

UNIVERSIDAD IBERO AMERICANA

INCORPORADA A LA U. N. A. M.

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

ESTUDIO DE SEPTICEMIAS
ESTAFILOCOCCICAS EN CONEJOS

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

AIDA SOCORRO VAZQUEZ GONZALEZ

MEXICO, D. F. 1959



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mis queridos padres

Lic. Rafael Vázquez Muñoz y

Rosario González de Vázquez

con todo mi cariño, devoción y eterna gratitud.

A mis hermanitas

Silvia de los Angeles y

Ma. Cristina Vázquez González.

A mis queridos abuelitos

Angelita Suárez de González y

Eusebio González Itarra.

A mi tío

*Sr. Lic. Eliseo González Suárez,
Secretario General de Gobierno del Estado
de Colima, a quien debo parte de la
realización de este trabajo.*

*A todos mis tíos y primos,
que siempre me alentaron para llevar
a feliz término mi carrera.*

A mis maestros, compañeros y amigos.

*Al Sr. Dn. Luis M. Vereca,
Director de la Facultad de Química Berzelius,
con mi gratitud y respeto.*

*Al Sr. Dr. Dn. Jesus Kumate,
Jefe del Laboratorio de Inmuno - Química
del Hospital Infantil de esta Capital,
con mi agradecimiento por la inestimable
ayuda que me brindó al aceptar que bajo
su dirección realizara el presente trabajo.*

*Al Sr. Prof. Dn. Julio Carrillo y
Sritas. Q. F. B. Antonieta Flores
y Virginia Vázquez, agradeciéndoles
su valiosa cooperación.*

SUMARIO:

- I.- INTRODUCCION
- II.- MATERIAL Y METODOS
- III.- RESULTADOS
- IV.- DISCUSION
- V.- RESUMEN Y CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA

I.- INTRODUCCION

Desde 1932, Gordon y Cooper (1) describieron la presencia en suspensiones de estafilococos inactivados, de una actividad enzimática que hidroliza el beta-glicero--fosfato. Paget y Vittu (2) confirmaron el hallazgo y estudiaron su cinética; pero fué hasta 1951 cuando Barber y colaboradores (3,4) correlacionaron su presencia con el poder patógeno (prueba de la plasmocoagulasa) y en la actualidad se toma la existencia de fosfatasa en los estafilococos como un criterio más en el estudio rutinario de patogenicidad al lado de coagulasa, fermentación del manitol, producción de exotoxinas, etc. (5,6,7).

El reporte de Hansen (8) acerca de la presencia de esa enzima en colecciones purulentas y la corriente diagnóstica iniciada en 1954, de identificar componentes intracelulares en lesiones necróticas (9), nos hizo considerar un estudio de las alteraciones de fosfatasa ácida en septicemias experimentales controladas por *Micrococcus pyogenes* patógeno.

Durante el desarrollo del trabajo, Sugiyama (10) describió la acción apirásica de preparaciones parcialmente purificadas de enterotoxina estafilocócica, por lo que se agregó al trabajo inicial, el estudio de las adenosintrifosfatasas (ATP asas).

II.- MATERIAL Y METODOS

Se usaron conejos aparentemente sanos que no habían sido sometidos a ninguna manipulación de laboratorio previa y alimentados con forrajes ordinarios.

Micrococcus pyogenes var. *aureus* con reacciones positivas a: plasmocoagulasa, manitol y hemolisina en cultivos de caldo y pases diarios; se sembró en placa de -- agar de donde se recogió mediante suero fisiológico después de 20 horas a 37° C.

A un lote de conejos se inoculó por vía intraperitoneal o intraperitoneal y endovenoso aproximadamente ---- 2×10^9 gérmenes (calculados por cuentas en placa una sola vez) en las otras veces mediante determinación de su densidad óptica en espectrofotómetro.

En esos animales se habían determinado previamente sus niveles normales de fosfatasas ácida y alcalina, adenosin-trifosfatasa ácida y alcalina, mismas que se estudiaron en los 10 días siguientes a la inoculación. En todos los casos se hicieron autopsias de los animales y en los órganos en los que hubo lesiones macroscópicas, se efectuó estudio patológico; simultáneamente, con los estudios bioquímicos se determinaron niveles periféricos de leucocitos y hemocultivos.

A otro lote de conejos se ligó la arteria renal izquierda y una rama de la esplénica bajo condiciones asép

ticas y anestesia de Fenobarbital intraperitoneal; en --- ellos se efectuaron los mismos estudios de fosfatasa ácida que en los inoculados.

Los leucocitos de conejo se obtuvieron por el método de Hann(11) con la modificación de usar suero fisiológico isotónico.

Las fosfatasas ácidas y alcalinas se determinaron por la técnica de Bessey, Lowry y Brock(12) con las adaptaciones propuestas por la casa Sigma, Chemical Co.(13); las adenosin-trifosfatasas según Murayama(14) adaptada para suero, las determinaciones de fósforo inorgánico según la técnica de Fiske-Subarow (15).

El pH óptimo de la fosfatasa ácida mediante amortiguadores de citrato (16).

Determinación de fosfatasa ácida en suero usando como sustrato "Sigma 104 Phosphatase Substrate"

1.- Pipetear 1cc de sustrato amortiguador ácido en cada uno de los tubos de espectrofotómetro (o en tubos de ensayo de 16 x 150 mm.) ponerlos en BM a temperatura --- constante de 38° C esperar 5 minutos (equilibrio).

1'- Agregar 0.05 cc. de formol al 20%.

