

TENTATIVAS DE INHIBICION DE LA SINTESIS DE ENTEROTOXINA ESTAFILOCÓCCICA POR PENICILINA Y ESTREPTOMICINA ⁽¹⁾

Luis G. COTILLO Z. ⁽²⁾

Se realizaron tentativas de inhibir la producción de las enterotoxinas estafilocóccicas por las cepas ATCC 13565, ATCC 14458, S 6 y S 100 con los antibióticos penicilina y estreptomycin. Los resultados obtenidos parecen demostrar que la penicilina no impide la formación de proteínas enterotóxicas, siendo que por otro lado la estreptomycin a partir de la dosis de 500 µg por ml de medio impide en casi todas las cepas la producción de enterotoxinas. Con la dosis de 1000 µg/ml no se pudo demostrar presencia de enterotoxina en ninguno de los cultivos realizados con las diversas cepas. Se indican las posibles explicaciones para estos resultados.

INTRODUÇÃO

Algunas cepas de *Staphylococcus* poseen la capacidad de sintetizar una toxina termo-resistente que al ser ingerida, provoca el apareamiento de cuadros de intoxicación alimenticia. En algunas oportunidades se han descrito casos en los cuales la elaboración de esta enterotoxina se realizó en el tracto intestinal.

Los efectos de la terapéutica antibiótica sobre las infecciones producidas por estafilococos han sido ampliamente divulgados, conociéndose también las transformaciones que sufren estos microorganismos al ser sometidos a la acción de estos agentes antibióticos (KLIENEBERGER-NOBEL ¹³, 1951; DIENES & SHARP ⁶ 1956; MARSTON ¹⁴, 1961).

Es también sabido que la zona de acción primaria de estos agentes antimicrobianos sobre las bacterias varia con los diversos antibióticos utilizados. Gene-

ralmente se acepta que la penicilina inhibe la síntesis de la pared celular y la estreptomycin, a pesar de no presentar alteraciones en la pared celular, incrementa su permeabilidad e inhibe la síntesis de las proteínas citoplasmáticas.

FRIEDMAN & WHITE ⁹ (1965) demostraron a través de la técnica de inmunofluorescencia la presencia de enterotoxina estafilocóccica asociada a la superficie de la célula bacteriana.

Sabiendo que la enterotoxina es una proteína soluble en agua, rica en lisina y resistente a la acción de la tripsina, HARMAN & GOODGAL ¹¹ (1959) sugirieron que las enterotoxinas presentaban todas las características de los constituyentes de la superficie celular bacteriana. Habiendo tomado contacto con las alteraciones ocasionadas por algunos antibióticos sobre los estafilococos (COTILLO ³, 1962) decidimos

Recebido para publicação em 27-10-1967.

- (1) Da Cadeira de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP.
(2) Da Cadeira de Microbiologia Aplicada da FHSP e da Cadeira de Microbiologia da Faculdade de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

investigar la posibilidad de inhibir la producción de enterotoxina por antibióticos que impidiesen la biosíntesis de pared celular (penicilina) o de inhibidores de la síntesis de proteínas citoplasmáticas (estreptomycin) para, de allí, tratar de obtener mayores informaciones sobre el verdadero local de formación de la enterotoxina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas — Las cepas productoras de enterotoxina, usadas en la presente investigación fueron la 13565, 14458 recibidas del ATCC y las cepas S 6 y S 100 gentilmente enviadas por el Prof Merlin S. Bergdoll, del Food Research Institute, University of Chicago. La cepa 13565 corresponde a la 196 E aislada por el Food Research Institute, University of Chicago, que produce la enterotoxina A. Esta cepa produce también gran cantidad de B hemolisina que puede interferir en los ensayos biológicos. La cepa 14458 es la inicialmente denominada 243 aislada de materias fecales de niños, en Washington y es productora de enterotoxina B. La cepa S 6 es formadora de enterotoxinas A y B y la S 100 sintetiza enterotoxina A.

