

Catalisis, enzimas y pruebas rápidas

Catalysis, enzymes and quick tests

Lucía Constanza Corrales Ramírez¹, Liliana Caycedo Lozano², Stiven Quijano Duarte³

Resumen

Un gran número de los procesos metabólicos y biológicos son catalizados por enzimas; las enzimas son compuestos químicos orgánicos que pertenecen al grupo específico de las biomoléculas denominadas proteínas. Las enzimas poseen en su estructura molecular cuaternaria, organizaciones internas que permiten definir un lugar denominado centro activo; su función química, cinética y termodinámica se relacionan con la disminución de la energía de activación en el curso de la reacción neta.

Los mecanismos de reacción enzimáticos que suceden en las interacciones metabólicas de los microorganismos han permitido desarrollar una serie de pruebas cualitativas que determinan la presencia o ausencia de bacterias en una muestra o un cultivo haciendo uso de técnicas rápidas que facilitan el diagnóstico clínico.

Palabras claves: Catálisis, enzimas, mecanismos de activación enzimática, pruebas clínicas enzimáticas.

Abstract

Many metabolic and biological processes are catalyzed by enzymes; Enzymes are organic chemical compounds that belong to the specific group of biomolecules called proteins.

1. Docente, Programa Bacteriología y Laboratorio Clínico. Universidad Colegio mayor de Cundinamarca
Número de certificación CvLac 000048264120121119123
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2398-348X>

2. Docente, Programa de Ciencias Básicas. Universidad Colegio mayor de Cundinamarca
Número de certificación CvLac 0000660221
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9274-3148>

3 Bacteriólogo y Laboratorista Clínico
Microbiología - Hospital Central
Número de certificación CvLac 00017437332019922915
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2659-2636>

Enzymes have in their quaternary molecular structure, internal organizations that allow defining a place called the active center; its chemical, kinetic, and thermodynamic function is related to the decrease in activation energy during the net reaction.

The enzymatic reaction mechanisms that occur in the metabolic interactions of microorganisms have made it possible to develop a series of qualitative tests that determine the presence or absence of bacteria in a sample or culture using rapid techniques that facilitate clinical diagnosis.

Keywords: Catalysis, enzymes, enzyme activation mechanisms, enzyme clinical tests.

Introducción

Las enzimas son compuestos químicos orgánicos que estructuralmente cumplen con la organización molecular de una proteína; su función específica, radica en disminuir la energía de activación (E_a) en una reacción específica, logrando así, que sean reconocidas como catalizadores. En este contexto, las enzimas aceleran las reacciones sin modificar su estructura y, por lo tanto, no se consideran reactivos propiamente dichos, ni alteran la estequiometría del proceso. Tienen una enorme variedad de funciones dentro de las células, degradan azúcares, sintetizan grasas y aminoácidos, copian información genética, participan en el reconocimiento y transmisión de señales del exterior y degradan subproductos tóxicos, entre otras de las múltiples funciones en que participan (1).

De manera general, los catalizadores, son compuestos químicos que inciden en el

mecanismo de los procesos y, por tanto, en la velocidad de las reacciones. El estudio de la velocidad y de los mecanismos de reacción, se aborda en el campo de la cinética química.

La velocidad de una reacción química depende de la relación entre la disminución de la concentración de los reactivos y el consecuente aumento en la concentración de productos relacionados simultáneamente en función a la variable “tiempo”.

La catálisis es un proceso inherente a la mayoría de las reacciones químicas; tal como se estableció anteriormente, el catalizador participa en la reacción y provee un mecanismo alternativo que posibilita un mayor número de choques “efectivos” entre las moléculas, lo que a su vez genera que se requiera menor energía cinética para dar curso a la formación de los productos, disminuyendo así, el tiempo total del proceso.

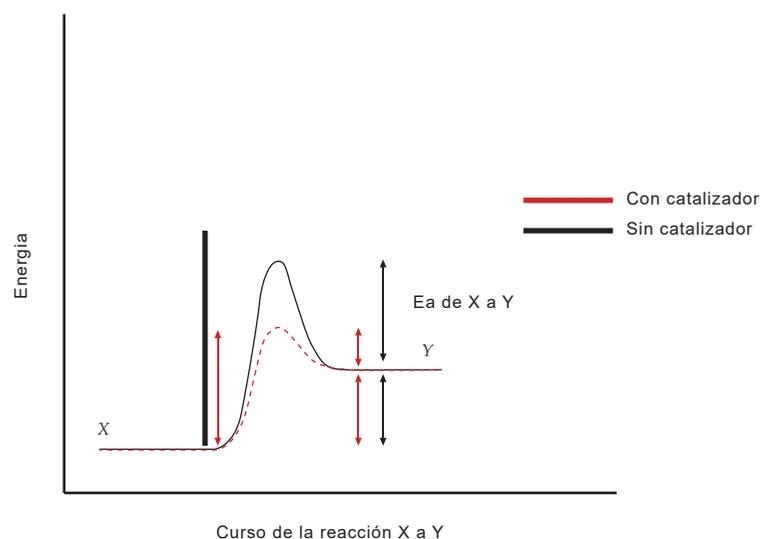


Figura 1. Efecto del catalizador en la Energía de activación durante una reacción química. /L. Caycedo.

Acción Enzimática

La totalidad de los procesos biológicos no son catalizados por enzimas; sin embargo, debido a la gran cantidad en la que se actúan estos compuestos es pertinente aclarar los mecanismos de acción enzimáticos.

La sustancia pura, sobre la cual actúa la enzima se denomina *sustrato* y tal como se explicó anteriormente, las enzimas son proteínas que aceleran las reacciones biológicas, disminuyendo la energía de activación que corresponde al momento en el cual se presenta un mayor número de choques efectivos entre las moléculas de los reactivos (sustratos), alcanzando así el equilibrio de la reacción con la consecuente formación de los productos en un tiempo menor.

Este tipo de procesos se reconocen por la especificidad de las enzimas hacia sus sustra-

tos; si bien, no en todas las reacciones existe una sola enzima para un único sustrato, si se puede afirmar que cuando esto no se presenta se genera lo que se conoce como *especificidad de reacción catalizada* que significa grupos de enzimas que pueden catalizar un tipo de reacción y de mecanismo específico.

Las proteínas que cumplen funciones enzimáticas poseen en su estructura molecular cuaternaria, organizaciones internas que permiten definir un lugar denominado centro activo (2), las características generales de estos espacios se pueden describir de la siguiente manera.

1. El centro activo corresponde proporcionalmente a un espacio relativamente pequeña del volumen total de la enzima.
2. El centro activo tiene características espaciales tridimensionales.

3. Los sustratos se unen a las enzimas por medio de atracciones intermoleculares débiles.
4. Los centros activos, son hoyos o hendiduras con características apolares que aumentan la solubilidad y la afinidad por el sustrato.
5. La especificidad del enlace depende de la disposición y organización molecular del centro activo.

La mayoría de las enzimas intervienen en las reacciones en su forma proteica aislada, sin embargo, hay algunas en las que esta parte, denominada *apoenzima*, se complementa

con la acción de un componente no proteico denominado *cofactor*, sin el cual la enzima no cumple con su función catalítica.

Las enzimas se encuentran clasificadas dependiendo del tipo de sustrato sobre el cual actúan y de allí se deriva su nomenclatura; la mayoría de ellas se reconocen con el sufijo “asa” unido al nombre del sustrato o al tipo de reacción general sobre la que intervienen.