2.- Pipetear exactamente 0.2cc de H₂O en un tubo -- (blanco) y 0.2cc. de suero en otro tubo. Anotar exactamente el tiempo. Colocar nuevamente ambos tubos en BM a 38°C

inmediatamente.

3.- Exactamente 30 minutos después de poner el suero agregar 4cc de NaOH 0.1 N a cada tubo (parar actividad) - mezclar con movimiento lateral (si se hizo en tubos de ensayo, se pasa a tubos de espectrofotómetro).

4.- Poner el espectrofotómetro a 100% transmisión a 410 m μ usando el blanco como referencia; leer la densidad óptica del problema.

5.- Para corregir la densidad óptica debida al color del suero agréguese 5cc de NaOH 0.1 N a 0.2cc de suero y determinar la densidad óptica de esta muestra usando NaOH 0.1 N como referencia.

6.- Restar (5) de (4), ésta es la densidad óptica corregida.

Determinación de fosfatasa alcalina en suero usando como sustrato "Sigma 104 Phosphatase Substrate"

1.- Pipetear 1cc de sustrato amortiguador alcalino dentro de dos tubos de espectrofotómetro (o tubos de 16x150 mm.) colocarlos en BM a 38°C, esperar 5 minutos (equilibrio).

2.- Pipetear exactamente 0.1cc de H₂O en uno de los tubos (blanco) y 0.1cc de suero en el otro tubo. Anotar el tiempo exactamente; colocarlos nuevamente en BM a 38°C inmediatamente.

- 3.- Exactamente 30 minutos después de agregar el suero, agregar 10cc de NaOH 0.02 N a cada tubo (parar actividad) mezclar por inversión (tapones de hule limpios). Si se trabaja con tubos de ensayo, pasar a tubos de espectrofotómetro.
- 4.- Poner el espectrofotómetro a 100% transmisión usando el blanco como referencia a 410 mμ. Leer la densidad óptica de la muestra de suero.
- 5.- Agregar 0.1cc (2 gotas) de HCl conc. en cada tubo ; mezclar, (quitar el color debido al p-nitrofenol).
- 6.- Leer la densidad óptica de la muestra sérica (tubo de referencia a 100% de transmisión). Esta es la densidad óptica del suero mismo.
- 7.- Restar (6) de (4), ésta es la densidad óptica corregida.

REACTIVOS

A.- Solución de amortiguador alcalino (solución stock -- N° 104-5).

Disolver en un matraz volumétrico:

Glicina(ac. amino-acético)...	7.50 (0.1 mol.)
MgCl ₂ anhidro	0.095gm.(0.001mol) o-
	0.203gm.MgCl ₂ · 6H ₂ O
H ₂ O	aprox. 750 cc.
NaOH 1 N	85 ml. (0.085 mol)

Diluir a 1 litro pH 10.5 .Agregar unas gotas de cloro --
 formo como preservativo. Para mayor seguridad ajustar pH
 con amortiguador borato de Na (Solución Stock Nº 104-7)
 B.- Solución de amortiguador ácido (Solución Stock Nº --
 104-4).

Disolver en un matraz volumétrico de 1 litro :

Acido Cítrico(1 H ₂ O)	18.907gm (0.09 mol)
NaOH 1N	180.Ccc (0.18 mol)
HCl 0.1N	100.Ccc (0.01 mol)

Diluir a 1000 con H₂O,mezclar, pH 4.8 Agregar unas gotas
 de cloroformo como preservativo.

C.- Solución substrato Stock.

Disolver:

"Sigma 104 Phosphatase Substrate"	
(para nitrofenil fosfato disódico)..	0.1gm.
H ₂ O	25cc.

Nota: El Sigma 104 Phosphatase Substrate debe ser prac--
 ticamente incoloro antes de disolver, guárdese congelado
 o refrigerado.

D.- Substrato amortiguador alcalino.

Mezclar partes iguales de:

- Solución amortiguador alcalino (A)
- Solución substrato Stock (C)

El pH debe ser entre 10.3 - 10.4 ajustar si es nesesario

2.- 2.0 ml de agua destilada

3.- 0.25 ml de molibdato de amonio

4.- 0.1 ml de reactivo amino-naftol-sulfónico

Se mezcla varias veces y se lee en el espectrofotómetro-Coleman Jr. 6-B a 680 μ al mismo tiempo con:

1.- 0.5 ml de solución tipo de fosfato (0.016 mg. de --
P /ml)

2.- 2.0 ml de agua destilada

3.- 0.25 ml de molibdato de amonio

4.- 0.1 ml de reactivo amino-naftol-sulfónico

REACTIVOS

I.- ATF (Adenosin-trifosfato) 0.013 M

ATF 0.384 gm de la sal -
sódica. $3H_2O$

Se afora a 50 ml con H_2O destilada (se guardó en refri--
gerador).

2.- $MgCl_2$ 0.04 M

$MgCl_2$ 0.1905 gm

Se afora a 50 ml. con H_2O destilada (se guardó en refri--
gerador).

3.- TRIS pH 8.9 (Tri-hidroximetil amino-metano)

Solución 0.2 M de TRIS (24.2 gm en 1000 ml.)

TRIS 0.2 M 50 ml.

HCl 0.2 M 6.55 ml

Se diluyó a 200 con H₂O destilada (se guardó en refrigerador).

4.- Amortiguador pH 4.8

Solución 0.2 M de ácido acético (11.55 ml. en 1000 ml

Solución de acetato de Na 0.2 M (16.4 gr. de C₂H₃O₂Na ó 27.2 gr. de C₂H₃O₂Na · 3 H₂O en 1000 ml.).

