

HIDROLISIS DE LA METAMPICILINA Y AMPICILINA POR VARIAS CLASES DE β -LACTAMASAS

Por F. Salto y
I. Medarde

La D (—) (α -metilenamino) bencilpenicilina (Metampicilina) es una penicilina semisintética de amplio espectro antimicrobiano, dotada de cierta resistencia a las penicilinasas (β -lactamasas).¹ Los datos sobre la resistencia de la metampicilina a las penicilinasas no son concordantes, por lo que hemos creído interesante seleccionar una serie de gérmenes productores de penicilinasa, de procedencias muy variadas y estudiar cómo actuaban las β -lactamasa por ellos producidos, comparativamente frente a la metampicilina y a la ampicilina.

MATERIAL Y METODOS

Penicilinas.—La Metampicilina sódica liofilizada procedía de Esquifarma, S. A. y la ampicilina sódica fue cedida por Antibióticos, S. A.

Selección de los microorganismos.—Los microorganismos utilizados han sido aislados, unos en una granja avícola (sus siglas comienzan con G), otros de la clínica veterinaria y E. Coli 53, E. Cloacae P99 y E. Coli 1818 nos fueron amablemente cedidos por el Dr. Richmond (Univ. Bristol). Todos ellos fueron escogidos por ser productores de penicilinasa, detectada por el método de FARKAS-HIMSLEY.²

Preparación de las fracciones enzimáticas.—Los microorganismos seleccionados se hicieron crecer en caldo penasay en agitación (250 rpm) y a la temperatura de 37°C durante seis horas. Transcurrido este tiempo se centrifugan a 6.000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se usa como fracción enzimática extracelular. Las células se lavan seguidamente dos veces, con buffer de fosfatos 0,1 M pH 6,8 y seguidamente se resuspenden en un pequeño volumen de buffer, rompiéndose por sonicación. A las células rotas se les añade buffer de fosfatos 0,1 M pH 6,8 hasta lograr el volumen inicial y finalmente se centrifugan a 10.000 rpm durante 20 minutos (0-4°C). El sobrenadante constituye la fracción enzimática ligada a las células.

Acción de las penicilinasas sobre las penicilinas.—Cada una de las fracciones enzimáticas se incubaron con metampicilina y ampicilina a las concentraciones respectivas de 500 µg./ml. y a la temperatura de 37°C, durante una hora. Transcurrido este tiempo, se desactivó el enzima mediante calentamiento de la mezcla de incubación en agua hirviendo. En cada ensayo se pusieron blancos formados por disoluciones de metampicilina y ampicilina de la misma concentración en buffer de fosfatos 0,1 M pH 6,8.

Análisis de las penicilinas.—La actividad residual de cada una de las penicilinas se determinó mediante análisis yodométrico.³ Los porcentajes de inactivación se refirieron a los blancos puestos en cada ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la acción de cada una de las fracciones enzimáticas de penicilinasa extracelular y ligada a la célula, sobre la metampicilina y ampicilina están resumidos en la Tabla I. También se indican en la mencionada tabla, las concentraciones mínimas inhibitoria (CMI) de cada una de las penicilinas sobre cada uno de los microorganismos estudiados.

De los datos anteriores se deduce que en las condiciones de nuestros ensayos, la metampicilina no manifiesta una resistencia absoluta a la penicilinasa. La metampicilina se comporta, frente a los extractos enzimáticos, de forma semejante a la ampicilina, aunque sistemáticamente algo más resistente. En algunos casos, la acción de la penicilinasa extracelular sobre la metampicilina podría venir enmascarada por el pH ligeramente ácido que tienen los extractos enzimáticos, que en las condiciones de nuestros ensayos podrían provocar la transformación parcial (o total) de la metampicilina en ampicilina.

TABLA I
Inactivación de la ampicilina y de la metampicilina por penicilinasas, extracelular y ligada a la célula, producidas por varios microorganismos

Microorganismo	% inactivación por la fracción de penicilinasa:				C. M. I. µg/ml	
	Extracelular		Ligada a la célula		Metam.	Ampi.
	Metam.	Ampi.	Metam.	Ampi.		
Staph. aur. G11A	61	85	66	70	10,3	12
Staph. aur. MP8	11	55	6	52	2,3	2,7
Escherichia F21	0	0	96	100	6,3	12
E. Coli 53	69	95	91	95	5.000	500
E. Cloacae P99	17	20	8	34	400	800
E. Coli 1818	4	35	75	97	1.000	1.000
Pseudomonas G2V9	10	18	11	19	6,3	1
Pseudomonas Y3	3	4	1	1	38	210
B. Cereus ATCC 11778	30	40	3	3	10	10

RESUMEN

A partir de microorganismos productores de penicilinasa se han preparado fracciones enzimáticas libres y ligadas a las células, probándose su acción sobre la metampicilina y ampicilina a 37°C durante una hora. Se ha encontrado que la penicilinasa hidroliza a la metampicilina en todos los casos estudiados, aunque sistemáticamente se manifiesta algo más resistente que la ampicilina. También se han determinado las C.M.I. de la metampicilina y ampicilina frente a los microorganismos estudiados.

RESUME

On a préparé des fractions enzymatiques libres et liées aux cellules à partir de micro-organismes producteurs de pénicillinasse, et l'on a démontré son action sur la métampicilline et l'ampicilline à 37°C, pendant une heure. On a trouvé que la pénicillinasse hydrolyse la métampicilline dans tous les cas étudiés, bien qu'elle paraît un peu plus résistante que l'ampicilline. On a déterminé aussi les C. M. I. de la métampicilline et de l'ampicilline contre les micro-organismes étudiés.

SUMMARY

Free and cell-bound enzyme fractions were prepared from penicillinase producing microorganisms, their action on methampicillin and ampicillin being tested at 37°C for 1 h. Generally, it was found that the penicillinase hydrolyses the methampicillin in all cases studied, although systematically it is shown somewhat more resistant than the ampicillin. The m. i. c. of the methampicillin and ampicillin with the microorganisms studied was also determined.

BIBLIOGRAFIA

1. B. GRANDNIK, PEDROZZOLI, FERREREO y GUZMÁN (1971): *Il Farmaco Ed. Sci.* 26, 520.
2. H. FARKAS-HIMSLEY, S. D. SOEPRIAHATIN (1964): *Nature*, 202, 514.
3. B. OERTENBLADT (1950): *Acta. Chem. Scand.* 4, 518.