De manera general las enzimas pueden clasificarse en los siguientes 6 grupos, de acuerdo con la reacción que catalizan (2).

Tabla 1. Clasificación y acción de las principales enzimas.

Denominación	Acción
Oxidorreductasas	Catalizan reacciones de óxido-reducción; en este grupo se encuentran, las deshidrogenasas, oxidasas, peroxidadas, oxigenasas y/o reductasas, entre otras.
Transferasas	Catalizan las reacciones en las que se cambia de posición un radical químico dentro de una molécula y para cumplir con su función la mayoría de veces requieren un cofactor.
Hidrolasas	Estas enzimas pueden considerarse como un subgrupo de las transferasas puesto que catalizan la hidrólisis con el consecuente cambio en la posición de un grupo químico, como es el caso del grupo PO ₄ .
Liasas	Catalizan reacciones de eliminación que implican formación de dobles enlaces en el sustrato; mientras que las sintetasas catalizan reacciones de adición.
Isomerasas	Catalizan reacciones en las que en el sustrato un grupo cambia de posición y se forma un isómero, como la glucosa-6-fosfato isomerasa que cataliza la reacción reversible de glucosa-6-fosfato a fructosa-6-fosfato.
Ligazas	Catalizan reacciones de síntesis en las que se unen dos sustratos, también se les asigna el nombre de sintetasas

Existen otros factores que se deben considerar cuando se está observando la acción de una enzima determinada, aparte del sustrato sobre el cual actúa; al aumentar la concentración de sustrato, la actividad enzimática aumenta, hasta alcanzar la velocidad máxima, punto donde la enzima se satura, debido a que las enzimas tienen todos sus sitios activos ocupados. Otro es el pH, dado que las enzimas actúan dentro de límites estrechos de este y es necesario conocer el pH óptimo de la reacción. Y la temperatura, pues la velocidad de las reacciones enzimáticas aumenta, por lo general con la temperatura, dentro del intervalo en que la enzima se mantiene estable y es activa. La actividad enzimática máxima se alcanza a una temperatura óptima, luego la actividad decrece y finalmente cesa por completo a causa de la desnaturalización progresiva de la enzima por acción de la temperatura. A bajas temperaturas, las reacciones disminuyen mucho o se detienen porque decrece la cinética molecular, pero la acción catalítica reaparece cuando la temperatura se eleva a valores normales para la enzima. Importante considerar

la naturaleza de las bacterias, ya que por ejemplo las bacterias termófilas tienen su óptimo de actividad cercano a los 80 °C. (1, 2).

Pruebas Enzimáticas Rápidas para la Identificación Bacteriana

Prueba de Catalasa

El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos y tiene entre otras una función protectora contra microorganismos patógenos, principalmente anaerobios, pero dada su toxicidad debe transformarse rápidamente en compuestos menos peligrosos.

La catalasa es una enzima que cataliza la reacción de descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en agua y oxígeno (3). El H_2O_2 es el producto final del metabolismo aeróbico de los hidratos de carbono, el cual, es nocivo para las bacterias si se acumula. La mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas sintetizan la enzima catalasa.

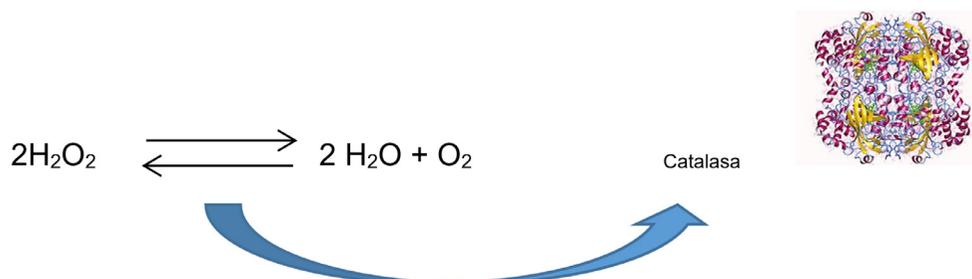


Figura 2. Esquema de la acción de la enzima catalasa. / L. Caycedo.

Esta enzima es sintetizada por la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas y corresponde a un homotetrámero que contiene un grupo hemo en cada subunidad, el cual utiliza como cofactor al igual que el manganeso. En las células eucariotas la enzima se encuentra en los peroxisomas.

El grupo de enzimas a las que pertenece la catalasa es el de las *oxido reductasas*, las cuales catalizan reacciones de óxido-reducción en las que simultáneamente se pierden electrones por una sustancia que se oxida (agente reductor) y esta misma cantidad de cargas negativas es ganada por una sustancia que se reduce (agente oxidante) (4).

Según el cofactor que reaccione junto con la enzima se han podido clasificar tres tipos de catalasas: Las monofuncionales que se caracterizan por la presencia del grupo hemo como cofactor, las Mn-catalasas en las que en lugar de utilizar como cofactor el grupo hemo es reemplazado por Manganeso (Mn) (5); éste tipo de catalasas están presentes solo en algunos organismos anaerobios y las catalasas-peroxidasas que al igual que las catalasas hemo también tienen como cofactor este grupo pero se diferencian de las primeras en que solo están presentes en hongos y bacterias.

De tal manera que en la mayoría de los organismos aerobios se presentan únicamente catalasas monofuncionales. En el mecanismo de reacción de la catalasa, intervienen

dos moléculas de peróxido (6) entre las cuales ocurre el intercambio electrónico, siendo una de ellas el agente oxidante y la otra el agente reductor; así en un primer paso, la molécula de catalasa se oxida y da lugar a un primer compuesto intermediario (es aquí donde interviene el cofactor) y se origina una primera molécula de agua, en el segundo paso, el primer compuesto se reduce gracias a otra molécula de peróxido obteniendo nuevamente la molécula de catalasa original y una molécula de oxígeno (O₂) estable.

Por lo anterior, la estequiometría de la reacción corresponde a: 2 moles/moléculas de peróxido de hidrogeno se descomponen, por acción de la catalasa en 2 moles/moléculas de agua y 1 mol/molécula de oxígeno; siendo esta última (el oxígeno molecular) quien recibe las cargas electrónicas al final de la reacción.



La prueba se puede realizar en lámina y en este caso se colocan una o dos gotas de H₂O₂ al 3 % en la lámina portaobjetos, emulsionar una colonia del microorganismo con un pabillo estéril y mezclar suavemente; o en tubo y para ello se requiere contar con la siembra del microorganismo en un agar nutritivo en “pico de flauta”, una vez se obtienen las colonias se le agregan dos o tres gotas de H₂O₂ al 3 % y en ambos casos observar en un lapso de 1 minuto la producción de burbujas.

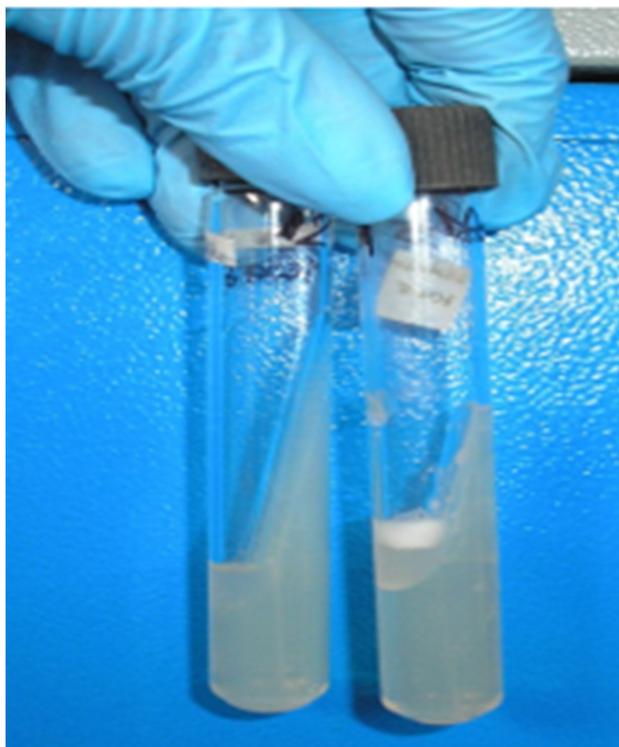


Figura 3. Prueba de catalasa en tubo (izquierda negativa, derecha positiva).