Acido Acético 0.2 M 40 cc.

Acetato de sodio 0.2 M 60 cc.

Se diluyó a 200 con agua destilada (se guardó en el refrigerador).

5.- Acido Tricloro-acético al 50 %

Acido Tricloro-acético cristalizado.. 50 gr.

Se diluyó a 100 con agua destilada.

6.- Solución de molibdato de amonio

Molibdato amónico Q.P. 25gr. en 200 ml
de H₂O destilada

Acido Sulfúrico 10 N 300 ml

Se aforó a 1 litro con agua destilada.

7.- Reactivo de Amino-naftol-sulfónico

Solución de bisulfito sódico al 15 %.. 195 ml.

Solución de sulfito sódico al 20 %..... 5 ml.

Acido amino-naftol-sulfónico 0.5gr.

III.- RESULTADOS

Los resultados obtenidos con la inoculación de estafilococo patógeno respecto a fosfatasa ácida y alcalina y ATPasas ácida y alcalina se presentan en forma gráfica en las figuras I, II, III y IV; los promedios correspondientes en los períodos escogidos durante el período post-inoculación están representados en las tablas V y VI.

Las variaciones en la actividad fosfatásica ácida de los conejos con ligadura renal unilateral están representadas en la tabla VII.

En 13 de los 19 casos inoculados y estudiados para fosfatasa, se encontraron hemocultivos positivos con elevaciones de los niveles de leucocitos y lesiones orgánicas que se identificaron como abscesos, en el resto la descripción histológica correspondió a infartos isquémicos y trombos bacterianos en riñón y degeneración de células hepáticas.

La actividad enzimática de fosfatasa ácida de estafilococo, de suero de conejo inoculado con fosfatasa sérica aumentada, de leucocitos de conejo y de homogenado de riñón de conejo, están representadas en la figura VIII.

FOSFATASA
ACIDA

% de aumento

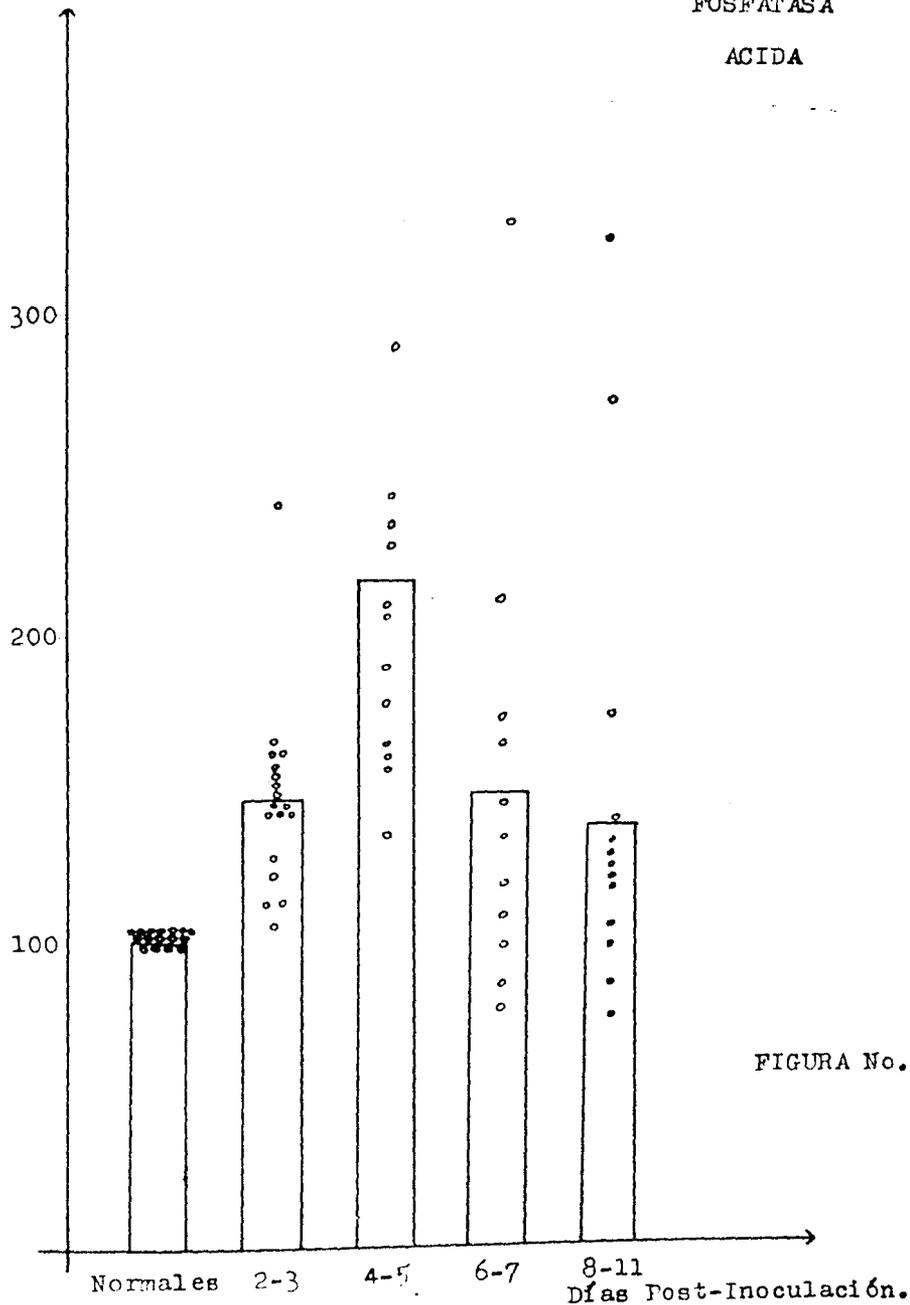


FIGURA No. I

% de aumento

FOSFATASA

ALCALINA.