Sueros — Los sueros hiperinmunes que sirvieron para demostrar la presencia de las enterotoxinas A y B fueron también gentilmente remitidos por el Prof. Merlin S. Bergdoll. Se usaron en la prueba de difusión en gel.

Producción de las enterotoxinas — Se siguieron los métodos recomendados por CASMAN & BENNETT² (1963) y por HALLANDER¹⁰ (1965). El método de Casman y Bennett de producción de enterotoxina estafilocócica A consiste en el uso de frascos de Roux conteniendo 100 ml de "Bacto-Brain Heart Infusion", colocando, dentro de los Roux, bolsas de celofán y dentro de éstas 0,5 ml de la suspensión estafilocócica preparada a partir de un cultivo en agar inclinado de 18 a 24 horas, debiendo contener la suspensión aproxi-

madamente 300 millones de microorganismos por ml.

El inóculo se distribuye sobre la superficie interna del celofán, en contacto con el medio de cultivo y a seguir, se infla el saco de celofán y se coloca la botella de Roux en posición inclinada, cuidadosamente. La incubación es realizada por 72 horas a 35-37°C. El cultivo del saco de celofán es extraído con una pipeta de 1 ml, adicionando 0,5 ml de salina a 0,85% esteril

Para evitar la dilución de la enterotoxina producida el volumen final no debe ser mayor de 1 ml. Los estafilococos son eliminados por centrifugación a 2.500 — 3.000 RPM y el sobrenadante, conteniendo la enterotoxina, es separado y guardado en la refrigeradora entre 4° — 6° C.

El método de Hallander indicado para la producción de grandes cantidades de enterotoxina B y otras toxinas estafilocócicas en medio sólido, utiliza el medio descrito por CASMAN¹ (1958) modificado por Bergdoll con la adición de 2% de hidrolizado de proteína en placa de Petri de 14 cms de diámetro, con la superficie del medio cubierto por celofán e incubando por 24 horas a 37°C. La inoculación se hace con 5 ml de una suspensión bacteriana en tampón de fosfato con una densidad de 0,6 de coeficiente de extinción medido en colorímetro Beckman Mod. C con filtro verde.

Determinación de la presencia de enterotoxinas — Se han descrito numerosos métodos para la identificación de la enterotoxina estafilocócica, DACK et alii⁵ (1930) utilizan voluntarios humanos. DOLMAN et alii⁷ (1936) proponen el empleo de gatitos jóvenes, método posteriormente perfeccionado por HAMMON¹² (1941). Otros investigadores describen el uso de macacos rhesus (*Macaca mulatta*) así como de arañas.

Muchos otros animales se han usado en las tentativas de conseguir un medio más fácil, mas rápido y mas seguro para

evidenciar la enterotoxina estafilocócica. Entre estos podemos mencionar sapos, ratones blancos, ratones silvestres, ratas cobayas, conejos, perritos, canarios y lechones.

Sin embargo, el uso de animales siempre trae consigo el problema de la interferencia de las reacciones biológicas propias de cada individuo con las ocasionadas por el agente que se esta probando.

Es por eso que, continuando con la búsqueda de un mejor método para esta finalidad, CASMAN¹ (1958) describe una técnica de difusión en gel para la identificación serológica de las enterotoxinas, que simplifica los métodos de laboratorio hasta entonces utilizados y que permite diferenciar las diversas enterotoxinas hasta hoy reconocidas

Así, la determinación serológica de la presencia de enterotoxina producidas por las cepas de estafilococo en el presente estudio se hizo a través de la reacción de Wadsworth, modificada por CROWLE⁴ (1958), conforme descripción de CASMAN¹ (1958). La confirmación biológica se hizo inoculando el material en estudio en gatos pequeños por vía intravenosa según el método descrito por Hammon. Se tuvo cuidado de no emplear gatos mayores de tres meses.