Figura 4. Prueba de catalasa en lámina (observe la formación de burbujas) /L. Corrales

Prueba de Citocromo Oxidasa

El oxígeno se ve favorecido como aceptor de electrones terminales en microorganismos aerobios y facultativos debido a su estado físico apropiado, solubilidad satisfactoria y sus combinaciones deseables de propiedades cinéticas y termodinámicas. El oxígeno generalmente se reduce en cuatro electrones para producir agua, pero hay importantes consecuencias biológicas para la reducción parcial a superóxido y peróxido. Procesos reguladores complejos aseguran la utilización de oxígeno con preferencia a otros oxidantes, la síntesis de enzimas que consumen oxígeno con propiedades apropiadas (particularmente afinidad por el ligando), y protección celular apropiada en caso de del estrés oxidativo (7).

Atendiendo lo planteado por J M; Menéndez. J. R y Trujillo Y (8). La molécula de Oxígeno (O_2) es básicamente un birradical libre ya que posee 2 electrones desapareados en su orbital externo; por lo anterior, esta molécula interviene en dos reacciones y en cada una de ellas acepta un electrón.

De esta manera, el oxígeno es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial; constituyéndose el oxígeno en el receptor final.

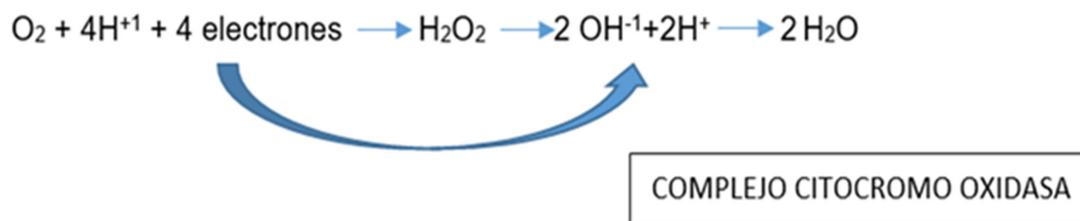


Figura 5. Representación del transporte electrónico – Complejo Citocromo oxidasa/ L. Caycedo.

Como mecanismo de reacción, se tienen que el complejo citocromo oxidasa permite la formación de especies intermediarias que no se constituyen en productos de la reacción estos son:

- Radicales superóxido (O_2)⁻¹
- Radical hidroxilo (OH)⁻¹
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

De manera general, se puede establecer que la reacción ocurre en cuatro etapas; primero la formación de dos radicales superóxidos, los cuales en la segunda etapa se unen a los hidrogeniones dando lugar a la formación del peróxido que, a su vez, en el tercer paso, se descompone en un radical hidroxilo y se forma la primera molécula de agua. En la última etapa reacciona el radical hidroxilo con uno de los hidrogeniones y se forma la segunda molécula de agua.

Así, se puede generalizar que los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y transfieren hidrogeno al oxígeno para la formación de agua.



Entre los microorganismos se encuentran diferentes tipos de metabolismo respiratorio: aerobio, microaerófilo, anaerobio facultativo o anaerobio estricto. Los que deben utilizar oxígeno se denominan aerobios, y los que pueden utilizar oxígeno pero también otros compuestos se denominan anaerobios facultativos. Esta prueba tiene su mayor utilidad para diferenciar colonias bacterianas sospechosas de pertenecer a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Neisserias*, *Moraxella* y *Vibrios*, cuyo metabolismo respiratorio es aerobio (9).

La prueba de citocromo oxidasa utiliza colorantes que sustituyen al oxígeno como aceptor final de electrones; uno de ellos es la parafenilendiamina, este compuesto orgánico, como colorante, altera la propiedad física del color del sustrato y ocasiona una modificación en las zonas de absorción del espectro visible de la sustancia (10); así en estado reducido es incoloro; sin embargo, en presencia de citocromo oxidasa y de oxígeno atmosférico, se oxida y forma azul de indofenol.

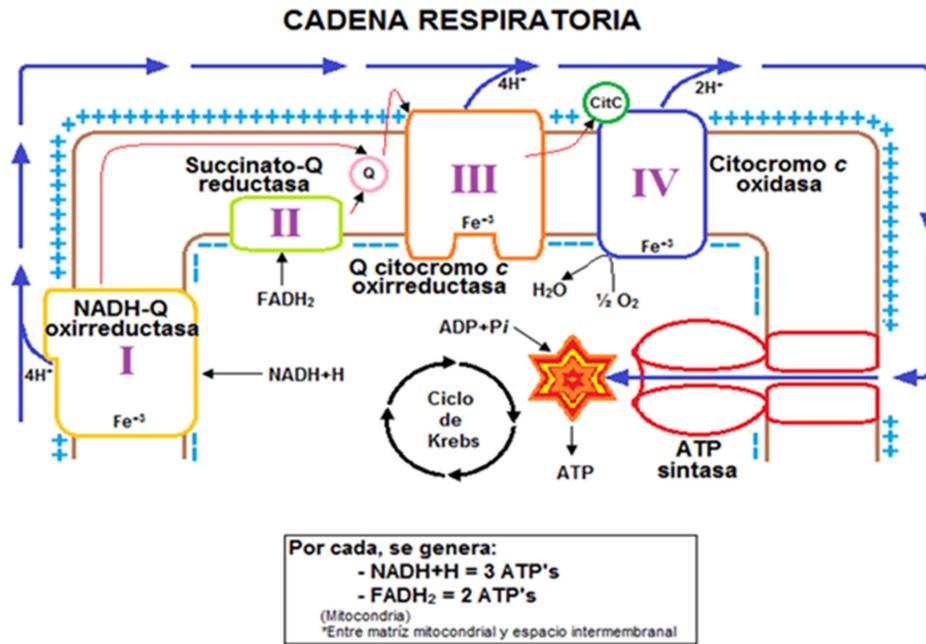


Figura 6. Cadena Respiratoria en la citocromo C oxidasa. Tomado de http://2.bp.blogspot.com/-0Dr8KHtXc_U/ThI7YwBn0kI/AAAAAAAAA8/xNkVoW_K3LM/s1600/Cadena+respiratoria.png

Para realizar la prueba se debe colocar y extender sobre una tira o disco de papel de filtro impregnado con diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de oxidasa), una colonia del microorganismo en

estudio y esperar de 30 a 60 segundos. No leer la prueba después de 60 segundos ya que el reactivo se oxida por acción del oxígeno atmosférico y cambia de color.