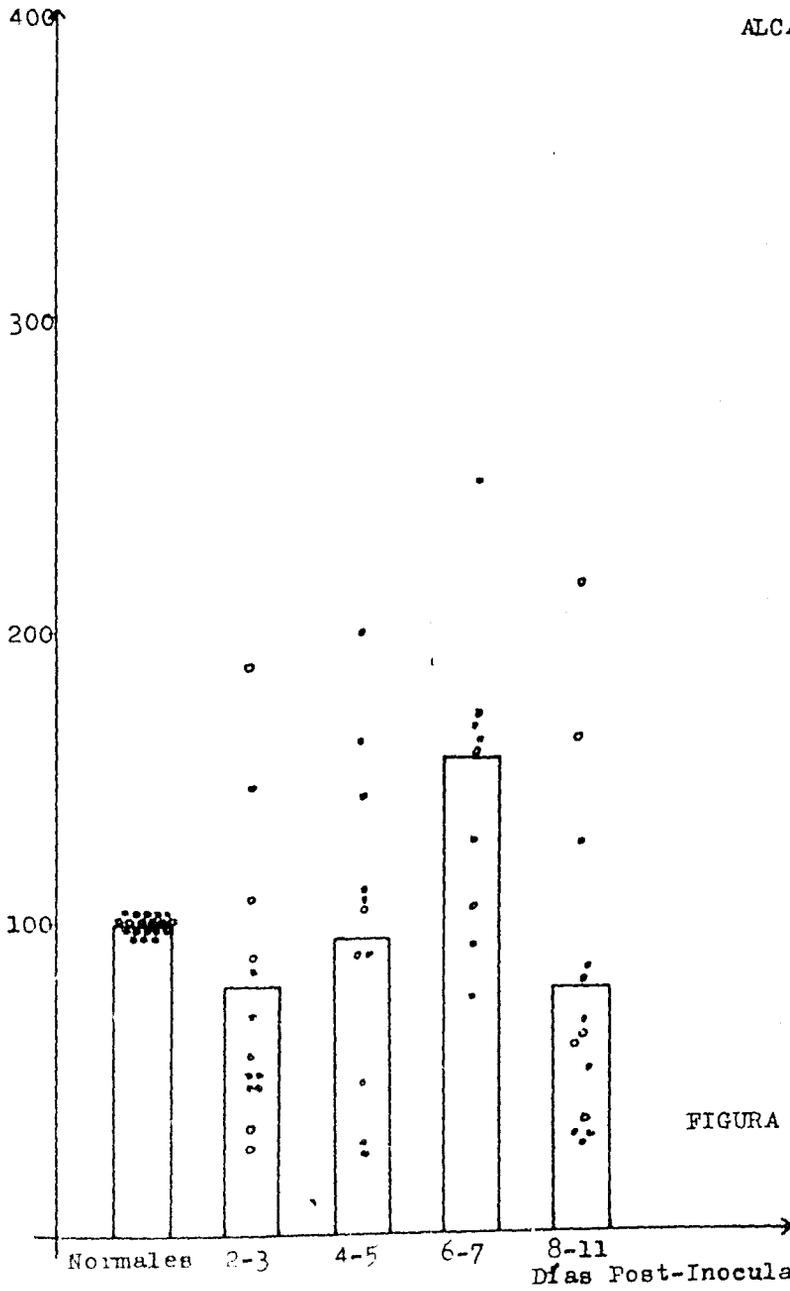


FIGURA No. II

Días Post-Inoculación.

% de aumento.

ADENOSINTRIFOSFATASA

"ACIDA"

