y cols. (1950, 1953), SMITH y WORREL (1953), WISSEMAN y cols. (1954), señalan caminos posibles por los que el cloramfenicol ejerce su actividad; y HAHN y WISSEMAN (1951), BERNHEIM (1954), LOOMIS (1950), SAZ y col. (1953, 1954), exponen sus interpretaciones respecto a la acción del grupo de las tetraciclinas.

Ahora bien, si tenemos en cuenta que estos eventos de acción antibiótica tienen lugar en lo más íntimo del organismo vivo que soporta la infección, habrá que pensar que este huésped, lejos de ser pasivo, suma acciones biológicas al ya complicado mecanismo de lucha antimicrobiana y modifica los resultados que cabría esperar. Sabemos por varios trabajos entre los que destacamos el de LAMBIN y DESVIGNES (1952), el valor que la fagocitosis puede tener en la Antibioterapia y asimismo nos atrevemos a señalar que otros sistemas de defensa del organismo parasitado pudieran ser de importancia notable en este aspecto.

El hecho de que la Antibioterapia imponga la penetración (por vía parenteral) de sustancias biológicamente activas y extrañas al organismo, nos induce a pensar en las respuestas orgánicas de tipo humoral (de todas conocidas son las reacciones de sensibilización a la penicilina, etc), capaces de intervenir hasta el extremo de ocasionar irregularidades como las que encontramos en determinaciones hemáticas del nivel antibiótico y que señalamos esquemáticamente en el gráfico n.º 1. Estas variaciones en el nivel antibiótico presentan correlación entre su concentración hemática máxima y la dosis administrada, pero entre las curvas representativas para cada muestra existieron —dentro de cada dosis— amplias diferencias representadas con zonas de rayado.

Por otra parte, respuestas inesperadas en casos correctamente tratados —previo antibiograma en medio líquido y administración de dosis teóricamente eficaces— y comportamientos «especiales» en sueros de enfermos reiteradamente sometidos a Antibioterapia, nos hicieron desestimar las razones ya clásicas cuya existencia no negamos, de diferencias en el nivel antibiótico de la sangre por intervención de comida, secreciones gástricas, o diferencias de edad, sexo, etc.; así como también pasamos por alto las lógicas diferencias entre el comportamiento de los gérmenes *in vivo* e *in vitro* frente a los

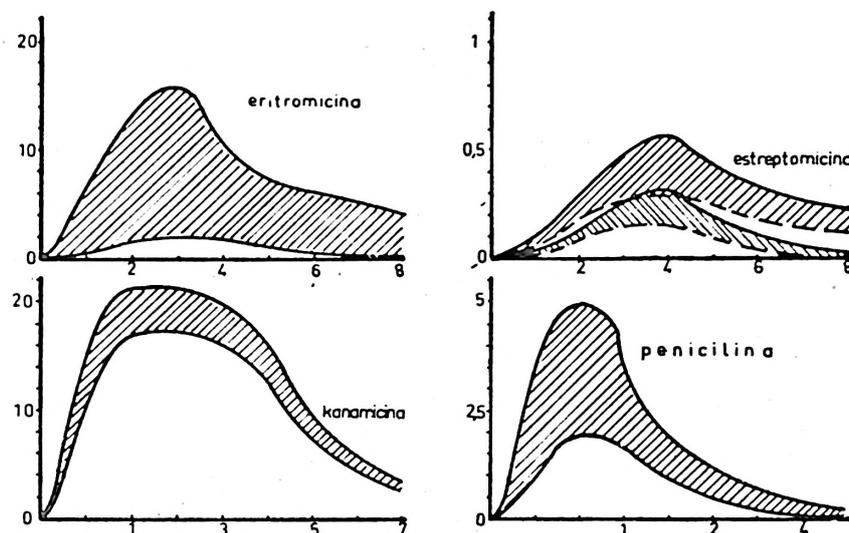


Gráfico 1

Niveles antibióticos en suero de animales tratados con 200.000 u. de penicilina (a), 0,5 de dihidroestreptomicina (b), 0,5 y 0,3 g de eritromicina (c) y 0,5 g de kanamicina (d). Los espacios rayados ponen de manifiesto las oscilaciones obtenidas en las diferentes determinaciones efectuadas.

antibióticos, para pensar de modo preferente, en que estas irregularidades se nos presentaron con mayor frecuencia en muestras clínicas procedentes de personas sometidas a prolongado tratamiento antibiótico; así se comprobó en el suero de dos enfermos convenientemente seleccionados por sus acentuados tratamientos estreptomicínico y terramicínico. Todo ello nos condujo a la hipótesis de «existencia de sustancias séricas bloqueantes de moléculas antibióticas», hecho que, si bien nos parece tener suficientemente demostrado para algún antibiótico —como es el caso destacado de la kanamicina— no está aún perfectamente controlado en alguno de los otros ensayados.