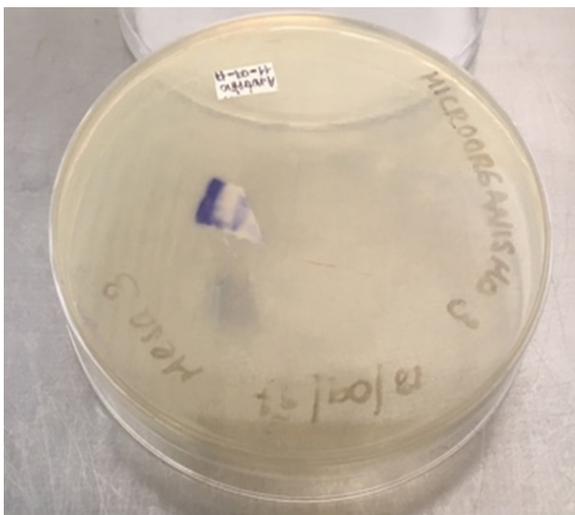


Figura 7. Prueba de oxidasa, en la prueba de la izquierda (azul) la reacción es dependiente del citocromo oxidasa.

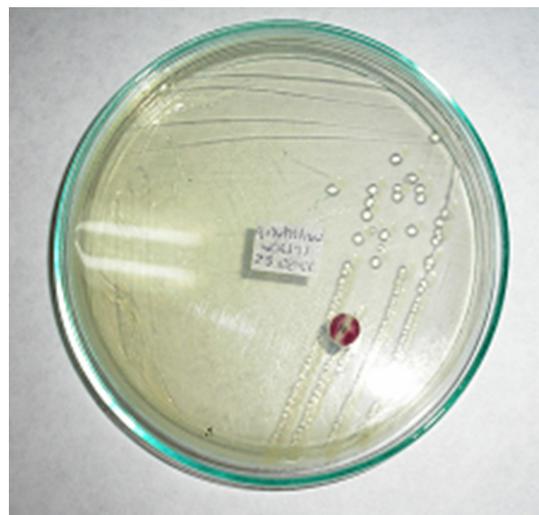


Figura 8. En la prueba de la derecha (rojo) se observa la oxidación completa. / L. Corrales.

Prueba de la Coagulasa

La coagulasa es una enzima bacteriana extracelular (procoagulasa) que reacciona con el factor clumping o factor activador de la cascada de coagulación presente en el plasma sanguíneo similar a la protrombina, dando lugar a un complejo análogo a la trombina (coagulasa propiamente dicha) que reacciona con el fibrinógeno formando un coágulo de fibrina en ausencia de Ca^{2+} razón por la cual se debe usar el EDTA (ácido etilendiamin tetraacético) como anticoagulante (11).

Existen dos clases de coagulasas:

Coagulasa fija: En esta el factor de aglutinación está unido a la pared de la bacteria y se detecta mediante la técnica en lámina portaobjetos.

Coagulasa libre: Se encuentra presente en filtrados de cultivos y se detecta mediante la técnica en el tubo.

En su mecanismo de reacción, la enzima coagulasa interacciona con la protrombina, que corresponde a una proteína de elevado peso molecular; el compuesto intermedio que se forma se denomina estafilotrombina, el cual posibilita la acción de la enzima proteasa la cual es la responsable de convertir el fibrinógeno en fibrina (12).

Esta reacción ocurre específicamente, por el rompimiento de 4 enlaces peptídicos entre

los aminoácidos arginina y glicina; cuando se rompen los enlaces en el fibrinógeno resultan unidades (monómeros) de menor tamaño molecular, ésta disminución de masa y la nueva disposición de las cargas eléctricas, ocasionan que a partir de una macromolécula altamente soluble se obtengan 4 monómeros insolubles que se aglutinan y permiten la formación del coágulo (13).

La prueba se realiza generalmente en tubo, el cual contiene en partes iguales un caldo nutritivo y plasma de conejo. En este medio se siembra la bacteria en estudio, se incuba y se debe revisar a las 3, 5 y 24 horas dependiendo si se observa o no la formación de las redes de fibrina o del coágulo. Aquí es importante estar revisando la prueba dado que hay microorganismos que producen coagulasa y también fibrinolisin, las cuales destruyen el coágulo ya formado (14).

Esta prueba es muy importante en la identificación del grupo de *Staphylococcus coagulasa* positiva (CoPS) incluye a las especies *S. aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* y *S. schleiferi* subsp. *Coagulans*, que poseen este factor de virulencia que convierte el fibrinógeno en fibrina, generando una capa de protección frente a los macrófagos (15).



Figura 9. Prueba de coagulasa positiva, formación de redes de fibrina. / L. Corrales.



Figura 10. Prueba de coagulasa positiva con formación de coágulo / L. Corrales.

La prueba de coagulasa es uno de los diferentes métodos para la diferenciación entre *Staphylococcus aureus* de los demás *Staphylococcus*, pues dicho microorganismo es de importancia en la salud pública por su resistencia a los antimicrobianos (15)

Prueba de la DNAsa

La desoxirribonucleasa (DNAsa) es una enzima que despolimeriza las bases nitrogenadas y destruye el DNA, ya que cliva los enlaces fosfodiéster internos de la molécula de DNA, produciendo 3' – hidroxilo y 5'

– fosforilo o 5' – hidroxilo y 3' – fosforilo terminales por ser exonucleasas que hidrolizan un nucleótido sólo cuando se encuentra en el extremo de una molécula. Por tanto, son un tipo de nucleasas conocidas por su amplia variedad de desoxirribonucleasas que difieren en las especificaciones de su sustrato, mecanismos químicos y funciones biológicas. La mayoría de las DNAsas bacterianas requieren de iones divalentes para su actividad los cuales son aportados por las peptonas en el medio de cultivo.

Para entender el mecanismo de la reacción, es necesario tener en cuenta que dentro de las nucleasas, se encuentran también las endonucleasas, las cuales propician el rompimiento de los enlaces fosfodiéster que se ubican en el interior de la cadena de nucleótidos y que a su vez tienen gran especificidad por el sustrato (ácido nucleico), dentro de este grupo se encuentran las ribonucleasas; como se dijo anteriormente, la desoxirribonucleasa hace parte de las denominadas exonucleasas que no poseen tal especificidad y actúan indistintamente sobre el ácido nucleico y el desoxirribonucleico (16).

Como resultado de la acción de la desoxirribonucleasa (DNAsa) se despolimerizan las bases nitrogenadas y se destruye el DNA; el medio utilizado para esta prueba es sólido en placa y en algunas ocasiones contiene azul de toluidina como indicador. El medio contiene triptona que proporciona los nutrientes para el crecimiento de la bacteria, el

cloruro de sodio (NaCl) mantiene el equilibrio osmótico y el alto contenido de ácido desoxirribonucleico molecular hace posible la detección de la enzima DNasa (14).

Después de la incubación del medio con la cepa en estudio, se le agrega ácido clorhídrico HCl 1N. Este ácido precipita el ADN polimerizado debido a la alta concentración de hidrogeniones, por lo tanto, se verá de aspecto opaco alrededor del crecimiento bacteriano.

Cuando se produce la despolimerización del ADN y se agrega el ácido se observa la apa-

rición de una zona transparente en el medio alrededor del crecimiento bacteriano y que ha tenido contacto con el ácido. Esta prueba es utilizada en la identificación de los estafilococos, pero también se realiza para la detección de la actividad de la DNasa en otros microorganismos (13, 17).

La producción de esta enzima se inhibe en anaerobiosis y se estimula por la presencia de oxígeno, requiere iones calcio (Ca^{+2}) para su actividad enzimática, posee un pH óptimo de 8,6 y tiene cierta termoestabilidad (resiste temperatura de $130^{\circ}C$ por 16,6 min) (18).