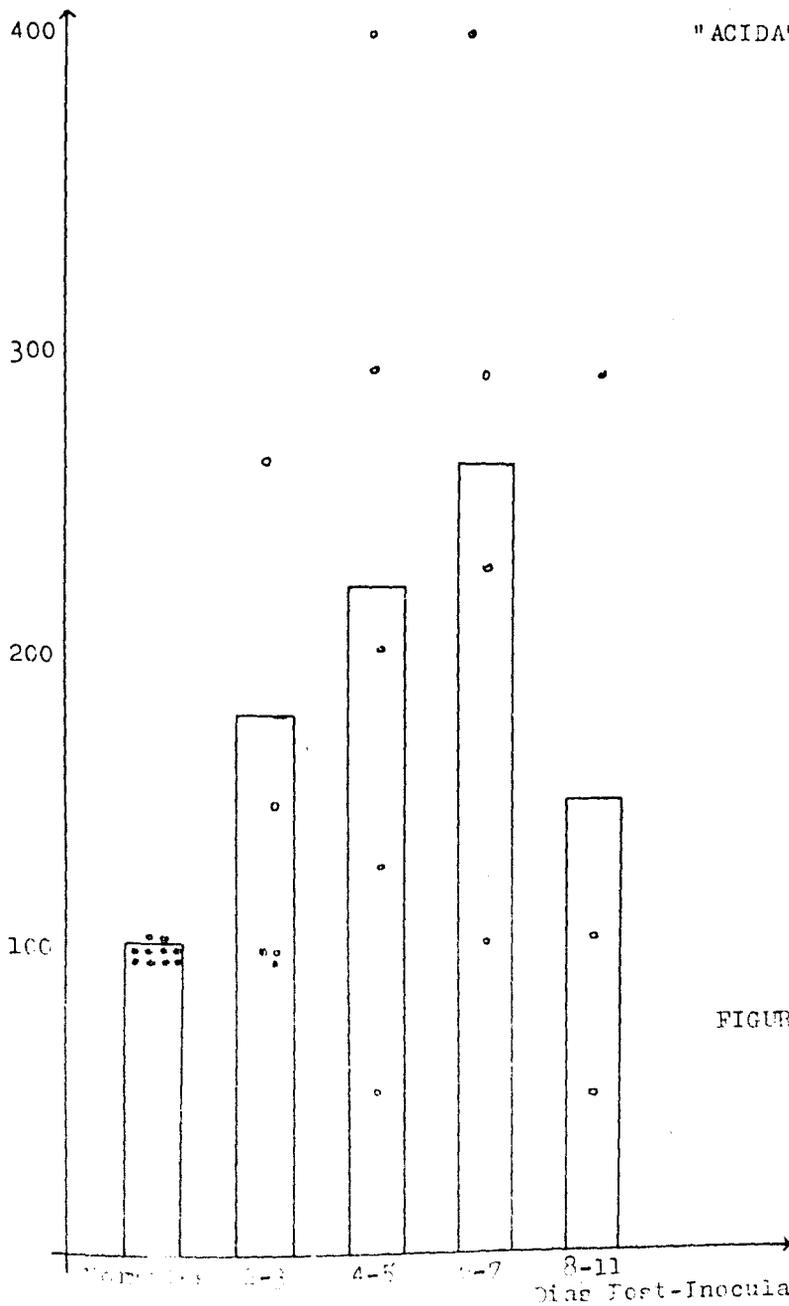
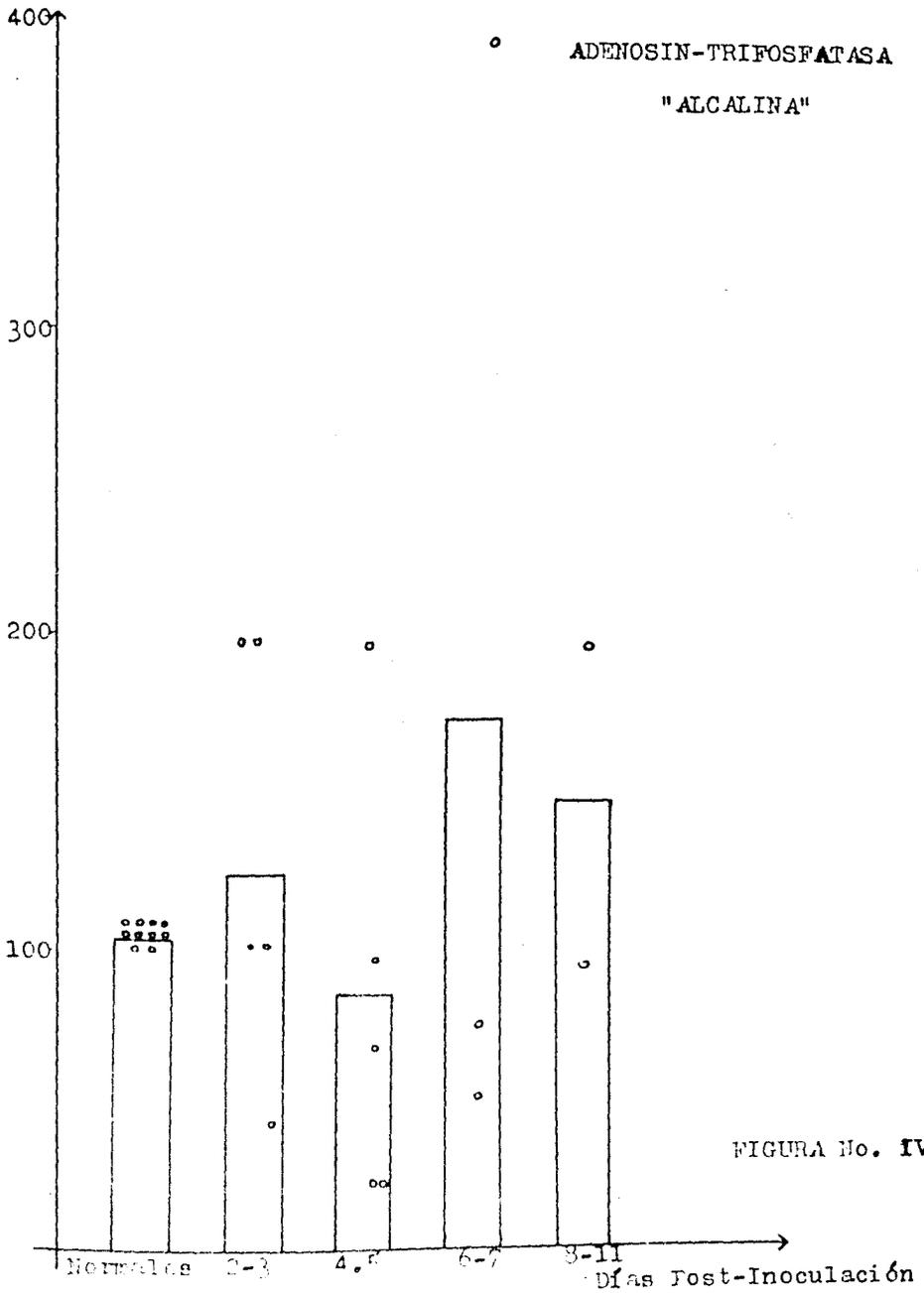


FIGURA No. III

Días Post-Inoculación.