Material y métodos

ANIMALES. Se utilizaron conejos previamente seleccionados por sus condiciones sanitarias y color de piel, y se mantuvieron en observación durante unos veinte días. Su peso oscilaba de 2,0 a 2,300 kg. Se emplearon dos lotes, uno testigo (cinco conejos) y otro experimental (doce conejos).

ANTIBIÓTICOS. En este caso empleamos sulfato de kanamicina, del lote L.8395, procedente de los Laboratorios Bristol Inc. de Siracusa, N.Y. y amablemente facilitado

por el doctor TELTSCHER, de aquellos Laboratorios. Su potencia, determinada por ensayos turbidimétricos, era de 900 γ por mg.

GÉRMINES. Para las pruebas de bioensayo se utilizaron cultivos de 24 horas sobre caldo Penassay (Difco) de *Staphylococcus aureus*, Heatley (Oxford 657) de la N.C.T.C. del Medical Research Council de Londres.

MATERIAL. Entre el material de uso corriente en el laboratorio, hemos de destacar el empleo de microtubos de ensayo (20 \times 6 mm) especialmente fabricados para trabajar con cantidades inferiores a 0,5 c. c. y jeringuillas de 0,25 c. c. divididas en 1/100.

En la marcha de trabajo hay que distinguir varias técnicas, que describimos a continuación:

PAUTA DEL TRATAMIENTO ANTIBIÓTICO. Seguimos el procedimiento de inoculación indicado por WEST (1951), mediante inyección endovenosa e intraperitoneal, de dosis que alcanzaron desde 10 mg (la primera) hasta 200 mg (la última). Al final del tratamiento, de un mes de duración, cada animal tratado había recibido unos 450 mg de kanamicina por kg de peso.

INTRADERMO-REACCIÓN. Se practicó cuando se dio por terminado el tratamiento en ambos lotes de animales, para conocer el grado de sensibilidad a la droga. En estas pruebas intradérmicas sobre la cara dorsal del animal previamente depilado, se inocularon cantidades de 0,15 c. c. de soluciones patrón con 40,0 - 20,0 - 10,0 - 5,0 - 2,5 - 1,25 - 0,62 - 0,31 γ de antibiótico por c. c. de agua destilada estéril y apirógena. Como control se inyectó además 0,15 c. c. de solución salina estéril; todo ello según el esquema A.

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD BLOQUEANTE DE LA ACCIÓN ANTIBIÓTICA DEL SUERO. En las muestras de sueros obtenidas previa sangría por punción cardíaca, realizamos un primer ensayo para conocer si en él existe capacidad bloqueante frente a la kanamicina, y si esta capacidad guarda relación con el tiempo de contacto entre ambos factores. La técnica es como sigue: en doce tubos de \pm 1,2 c. c. de capacidad, se colocan 0,2 c. c. de suero de conejo tratado con kanamicina y al primero de ellos se añaden otras 0,2 c. c. de una solución patrón del antibiótico que permita obtener una concentración final de 200 γ por c. c. Después de homogeneizar perfectamente, se pasan 0,2 c. c. de este tubo al siguiente, repitiéndose la misma operación a lo largo de toda la serie; los 0,2 c. c. correspondientes al último tubo se desprecian. De esta forma, conseguimos poner en contacto al suero con diluciones al duplo de kanamicina, formando una serie de diluciones de 200 a

0,097 γ por c. c. Esta operación la practicamos simultáneamente en tres series que llevamos a estufa de 37°C durante tiempos distintos: 4, 8, 16 y 24 horas. Cada una de estas series va acompañada de otra análoga en la que hemos utilizado suero normal procedente de conejos no tratados.

Transcurrido el tiempo correspondiente en cada caso, sembramos todos los tubos con 0,2 c. c. del cultivo de *Staphylococcus aureus*, que sorprendido en su fase constante de crecimiento se diluye hasta alcanzar la concentración de 10^5 . Con el fin de poder apreciar el más ligero desarrollo, este cultivo lleva resazurina en la forma indicada por uno de nosotros (PORTOLÉS, 1960). La lectura de los resultados se realiza después de incubar a 37°C durante 16 horas.