Inhibición de la síntesis de enterotoxinas — Con la finalidad de conseguir la

inhibición de la síntesis de enterotoxinas se adicionó a los medios utilizados para la producción de estas toxinas, penicilina a las concentraciones de 100 U, 200 U, 400 U, 600 U y 800 U por ml de medio. La estreptomina fué utilizada a las concentraciones de 10 µg, 50 µg, 100 µg, 500 µg, 1000 µg, 2000 µg y 4000 µg por ml de medio de cultivo.

RESULTADOS

En la fase inicial de este trabajo, con la finalidad de obtener buenas cantidades de enterotoxinas se comparó las técnicas recomendadas por CASMAN & BENNETT² (1963) y por HALLANDER¹⁰ (1965). Para la demostración de la inhibición de la síntesis de enterotoxinas se prefirió usar el método de los sacos de celofán de Casman y Bennett, adicionando al medio la cantidad requerida de penicilina o estreptomina. La inculación fué siempre realizada a la temperatura de 37°C por 48 y 72 horas sin agitación.

La concordancia entre las técnicas serológica y biológica (ésta realizada en gatos) fué total.

En la Tabla 1 presentamos los resultados obtenidos en la tentativa de inhibir la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas empleando penicilina.

TABLA 1

Inhibición de la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas por la penicilina

Concentraciones de penicilina	Cepas tiempo de incubación	ATCC 15565		ATCC 14458		S 6		S 100	
		48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
100 U/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
200 U/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
400 U/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
600 U/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
800 U/ml		+	+	+	+	+	+	+	+

+ = presencia de enterotoxinas A o B

A pesar de la presencia de formas pleomórficas y protoplastos en todas las concentraciones de penicilina superior a 200 unidades por ml de medio de cultivo, no fué posible constatar ausencia de enterotoxina A o B en las cepas empleadas en esta investigación. Todas ellas presentaban a las 48 horas reacción de inmunodifusión en gel positiva cuando colocadas frente a los sueros específicos.

En la Tabla 2 estan consignados los resultados obtenidos al emplear la estreptomina en las tentativas de inhibir la síntesis de las enterotoxinas estafilocócicas. La estreptomina ocasiona un pleomorfismo mas acentuado en los estafilococos sometidos a su acción que la que se presenta cuando se utiliza la penicilina.

Como se puede ver en la Tabla 2, las pequeñas concentraciones de estreptomina (10-50-100 $\mu\text{g/ml}$) no impiden la síntesis de enterotoxinas. Sin embargo, las concentraciones mas altas ya no permiten la formación de las proteínas enterotóxicas de estos estafilococos. Esta inhibición es completa a partir de la concentración

de 1000 μg de estreptomina por ml de medio de cultivo.

DISCUSION

Cuando habíamos terminado la parte experimental de este trabajo tuvimos noticia de dos notas preliminares publicadas en los Estados Unidos referentes a inhibición de la formación de enterotoxina estafilocócica B en cultivos en caldo (FRIEDMAN⁸, 1966) y a la inhibición de la elaboración de proteínas estafilocócicas enterotóxicas por la estreptomina (ROSENWALD & LINCOLN¹⁵, 1966).

Estos dos trabajos traen las observaciones de la inhibición de síntesis de enterotoxina ocasionada por la estreptomina.

En nuestro trabajo, también la estreptomina impidió la formación de proteína enterotóxica como puede ser observado en la Tabla 2, lo mismo no sucediendo cuando usamos la penicilina con esta finalidad.

Desde que la penicilina no impide la formación de enterotoxina parece que esta no está relacionada con la pared celular a pesar de las observaciones de FRIEDMAN & WHITE⁹ (1965).