% de aumento.



FOSFATASAS	NORMAL	DIAS POST-INOCULACION			
		2-3	4-5	6-7	8-11
ACIDA	100(19)	148(18)	220(13)	151(11)	144(13)
ALCALINA	100(19)	82 (13)	98 (11)	161(9)	82 (13)

() = No de casos

TABLA No V

ADENOSIN TRI- FOSFATASAS	NORMAL	DIAS POST-INOCULACION			
		2-3	4-5	6-7	8-11
ACIDA	100(10)	178(6)	216(5)	258(4)	150(3)
ALCALINA	100(10)	124(5)	83 (5)	175(3)	150(2)

() = No de casos

TARLA No VI

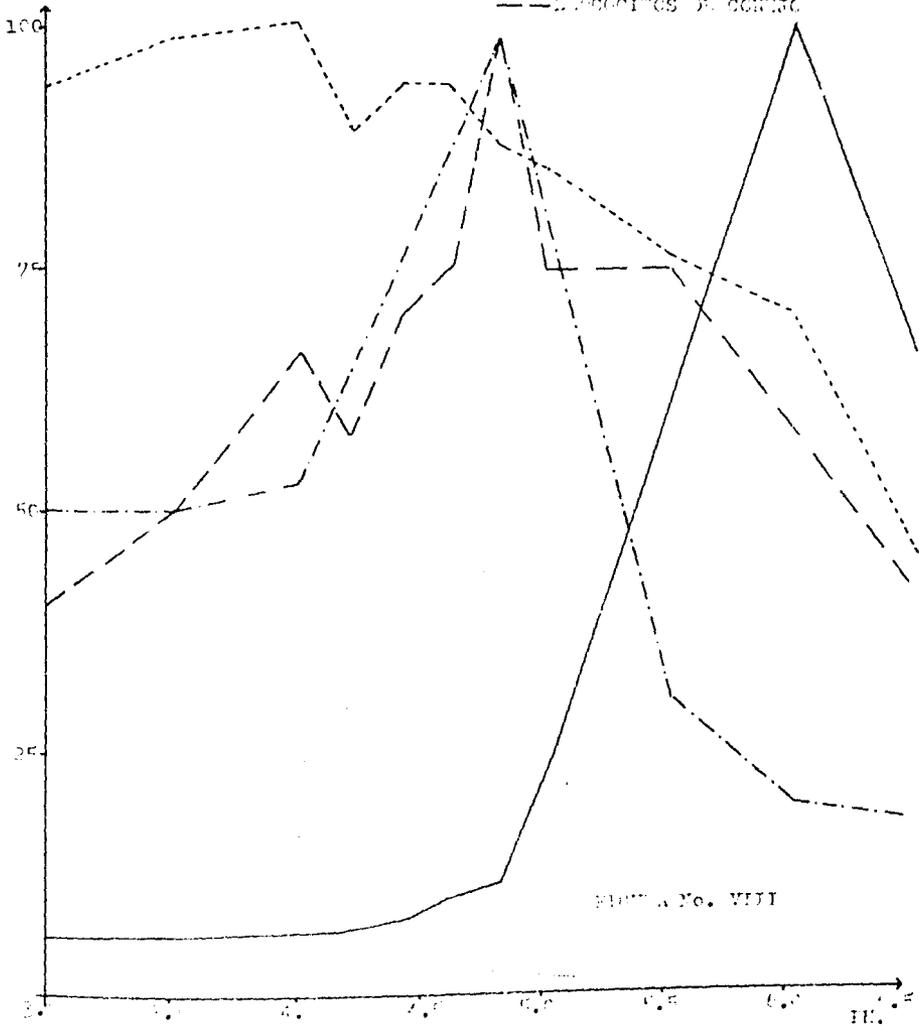
FOSFATASA	NORMAL	DIAS DESPUES DE LIGAR LA ARTERIA RENAL		
		1º	4-6º	8-9º
ACIDA	100(9)	81(4)	119(5)	106(4)

() = No de casos

TARLA No VII

Actividad
fisiológica.

----- MANEJO DE TIEMPO DE COMBIO
 ——— ESTERILIZACION
 - - - - SIEMBRA DE COMBIO INDUSTRIAL
 - - - - LIMPIEZAS DE COMBIO



GRUPO No. VIII

IV.- DISCUSSION

Resulta evidente que la inoculación de estafilocos patógenos en el conejo por vía intraperitoneal o endovenosa, se acompaña en forma reproducible, de un aumento de la actividad en fosfatasa ácida, sostenido cuando el animal muere en plena septicemia y que tiende a disminuir cuando resiste esa agresión y adopta un curso crónico; -- las elevaciones muestran dispersión cuando se les agrupan en períodos especiales para presentar promedios pero el análisis individual de cada caso muestra que hay aumento en alguna de las muestras recogidas en los primeros 11 -- días post-inoculación vgr. el caso representativo que se ilustra en la figura IX.

En 57 determinaciones practicadas, solo en 5 ocasiones hubo valores inferiores al control normal y de esos, 4 correspondieron a los últimos 3 días (cuando los niveles tienden a disminuir).