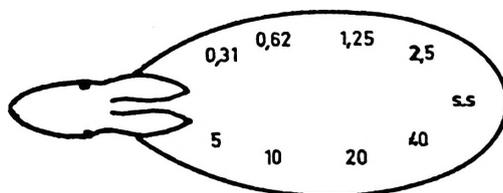
PRUEBAS INMUNOLÓGICAS. Los resultados obtenidos en los ensayos precedentes, nos indujeron a realizar alguna prueba de tipo inmunológico con el fin de poner de manifiesto la posible naturaleza de esta sustancia neutralizante de la acción antibiótica; estas pruebas fueron, concretamente, de precipitación y fijación de complemento. La primera de ellas la realizamos sobre tubo con diluciones de kanamicina que oscilaron de 1:1 a 1:50.000 y diluciones de suero que alcanzaron desde 1:2 hasta 1:60.

Para la prueba de fijación de complemento seguimos la técnica habitual, según indica ZUAZO (1958). Las diluciones de suero, inactivado media hora a 56°C, van de 1:1 a 1:40 y las concentraciones de kanamicina variaron de 2,5 a 100 mg. Para garantizar los resultados obtenidos realizamos un ensayo de poder anticomplementario del antígeno, empleando de acuerdo con la experiencia anterior, 25 mg de kanamicina por c. c.

Resultados

Los datos obtenidos en estas experiencias pueden resumirse como sigue:

INTRADERMO-REACCIONES. Tanto en los animales testigo como en los problema, todas las reacciones intradérmicas dieron resultados negativos.



protocolo de intradermo-reaccion

Esquema A

ACCIÓN BLOQUEANTE ANTI-ANTIBIÓTICA DEL SUERO. Puede observarse claramente en el gráfico n.º 2, las variaciones en el título de concentración mínima inhibidora de las mezclas de suero-antibiótico, según los distintos períodos de contacto, así como también el título del poder antibacteriano residual del suero (P.A.R.) y sensibilidad frente al antibiótico (S.B.) de la cepa bacteriana utilizada en el bioensayo.

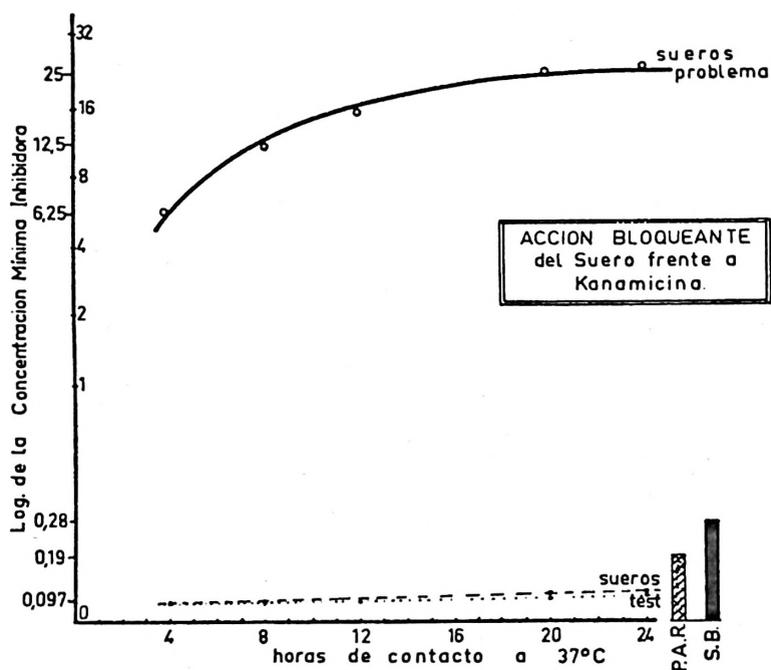


Gráfico 2

PRUEBAS DE PRECIPITACIÓN. Fueron negativas para diluciones del antibiótico 1:1 a 1:50.000 frente a las del suero al 1:2 hasta 1:60, para un protocolo con un total de ochenta y un tubo.