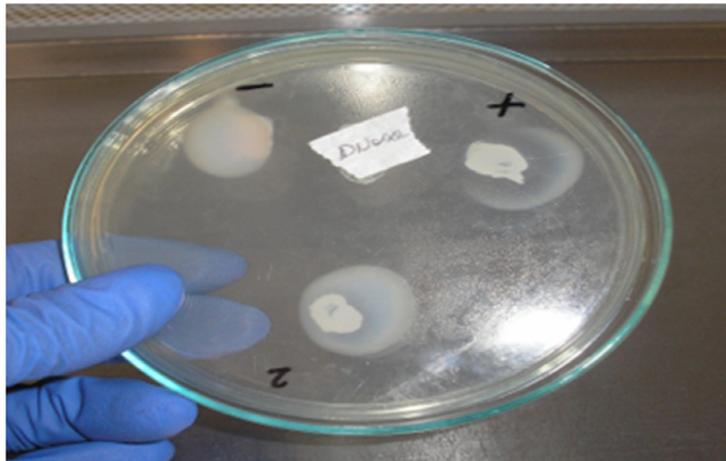


Figura 11. Prueba de DNasa, obsérvese el halo transparente alrededor del control positivo y el halo opaco alrededor del control negativo. / L. Corrales.

Determinación de beta lactamasas

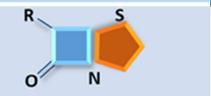
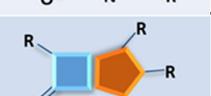
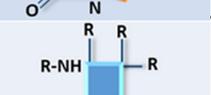
Las β -lactamasas son enzimas producidas por las bacterias y se constituyen en la principal causa de resistencia a las penicilinas y las cefalosporinas. La identificación definitiva de estas enzimas sólo es posible por secuenciación nucleotídica o aminoacídica,

lo cual escapa a las posibilidades del laboratorio de diagnóstico. Sin embargo, existen métodos simples que permiten la detección y tipificación de estas enzimas que pueden ser útiles en el laboratorio clínico (19).

Se clasifican de acuerdo con su peso molecular, punto isoeléctrico y sitio activo entre

otros. Las β -lactamasas pueden encontrarse extracelularmente en bacterias Grampositivas, o en el espacio periplasmático en bacterias Gram-negativas (20).

Tabla 2. Estructura química de los β -lactámicos.

	Anillo β -lactámico + anillo secundario = β -nucleo lactámico ANTIBIÓTICO		
	Anillo tiazolidínico	Ácido 6 - aminopenicilánico	PENICILINAS
	Anillo dihidrotiacínico	Ácido 7 α - cefalosporínico	CEFALOSPORINAS
	Anillo Pirrolínico	Carbapenémico	CARBAPENEMAS
	Ninguno	Monobactámico	MONOBACTÁMICOS
	Anillo oxazolidínico	Clavamo/Oxapenamó	ÁCIDO CLAVULÁNICO

Tomado de: C. Suarez, F. Gudiol / *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):116–129

Las pruebas directas se utilizan principalmente para bacterias como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Neisseria* spp., denominadas de crecimiento exigente, y en los cuales la producción de estas enzimas tiene consecuencias claras sobre la terapéutica. Una prueba positiva indica resistencia a penicilinas de espectro reducido: amoxicilina, ampicilina, carbenicilina, mezlocilina, penicilina, piperacilina y ticarcilina.

Existen disponibles varios métodos para la detección de β -lactamasas convenientes para uso de rutina y recomendados por el manual de Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology (Cumitech 4A),

como son el yodométrico, el acidométrico y el cromogénico.

Una de las pruebas es la que utiliza nitrocefina ($C_{21}H_{16}N_4O_8S_2$), una cefalosporina cromogénica que vira del amarillo al rojo al ser hidrolizada, ésta se fundamenta en que cuando la fracción amida del compuesto, unida al anillo beta lactámico, es hidrolizada por la beta lactamasa, se produce un cambio de color de amarillo a rojo de la cefalosporina cromogénica (nitrocefina, cefinasas y otras) (13). El ensayo es el más sensible para la mayoría de las β -lactamasas, salvo la penicilinasas estreptocócica y la ROB-1 producida por *Haemophilus* spp.

En lo posible, esta prueba debe hacerse directamente del primer aislamiento, debido a que el plásmido que codifica la información es muy inestable y puede perderse en los subcultivos.

Otros métodos, se basan en la reducción del yodo por el ácido penicilinoico, el cual se deriva de la hidrólisis de la penicilina. En este caso, la reducción del yodo acompañado con almidón lleva a la decoloración del complejo. La prueba es particularmente sensible para la penicilinas estafilocócica. Sin embargo, es menos sensible que la prueba de nitrocefina para la mayoría de las β -lactamasas de bacterias gramnegativas.

La hidrólisis del anillo β -lactámico también puede ser detectada por métodos acidométricos, dado que se genera un grupo carboxilo (-COOH) que puede acidificar sistemas no tamponados. En uno de estos métodos se emplea una solución de bencilpenicilina y rojo fenol, en la cual se inoculan las bacterias. Si existe actividad β -lactamasa la solución vira del violeta al amarillo en pocos minutos (18).

Se han descrito más de 200 β -lactamasas diferentes. Algunas son específicas para penicilinas o cefalosporinas, mientras que otras tienen un espectro amplio de actividad, incluyendo algunas que son capaces de inactivar la mayoría de antibióticos β -lactámicos. Este último grupo denominado β -lactamasas de espectro ampliado

(BLEAs), representan un gran problema, debido a que con frecuencia están codificadas en plásmidos y por lo tanto pueden transferirse de un organismo a otro.

Las β -lactamasas se clasifican según los sustratos sobre los que actúan, las sustancias capaces de inhibirlas y la similitud en sus secuencias de aminoácidos. Las clasificaciones más utilizadas son las de Ambler y la de Bush-Jacoby-Medeiros. La clasificación de Ambler distingue cuatro clases de β -lactamasas en función de sus secuencias aminoacídicas. Las de las clases A, C y D son serina β -lactamasas y las de clase B metalobetalactamasas dependientes de zinc.

Por su parte, la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros separa las β -lactamasas en función de su perfil hidrolítico y de sus inhibidores y distingue cuatro categorías y múltiples subgrupos. Dentro del grupo 2 (penicilinas sensibles al ácido clavulánico) se encuentra el subgrupo 2be, que engloba a más de 200 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) derivadas de TEM, de SHV o del tipo CTX-M, que se caracterizan por generar un distinto nivel de resistencia a cefalosporinas de tercera generación, recuperable en presencia del ácido clavulánico (21).

Tabla 3. Clasificación de las β -lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros, basada en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas. Las clases A, C y D actúan mediante un mecanismo basado en la serina. La clase B necesita zinc como cofactor (22).