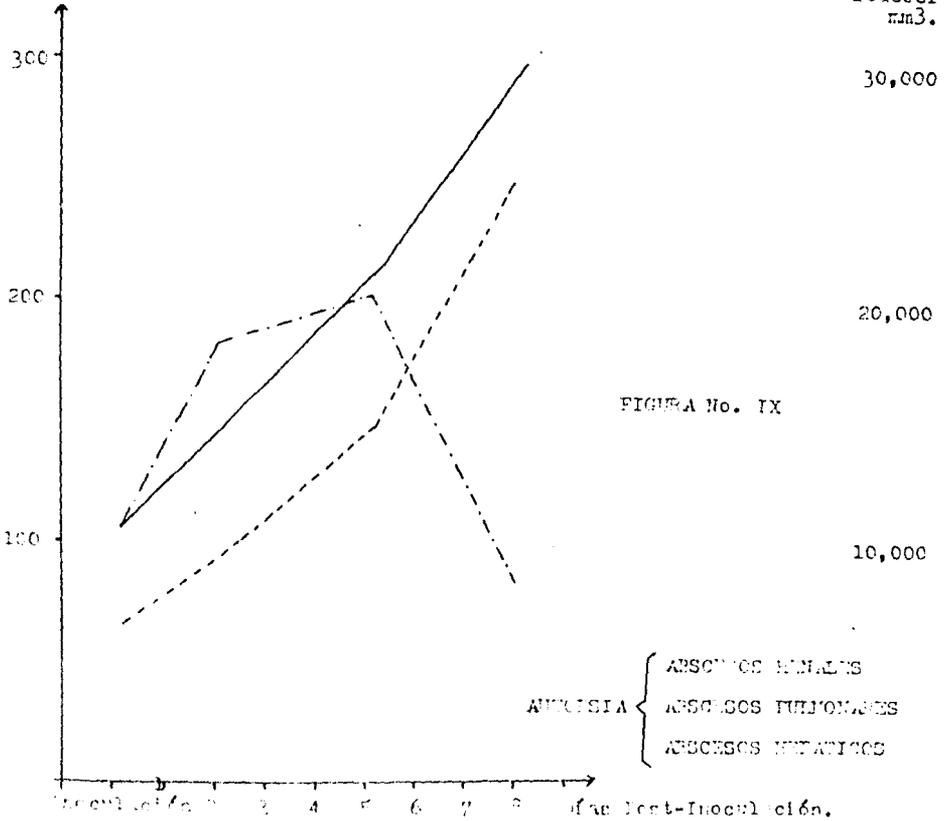
No ocurre lo mismo con la fracción alcalina con la que se observa tendencia a valores subnormales en la mayoría de los casos y cuando hay un aumento sobre los niveles normales, éste es moderado en relación a los observados con la ácida. El estudio de correlación muestra que no hay ninguna asociación entre ambas y que las causas que motivan sus alteraciones no tienen nada en común.

En el caso de las ATPasas se tiene un aumento de am-

% de Aumento
en fosfatasa.

— ACIDA
- - - - ALCALINA
- - - - LEUCOCITOS

leucocitos
mm³.



bas mayor en la fracción ácida que en la alcalina ; la magnitud de esa elevación es menor que en el caso de la fosfatasa ácida.

Por lo descrito resulta evidente que el hallazgo -- reproducible es el aumento de las fracciones ácidas en fosfatasas y ATFasas consecutivo a la inoculación parenteral de estafilococos patógenos, sin relación con presencia de hemocultivo positivo, leucocitosis o desarrollo de abscesos organicos caracteristicos.

La explicación de esos aumentos puede enfocarse des de varios ángulos:

a) Salida de fosfatasas por lesión orgánica de --- aquellas estructuras que la poseen en abundancia (riñón, hígado, bazo, pancreas, etc.).

b) Liberación de exotoxinas a la circulación sistémica y contribución enzimática dada su naturaleza catalítica.

c) Contribución leucocitaria ya sea por lisis in -- situ (órganos afectados) y salida posterior a la circula ción; leucolisis en la circulación o por " stress " inespecífico.

Las experiencias de ligadura de una arteria renal -- con la consiguiente isquemia global del órgano demues -- tran que la simple lesión no es capaz de inducir eleva --

ciones de las fosfatasas ácidas en la proporción observada en el caso de inoculación estafilocócica o que el "stress" que supone el manejo operatorio y el trauma quirúrgico no son suficientes; las elevaciones encontradas en algunos casos caen dentro de lo que puede ser error experimental y reproducibilidad del método analítico. Por otra parte los estudios de Notario y Bernasconi (17) relatan que la administración de Cortizona (10Mgs/día) ó ACTH (1Mg/día) a cobayos producen elevaciones de la actividad fosfatásica ácida de solo 10% al cabo de 10 días y 50-60% al final de 1 mes.

La aportación leucocitaria no puede invocarse en base a lisis o liberación en la circulación ya que la leucocitocis no se presentó de manera uniforme; sin embargo si se acepta que la infiltración de polimorfonucleares en las areas donde se localicen inicialmente los germen (respuesta inflamatoria) se sigue de una destrucción de los mismos, es facil concebir que pueda haber escapes a la circulación que se traduzcan por las elevaciones encontradas en ambas fosfatasas; los estudios de Valentine y Beck (18,19) son sugestivos de que sea factible tal explicación.

El análisis de pH último de la actividad fosfatásica ácida (figura VIII) muestra que está en 4.8 en tanto-

que la de los estafilococos se desvia hacia 6 (tal como lo reporta Barnes (20) en tanto que la suspensión de leucocitos muestra un máximo en 4.8; el homogenado de riñón de conejo muestra un máximo en 4.

Queda por explorar si los gérmenes "per se" o las toxinas puedan actuar como activadores de las fosfatasas naturales del suero así como las alteraciones enzimáticas en el caso de inoculaciones con estafilococos coagulasa negativa (productores débiles de fosfatasas).