PRUEBAS DE DESVIACIÓN DE COMPLEMENTO. Se obtienen resultados de franca positividad para títulos de 1/5 de suero y 10 mg por c. c. de kanamicina, según indica el cuadro siguiente:

CUADRO I

Prueba de desviación de complemento

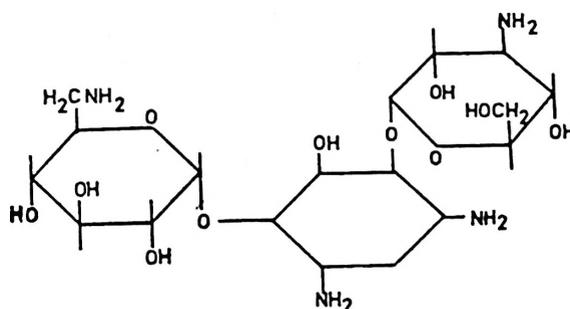
Concs. de kanamicina			1:1	1:2	1:5	1:10	1:20	1:40
	100 mgr/cc		—	—	—	—	—	—
50 »		—	—	—	—	—	—	—
25 »		—	—	—	—	—	—	—
10 »		—	—	+	+	++	+++	+++
5,0 »		—	+	+	++	+++	+++	+++
2,5 »		—	+	+	++	+++	+++	+++

La determinación realizada del poder anticomplementario de la kanamicina, proporciona resultados claramente negativos, lo que nos confirmó los valores de los títulos que hemos señalado por la experiencia anterior.

Discusión

En primer lugar hemos de hacer constar que al igual que TISCH, HUFTALEN y DICKISON (1958), no hemos encontrado signos de toxicidad o esclerosis de las venas en los conejos sometidos a tratamiento kanamicínico.

Y después, a la vista de los resultados obtenidos, sustentar la hipótesis de que a la penetración de una molécula policíclica, como la kanamicina



Fórmula de la Kanamicina según CRON y cols. (1958)

por vía parenteral en el organismo, éste reacciona como frente a un producto antigénico, creando sustancias capaces de oponerse a su acción; oposición que en nuestro concepto no es frente a una actividad biológica, sino como antagonismo a una entidad química, aunque de esta acción antagónica resulte un efec-

to de inactivación biológica, por un posible mecanismo de bloqueo.

Este mecanismo de bloqueo o neutralizante, que no tiene un origen anafiláctico, como lo prueba la negatividad de las intradermo-reacciones, se pone claramente de manifiesto al estar en contacto el suero de animales tratados con diluciones del antibiótico en estudio; así, es posible ver de modo cuantitativo que trabajando con cepas sensibles a concentraciones de 0,28 γ de kanamicina por c. c., precisan de 6,25 - 12,5 - 15,8 - 24,6 - y 25 γ /c. c., cuando el antibiótico está en contacto con el suero 4, 8, 12, 20 ó 24 horas, es decir, que la actividad antimicrobiana queda disminuida y ello, sin tener en cuenta que el suero problema ya tiene un reducido «poder antibacteriano residual» —de origen antibiótico o inmunitario— que no deducimos, equivalente a una concentración de 0,19 γ de antibiótico. Esto hace pensar, dada la sensibilidad de la cepa ensayada a 0,28 γ de kanamicina, que se ha sumado en ella una posible potencia antiestafilocócica específica del suero. Dicho efecto sinérgico suero +-antibiótico, está confirmado en el hecho de que para los sueros testigo, basta la concentración (por sí sola ineficaz) de 0,097 γ de kanamicina, sumándose a la actividad antiestafilocócica de los 0,2 c. c. del suero para producir un efecto inhibidor.

Si pensamos en la naturaleza de estas sustancias, por nosotros detectadas, podemos suponer que lleguen a guardar relación con el carácter asignado a los anticuerpos, ya que han sido bastante alentadores los resultados obtenidos en las pruebas de desviación de complemento. La negatividad más absoluta que acompañó a los ensayos de precipitación, parece excluir su condición de precipitinas.

No obstante estas sugerencias, hemos de reconocer la posibilidad de que en el mecanismo que rige la acción señalada, intervengan factores de índole bien distinta, entre los que creemos deben destacarse los relacionados con procesos de tipo enzimático.

Resumen

Por pruebas de tipo inmunológico se detecta la presencia de sustancias, posiblemente semejantes a anticuerpos, capaces de bloquear la acción antibacteriana de la kanamicina en suero de conejos tratados repetidamente por vía endovenosa e intraperitoneal con esta sustancia antibiótica.

Con ello se ponen de manifiesto reacciones humorales específicas del organismo, que vienen a sumarse al ya complicado proceso de «infección-resistencia a drogas».

Se pretende que esta acción bloqueante del suero en animales experi-

mentalmente tratados concurre con otras resultantes, ya clásicas, a justificar algunas irregularidades en la Antibioterapia, señaladas en la introducción de este trabajo.

Summary

Existence in serum of a new factor which intervenes on antibiotherapy

We have carried out experiences with Kanamycin sulfate which was injected to a series of rabbits according to WEST's method with dosis of 10 mgrs. upto 200 mgrs. in total upto 450 mgrs. of Kanamycin/Kg. of rabbit, during a month. This amount was sufficient to provokes an immunological response able to be detected in the serum.