Grupo funcional y subgrupo de Bush, Jacoby y Medeiros	Clase molecular (Ambler)*	Características
1	C	Cefalosporinas, a menudo cromosómicas, pero pueden ser plasmídicas. Resistencia a todos los β -lactámicos, excepto carbapenémicos (a no ser que coexistan alteraciones en las porinas). No inhibidas por el ácido clavulánico.
2	A,D	Penicilinas, cefalosporinas o ambas. La mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico (salvo casos de hiperproducción o subgrupos determinados).
2a	A	Penicilinas. Incluye las de <i>Enterococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> . Resistencia a penicilinas. Inhibidas por ácido clavulánico
2b	A	β -lactamasas de amplio espectro (penicilinas y cefalosporinas), incluyendo TEM-1 y SHV-1.
2be	A	β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Resistencia a oximino-cefalosporinas y a monobactámicos (aztreonam).
2br	A	β -lactamasas tipo IRT (Inhibitor Resistant TEM). Resistentes a los inhibidores de β -lactamasas ácido clavulánico y sulbactam, pero sensibles a tazobactam.
2c	A	Enzimas hidrolizantes de carbenicilina fundamentalmente, con algún efecto sobre cloxacilina.
2d	D	Enzimas hidrolizantes de cloxacilina (oxacilina) fundamentalmente, con algún efecto sobre carbenicilina. Inhibidas escasamente por ácido clavulánico. Algunas son BLEE (BLEE tipo OXA).
2e	A	Cefalosporinas y aztreonamas. Inhibidas por ácido clavulánico.
2f	A	Serina- β -lactamasas. Carbapenemasas. Inhibidas por ácido clavulánico.
3 ^a , 3b, 3c	B	Metalo (Zn)- β -lactamasas. Resistencia a carbapenémicos y a todos los β -lactámicos, excepto los monobactámicos. No inhibidas por ácido clavulánico.
4		Miscelánea. Penicilinas no incluidas en los otros grupos. No inhibidas por ácido clavulánico

Tomado de: Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33.

Las betalactamasas clásicas tienen codificación plasmidial y resistencia a bencilpenicilina, aminopenicilina, carboxipenicilina y ureidopenicilina, pero no hidrolizan de for-

ma significativa las cefalosporinas. Sin embargo, el uso de estas últimas ha favorecido la selección positiva de cepas que producen nuevas variedades de betalactamasas de los

grupos TEM y SHV capaces de hidrolizar las cefalosporinas de tercera generación, y se denominan: “betalactamasas de espectro extendido”(BLEE, o ESBL por su denominación en inglés extended spectrum beta-lactamase), de las cuales se han detectado variedades de genotipo TEM y SHV. (21)

No obstante, un denominador común de estas BLEE es la sensibilidad al ácido clavulánico, y su diagnóstico se demuestra mediante la sinergia entre el clavulánico y una cefalosporina de tercera generación como la cefotaxima (23).

El tipo TEM-1 es el que con más frecuencia se encuentra en bacterias gramnegativas. Más del 90% de las resistencias a ampicilina en *Escherichia coli* son debidas a la producción de TEM-1, y también en la resistencia a penicilinas que podemos observar en *Haemophilus influenzae* y *Neisseria gonorrhoeae*, en aumento. A pesar de que las betalactamasas de tipo TEM se encuentran principalmente en *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* se encuentran cada vez con mayor frecuencia en otras bacterias gramnegativas. La sustitución aminoacídica responsable del fenotipo BLEE permite el acceso a nuevos sustratos, pero la apertura del sitio activo para la entrada del betalactámico incrementa la susceptibilidad a inhibidores de la betalactamasa.

El tipo SHV-1 comparte un 68% de identidad aminoacídica con TEM-1, y su estruc-

tura es relativamente similar. El tipo SHV-1 es más habitual en *K. pneumoniae*, y es responsable de más del 20% de las resistencias a ampicilina mediadas por plásmidos en esta especie (24).

Las Betalactamasas tipo CTX-M (Clase A), reciben su nombre por su especial actividad contra la cefotaxima, así como otros sustratos betalactámicos como ceftazidima, ceftriaxona, o cefepime. Este genotipo es un buen ejemplo de betalactamasas cromosómicas, encontradas normalmente en especies de patógenos comensales y otras.

Las betalactamasas tipo OXA (Clase D), son conocidas como las menos comunes, pero también como la única variedad que puede hidrolizar la oxacilina y otras penicilinas relacionadas con estafilococos. Estas betalactamasas difieren de TEM y SHV en que son de la clase molecular D y del grupo funcional 2d. Las betalactamasas tipo OXA confieren resistencia a ampicilina y a cefalotina y se caracterizan por su gran actividad hidrológica contra la oxacilina y cloxacilina, y el hecho de que son pobremente inhibidas por el ácido clavulánico. La BLEE tipo OXA ha sido encontrada principalmente en *P. aeruginosa*.

Otras BLEE's mediadas por plásmidos son los tipos PER, VEB, GES y IBC, que se han descrito pero que no son comunes, y se han encontrado principalmente en *P. aeruginosa* y *Acinetobacter* (21, 24).

La penicilinas es, un tipo específico de β -lactamasas que se caracteriza por tener especificidad por las penicilinas, hidrolizando el anillo betalactámico. El peso molecular de la mayoría de estas enzimas es de aproxi-

madamente 50.000. Las penicilinasas fueron las primeras β -lactamasas en ser descrita en *Escherichia coli* en 1940, poco antes de que la penicilina se usara comercialmente.

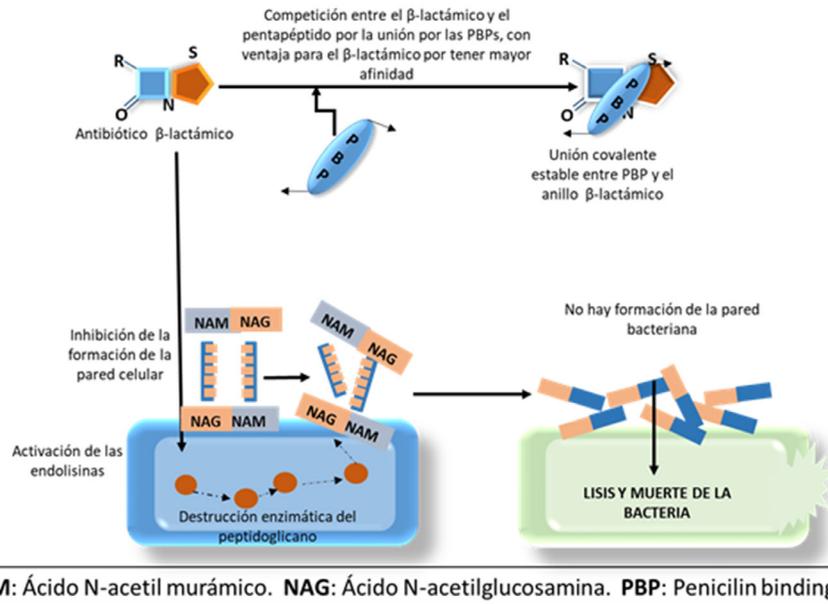


Figura 12. Acción de los antibióticos β -lactámicos Tomado de: C. Suarez, F. Gudiol / Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009;27(2):116–129

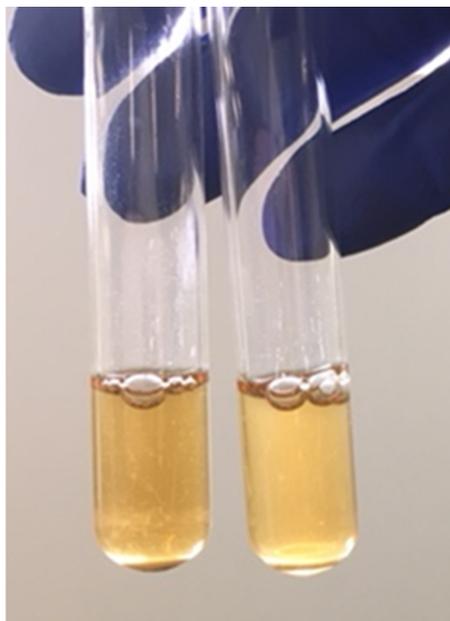


Figura 13. Prueba de Beta lactamasas con disco de nitrocefina. (izquierda tubo con medio transparente, la bacteria es sensible y no hubo crecimiento. Derecha tubo con medio turbio la bacteria es resistente y hubo crecimiento). / L. Corrales.