La importancia práctica de estos estudios radica en su posible aplicación clínica para el diagnóstico y criterio evolutivo de septicemias por estafilococo ya que la fosfatasa ácida hasta ahora no tiene aplicación en el campo pediátrico, una elevación o alteración franca de sus niveles sería un hallazgo poco equívoco y de fácil interpretación.

V.- RESUMEN Y
CONCLUSIONES

Se estudiaron las variaciones en niveles fosfatá --
sicos y adenosintrifosfatásicos (fracciones ácida y al-
calina) de conejos inoculados por vía intraperitoneal y
endovenosa de *Micrococcus pyogenes* var. *aureus* (coagula-
sa positiva); se encontraron elevaciones de aproximada-
mente el doble en las fracciones ácidas de ambas enzimas
y elevaciones muy discretas (no significativas en las co-
rrespondientes alcalinas); dichas elevaciones se presen-
taron en forma reproducible independientemente del desa-
rrollo de abscesos, leucocitosis o hemocultivos positi-
vos.

Se trata de explicar el mecanismo de tales aumentos
y se excluye el que se deba a lesión orgánica que libere
fosfatasas a la circulación; se sugiere la infiltración-
y destrucción de leucocitos en las lesiones o en los ab-
scesos con fuga posterior a la sangre, en unión de un pH
óptimo de las fosfatasas leucocitarias pueda ser una de-
las causas de tales hallazgos.

Se discute la posible aplicación práctica de estos-
estudios.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Gordon, J., y Cooper, K.E., Study of the Phosphorus - distribution in bacterial cultures. III. The phosphatase activity of E.Coli & staphiloco--ccus. Brit. J. Exp. Path. 13:503, 1932.
- (2) Paget, W., y Vittu, C., Phosphomonoestearases des Esche--richia coli Staphilococcus aureus et Stafilo - coccus albus .
Compt. rend. 223:216, 1946.
- (3) Barber, M., Brooksbank, B.W.L. y Kupper, S.W.A., Staphilo--coccal phosphatase, glucuronidase & sulphatase J. Path. & Bact. 63:65, 1951.
- (4) Barber, M., y Kupper, S.W.A. Identification of Staphilo--coccus pyogenes by the phosphatase reaction.
Ibid. 63:68, 1951.
- (5) Carrere, L. y Roux, J., Activité phosphatasique des Sta--philocoques Ann. Inst. Pasteur 4:349, 1954.
- (6) White, M.L. y Pickett, M.J., A rapid phosphatase test -- for Micrococcus pyogenes var. aureus for detec--tion of potentially pathogenic strains.
Am. J. Clin. Path. 23:1181, 1953.
- (7) Lovell, H.R., Incorporation of disodium p-nitrofenil--phosphate in solid medium for the detection - of phosphatase production by Micrococcus pyo--genes var. aureus
Nature 131:995, 1958.

- (8) Hansen, P.F., Determination of the "acid" prostatic --
phosphatase as a new method for medico-legal -
demonstration on sperm spots.
Acta. Path. et microbial. Scand. 23:187, 1946.
- (9) Bruns, y Puls, W., Die Aktivität der Serumaldolase bei-
Erkrankungen der Leber. Ein neuer enzymatischer
test. Klin. Wochschr. 32:656, 1954.
- (10) Sugiyama, H., y Dack, G.M. Apyrase in parcially purified
Staphilococcal enterotoxin.
J. Infect. Dis. 96:286, 1955.
- (11) De Hann, J., L'influence de sels de calcium sur le pro-
cessus de la phagocytose.
Arch. Néerl. de Phisiol. 2:674, 1918.
- (12) Bessey, O.A., Lowry, O.H., y Brock, M.J., A metod for the-
rapid determination of alkaline phosphatase --
with five cubic millimeters of serum
J. Biol. Chem. 164:321, 1946.
- (13) Sigma Chemical Co. Determination of serum acid & al-
kaline phosphatase & pasteurization of milk --
products using "Sigma 104 phosphatase substrate"
Tech. Bull. No 104 (abril 1955).
- (14) Murayama, M. Comparative study of host resistance of -
Guinea pigs & rats. IV. The effect of bacterial-
fractions on the adenosine-triphosphatase acti

vity of the Guinea pig & rat leucocyte nuclei free homogenates.

J.Infect.Dis.97:1,1955.

- (15) Fiske, C.H. Subbarow, Y., The colorimetric determination of phosphorus.

J.Biol.Chem.66:375,1925.

- (16) Stauff, J. "Biochemisches Taschenbuch".

pp.649. Berlin, Springer Verlag, 1956.

- (17) Notario, A. y Bernasconi, C., Influenza del cortisone e dell ACTH sugli electroliti e sulle fosfatasi acida ed alcalina del siero. Fol. Endocrinol. -- (Pisa) 7:619, 1954.

- (18) Valentine, N.N., y Beck, W.S., Biochemical studies on -- leucocytes phosphatase activity in healh, leucocytosis & myelocytic leucemia.

Lab. & Clin. Med. 38:39, 1951.

- (19) Beck, W.S., y Valentine, N.N. Biochemical studies on leucocytes. II. Phosphatase activity in cronic lymphatic leucemia acute leucemia & miscella --- nebus hematologic conditions.

J. Lab. & Clin. Med. 38:245, 1951.

- (20) Barnes, E.H. A cuantitative study of the phosphatase - activity of Micrococcus pyogenes.

J. Bact. 73:100, 1957.