Intradermo-reactions to find out, if any, the degree of sensibility to the drug were made with 0.15 ml. of standard solutions with 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 and 0.31 micrograms/ml. Negative results were obtained.

The problem-serum and test-serum were set into the presence of a range of increasing concentration of Kanamycin. The minimal inhibitory concentration was determined according to the method of one of us (PORTOLÉS, 1960) against *Staphylococcus aureus*.

Immunological test were made to learn about the possible character of this antibiotic action neutralizing substance: precipitation tests on tube for Kanamycin dilutions (1:1 — 1:50.000) and serum dilutions (1/2 to 1/60) were investigated, but with negative results. Furthermore, the deviation of complement tests were made according to ZUAZO's technique (1958) with inactivated serum (1:1 until 1:40) and Kanamycin from 2.5 up to 100 mgr/ml from which we obtained positive results; but absolute negative ones by the anticomplementary tests of the antigen with 25 mgr. Kanamycin/ml.

The inactivating action may be seen in the Graph. 2, in which we notice the difference in M.I.C. between the problem serum and the test serum.

The deviation of complement tests were positive at titles of 1/5 of serum and 10 mgr/ml. as it is indicated in scale 1.

The results of these experiments suggest the existence in the serum of antibiotic treated animals, of a substance which inactivates specifically the antibiotic and acting proportionally to the time of contact (exposure).

Bibliografía

- BERNHEIM, F. — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **110**, 115, 1954.
- BARKULIS, I. L. — *J. Bact.*, **66**, 337, 1953.
- CARR, G. K. y MACHEBOEUF, M. — *Ann. Inst. Pasteur*, **87**, 585, 1954.
- CRON, M. J., FARDIG, O. B., JOHNSON, D. L., PALERMITI, F. M., SCHMITZ, H., y HOOPER, I. R. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**, 27, 1958.
- GALE, E. F., y TAYLOR, E. S. — *J. Gen. Microbiol.*, **1**, 314, 1947.
- GALE, E. F., y PAINE, T. F. — *Biochem. J. (London)*, **47**, XXVI, 1950.
- GALE, E. F., y FOLKES, J. P. — *Biochem. J. (London)*, **55**, 721, 1953.
- HAHN, F. E., y WISSEMAN, C. L. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **76**, 533, 1951.
- HAHN, F. E., WISSEMAN, C. L., Jr., y HOPPS, H. E. — *J. Bact.*, **67**, 674, 1954.
- HOTCHKISS, R. D. — *J. Exptl. Med.*, **91**, 351, 1950.
- LAMBIN, S., y DESVIGNES, A. — *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **146**, 1923, 1952.
- LICHSTEIN, H. C., y GILFILLAN, R. F. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **77**, 459, 1951.
- LOOMIS, W. F. — *Science*, **111**, 474, 1950.
- MACHEBOEUF, M. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **30**, 161, 1948.
- MILLER, C. P., y BOOR, A. K. — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **61**, 18, 1946.
- PORTOLÉS, A. — *Laboratorio*, **29**, 21, 1960.
- SAZ, A. K. y EAGLE, H. — *J. Bact.*, **66**, 347, 1953.
- SAZ, A. K. y SLIE, R. B. — *Antibiot. Ann. (Med. Encyclopedia, Inc., N. Y.)*, **632**, 1953-54.
- SIMMONDS, S., y FRUTON, J. S. — *Science*, **111**, 239, 1950.
- SIMMONDS y FRUTON, J. S. — *Yale J. Biol. Med.*, **23**, 407, 1951.
- SMITH, G. N., y WORREL, C. S. — *J. Bact.*, **65**, 313, 1953.
- TISCH, D. E., HUFTALEN, I. B., y DICKISON, H. L. — *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **76**, 44, 1958.
- UMBREIT, W. W. — *J. Biol. Chem.*, **177**, 703, 1949.
- UMBREIT, W. W. — *J. Bact.*, **66**, 74, 1953.
- WEST, R. A., Jr. — *Immunology. Laboratory Exercises*. Burgess Publishing Co., Minnesota, 1951.
- WIGHT, K. y BURK, D. — *Antibiotics and Chemotherapy*, **1**, 379, 1951.
- WISSEMAN, C. L., Jr., SMADERL, J. E., HAHN, F. E., y HOPPS, H. E. — *J. Bact.*, **67**, 662, 1954.
- ZUAZO, R. — *Microbiología Esp.*, **11**, 149 y 351, 1958.