Detección de carbapenemasas

Las carbapenemasas son beta-lactamasas que hidrolizan las penicilinas, y en la mayoría de los casos también a las cefalosporinas y, en varios grados, a las carbapenemas. En definitiva, pueden conferir resistencia a todos los beta-lactámicos, con la excepción del aztreonam, que no se hidroliza por las metalo-beta-lactamasas. “Además, en muchas ocasiones las EPC (Enterobacterias productoras de carbapenemasas) son también resistentes a múltiples antimicrobianos de otras familias como las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y el cotrimoxazol, lo que reduce las opciones terapéuticas a colistina, aztreonam, fosfomicina y tigeciclina”. (25)

“Las primeras carbapenemasas de origen plasmídico se describieron en Japón en el año 1991 en *P. aeruginosa* y con posterioridad en diversas especies de enterobacterias, entre ellas *S. marcescens*, y también en *Pseudomonas putida* y *Achromobacter xylosoxidans*.” (26)

Los principales tipos de carbapenemasas en Enterobacterias se conocen 3 tipos de moléculas de carbapenemasas, “denominados A, B y D las de las clases A y D son serina-beta-lactamasas, mientras que las de clase B, son metalo-beta-lactamasas, es decir, su actividad hidrolítica depende de la presencia de zinc” (27)

Las carbapenemasas de clase A son las que presentan mayor diversidad y distribución. Se caracterizan por la capacidad para hidrolizar carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y aztreonam, y han sido identificadas en enterobacterias y en bacilos gramnegativos no fermentadores.

Las carbapenemasas de clase B se caracterizan por hidrolizar carbapenémicos, con excepción de aztreonam, y su acción es inhibida por el agente quelante EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético). Debido a su clasificación y complejidad es común que los carbapenémicos se utilicen en los hospitales para tratar infecciones severas como: Endocarditis (infección de las válvulas y revestimiento del corazón), Infecciones del tracto respiratorio incluyendo la neumonía, Infecciones del tracto urinario y abdominales, Infecciones ginecológicas, Infecciones de la sangre, de la piel, de los huesos y de las articulaciones. Esta familia de antibióticos se compone de otros fármacos derivados de los carbapenémicos como son: Ertapenem, Doripenem, Imipenem, Meropenem, debido a su complejidad la detección de carbapenemasas también supone un reto para los laboratorios de Microbiología Clínica debido a que su detección fenotípica no es fácil, ya que en muchos casos los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las carbapenemasas frente a las EPC se encuentran en el rango de sensibilidad, por debajo de los puntos de corte

clínicos. Por tanto, es necesario establecer una metodología que facilite su detección además de esto “la problemática se agudiza aún más con la aparición de organismos ambientales y de la microbiota humana portadoras de resistencia” (28). En Colombia las Enterobacterias ocupan los primeros lugares en la epidemiología de las infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) y de las “adquiridas en comunidad a los carbapenémicos y esto es gracias a una combinación de mecanismos que incluye la producción de enzimas hidrolíticas y las mutaciones en proteínas de la membrana externa” (29).

“La detección de la resistencia a los carbapenemes, sobre todo cuando se trata de mecanismos transmisibles, es fundamental para orientar adecuadamente la terapia con antibióticos, implementar medidas de aislamiento adecuadas, y realiza investigación. La mayoría de los métodos para la detección y confirmación tienen resultados en tiempos largos y/o son complicados y/o costosos. Es más, algunas pruebas carecen de sensibilidad y especificidad, por lo que los resultados son menos confiables” (30), gracias a los avances tecnológicos de laboratorios a nivel mundial se desarrolló una prueba rápida que detecta Carbapenemes hidrolizados por bacterias productoras de carbapenemasas-: Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa y Acinetobacter baumannii. La hidrólisis acidifica el medio que produce el cambio de color del indicador de pH - indicando específicamente la presencia

de resistencia a Carbapenemes transmisible, CARBA NP detecta (sin distinción) los 3 tipos de carbapenemasas: Clase A: KPC es el representante principal, Clase B: β -lactamasas Metallo (MBL). NDM-1, VIM y IMP, Clase D: OXA carbapenemasas. Una de las grandes ventajas de esta prueba es que debes tener la bacteria en medio sólido y en menos de dos horas obtienes el resultado.



Figura 14. Prueba Carba NP positiva / S. Quijano.

Prueba de beta galactosidasa (ONPG)

Mediante esta prueba se determina la presencia de la enzima β -galactosidasa, la cual rompe la molécula de lactosa como disacárido en los respectivos monosacáridos galactosa y glucosa (31).

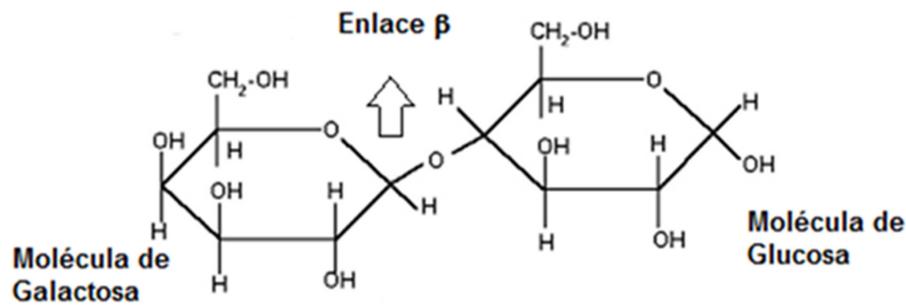


Figura 15. Estructura de la lactosa.

En la fermentación bacteriana de la lactosa participan dos proteínas y en este caso ocurre la fermentación rápida, o cuando la bacteria cuenta con una sola ocurre la fermentación lenta. La primera proteína que participa es la β -galactósido permeasa, la cual está localizada en la membrana celular y tiene como función el transporte de la lactosa al interior de la célula y la segunda es la β -D-galactosidasa que es de tipo intracelular y su función es hidro-

lizar la molécula de lactosa en glucosa y galactosa (18).

La ruptura del enlace que une los dos monosacáridos que conforman la lactosa se verifica mediante el uso del compuesto orgánico *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) que al ser hidrolizado produce un compuesto cromógeno amarillo, (la prueba de ONPG no sustituye la prueba de fermentación de lactosa) (13).

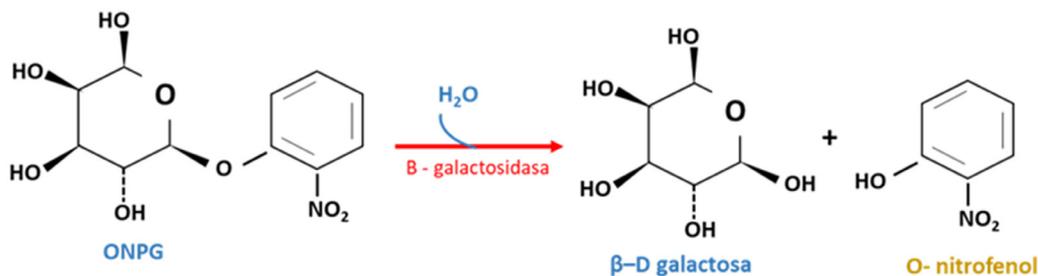


Figura 16. Producción de β -D-galactosidasa a partir de ONPG.