TABLA 2

Inhibición de la síntesis de enterotoxinas estafilocócicas por la estreptomina

Concentraciones de estdep-micina	Cepas tiempo de incubación	ATCC 13565		ATCC 14458		S 6		S 100	
		48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
10 g/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
50 g/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
100 g/ml		+	+	+	+	+	+	+	+
500 g/ml		-	-	-	+	+	+	-	+
1.000 g/ml		-	-	-	-	-	-	-	-
2.000 g/ml		-	-	-	-	-	-	-	-
4.000 g/ml		-	-	-	-	-	-	-	-

+ = presencia de enterotoxinas A o B
 - = ausencia de enterotoxinas A o B

Por otra parte, la acción de la estreptomycin al impedir la producción de enterotoxina parecería indicar que esta se procesa a nivel citoplasmático, de donde sería expelida para el exterior y al pasar a través de la pared celular la contaminaría, ofreciendo así el aspecto de proteína enterotóxica ligada a la pared celular como fué observado por FRIEDMAN & WHITE⁸ (1965).

CONCLUSIOES

La penicilina usada en diversas concentraciones provoca el apareamiento de formas pleomórficas y protoplastos en cultivos de estafilococos sin impedir la síntesis de las proteínas enterotóxicas.

La estreptomycin a partir de 500 μg por ml de medio de cultivo, impide totalmente la formación de las proteínas enterotóxicas en casi todas las cepas utilizadas.

Parece que la síntesis de la enterotoxina estafilocócica se procesa a nivel del citoplasma celular.

SUMMARY

An attempt to inhibit Staphylococci enterotoxin production of strains ATCC 13565, ATCC 14458, S6 and S100 was made with penicillin and streptomycin. Results suggest that penicillin does not prevent enterotoxic protein synthesis, while streptomycin, in doses of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ prevent it in almost all strains. With doses of 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ the presence of enterotoxin was not detected in any of the strains under study. Possible explanations for such results are suggested in this paper.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. CASMAN, E. P. — Serologic studies of staphylococcal enterotoxin. *Publ. Hlth Repts.*, Wash., 73(7):599-609, July 1958.

2. CASMAN, E. P. & BENNETT, R. W. — Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A. *J. Bact.*, 86(1):18-23, July 1963.
3. COTILLO Z., L. — Las formas L. Su interpretación a la luz de la microbiología moderna. Lima, 1962. (Tesis de Bachiller — Facultad de Farmacia y Bioquímica — Universidad de San Marcos de Lima-Perú).
4. CROWLE, A. S. — A simplified micro double diffusion agar precipitation technique. *J. Lab. clin. Med.*, 52(5):784-787, Nov. 1958.
5. DACK et alii — *Prevent med.*, 4:167-75, 1930. Apud DACK, G. M. *Food poisoning*. 3 th ed. Chicago, Univ. Chicago Press, 1956.
6. DIENES, L. & SHARP, J. — The role of high electrolyte concentration in the production and growth of L forms of bacteria. *J. Bact.*, 71:208-213, 1956.
7. DOLMAN, C. E. et alii — *Canadian publ. Hlth J.*, 27:489, 1963. Apud HAMMON, W. McD¹².
8. FRIEDMAN, M. E. — Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures. *J. Bact.*, 92(1):277-278, July 1966.
9. FRIEDMAN, M. E. & WHITE, J. D. — Immunofluorescent demonstration of cell associated staphylococcal enterotoxin B. *J. Bact.*, 89(4):1153, Apr. 1965.
10. HALLANDER, H. O. — Production of large quantities of enterotoxin B and other staphylococcal toxins on solid media. *Acta path. microbiol. scand.*, 63(2):299-305, 1965.
11. HARTMAN & GOODGAL — *Rev. Microbiol.*, 13:463, 1959. Apud FRIEDMAN & WHITE⁸.
12. HAMMON, W. McD. — Staphylococcus enterotoxin an improved cat test, chemical and immunological studies. *Amer. J. publ. Hlth*, 31(11):1191-1198, Nov. 1941.
13. KLIENEBERGER-NOBEL, E. — Filterable forms of bacteria. *Bact. Rev.*, 15(2):77-103, June 1951.
14. MARSTON, J. — Observation on L forms of staphylococci. *J. infect. Dis.*, 108:75-84, 1961.
15. ROSENWALD, A. J. & LINCOLN, R. E. — Streptomycin inhibition of elaboration of staphylococcal enterotoxic protein. *J. Bact.*, 92(1):279-280, July 1966.