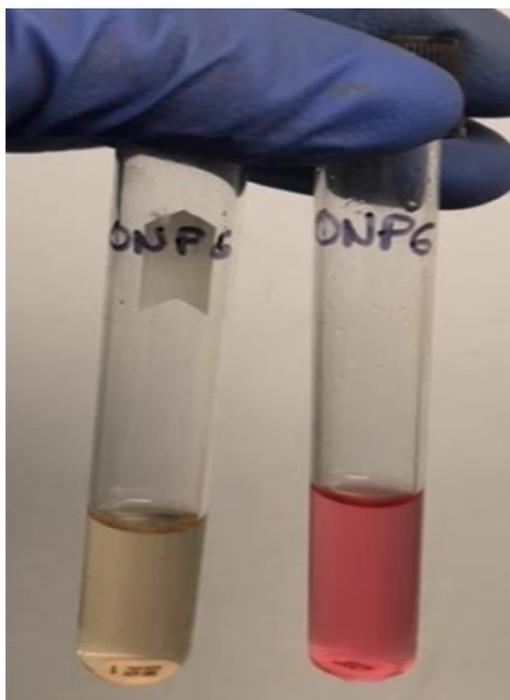


Figura 17. Prueba de ONPG (tubo de la derecha prueba negativa, izquierda prueba positiva). /L. Corrales.

Prueba pirrolidonil arilamidasa (PYR)

Es una prueba rápida que permite detectar la enzima pirrolidonil arilamidasa, en esta se utiliza como sustrato el reactivo L-pirrolidonil- beta-naftilamida (PYR), para la identificación rápida de enterococos y estreptococos.

Los microorganismos que producen esta enzima pueden hidrolizar el sustrato presente en los discos en forma rápida, con liberación del grupo pirrólico, el cual, reacciona con el reactivo revelador: N-N dimetilamino cinaldehído (32). En el pirrol, se encuentran presentes un par de electrones libres en el nitrógeno lo que incide en el mecanismo de la reacción.

Esta es una prueba presuntiva específica tanto para los estreptococos β hemolíticos del grupo A, como para los *Enterococcus* spp; y permite diferenciar los estreptococos del grupo A de otras especies de *Streptococcus* (33).

Es una prueba altamente sensible y reemplaza a la bacitracina y a la prueba de tolerancia al cloruro de sodio (crecimiento en solución de NaCl al 6.5%).

A menudo se usa esta prueba junto con la prueba de leucinaaminopeptidasa (LAP). Debe tenerse en cuenta que algunos *Staphylococcus* (*S. lugdunensis*, *S. scheleiferi*, *S. haemolyticus* y *S. intermedius*) son generalmente PYR positiva, por lo que también se puede utilizar para diferenciar especies de *Staphylococcus*, así como cocos y bacilos Gram negativos no fermentadores. (34, 35).



Figura 18. Prueba PYR en tubo/ L. Corrales

Solubilidad en bilis

El desoxicolato de sodio, sal derivada del ácido desoxicólico, ($C_{24}H_{40}O_4$) lisa la pared de la bacteria, por lo tanto, se considera una autolisina (enzima degradativa de peptidoglicano) que es liberada por la bilis a partir de la membrana de la célula y se une a los ácidos teicoicos que contienen colinas unidas al peptidoglicano (36). La autolisina entonces digiere la pared bacteriana celular resultando en lisis de la célula. Si las células crecen en etanolamina en vez de colina, la etanolamina se incorpora al ácido de teicoico y la autolisina entonces no puede lisar la pared celular. El entendimiento de la forma como trabaja la autolisina, ha conducido a sugerir que los antibióticos (incluyendo penicilina) trabajan in vivo en cooperación con la autolisina para eliminar bacterias como el neumococo (37). Esta prueba permite la diferenciación entre *Streptococcus* del grupo Viridans, los cuales son resistentes a la lisis, del *Streptococcus pneumoniae* el cual es sensible a la acción del desoxicolato (31).

A una colonia en agar sangre de la cepa sospechosa se le agrega una gota de desoxicolato de sodio al 10% y se mantiene a 37°C, durante 15 a 30 minutos, en incubación con la tapa hacia arriba. Las sales biliares hacen descender la tensión superficial en la interfase medio-membrana, provocando la descomposición de la membrana celular y acelerando el proceso autolítico natural del

microorganismo, de tal forma que pueden desaparecer o verse como colonias aplastadas (13).

Prueba de sensibilidad a la Novobiocina (Nb, 5 µg.)

Las pruebas de sensibilidad se basan en observar una característica de los microorganismos frente a una sustancia química o antimicrobiana. La prueba permite determinar si el microorganismo presenta sensibilidad o resistencia constante frente a dicha sustancia, lo cual permite confirmar o descartar la presencia del microorganismo (38).

La novobiocina es un antibiótico conformado por un éter aromático en el que el átomo de oxígeno une las diferentes partes y a partir del cual se pueden obtener: un derivado del ácido benzoico ($C_7H_6O_2$), un residuo cumarina ($C_9H_6O_2$) y el azúcar novobiosa. Estudios con Cristalografía de Rayos X han determinado que el complejo droga-receptor de la novobiocina con la ADN girasa (GyrB) muestra que el ATP y la novobiocina presentan uniones de superposición en la molécula girasa. La superposición de la cumarina y los sitios de unión del ATP es fuerte con aminocumarinas, los cuales son inhibidores competitivos de la reacción catalizada por la GyrB ATPasa (39, 40).

Los *Staphylococcus coagulasa* negativos pueden diferenciarse en dos grupos, según

sean sensibles o no a la novobiocina (5 µg). Es activo frente a *Staphylococcus epidermidis* y puede ser utilizado para diferenciarlo de *Staphylococcus saprophyticus*, que es resistente a la novobiocina, en cultivo (35). La prueba se realiza mediante siembra masiva del microorganismo en una concentra-

ción 0,5 escala de Mac Farland en medio de Agar Mueller Hinton. Luego se coloca en el centro de la siembra el disco de novobiocina (5 µg), se incuba a 37°C por 24 a 48 horas; observar si hay o no inhibición de crecimiento alrededor del disco (13).

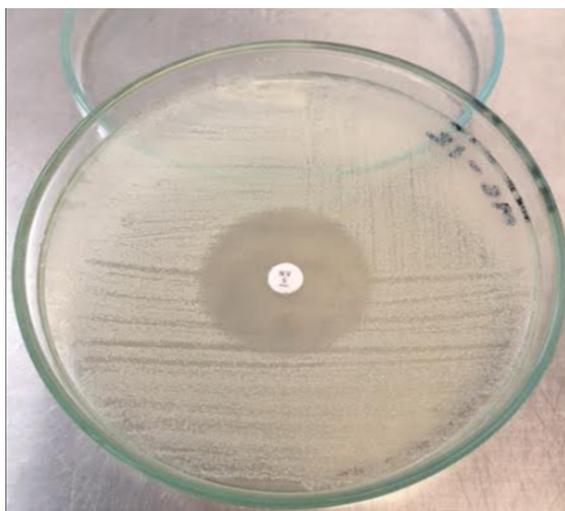


Figura 19. Prueba de sensibilidad a la Novobiocina 5 µg, microorganismo sensible. /L. Corrales.

Sensibilidad a la penicilina

La penicilina es un antibiótico que actúa sobre la formación de la pared celular de las bacterias alterando la síntesis de mureína ó peptidoglicano; este compuesto se caracteriza por ser un heteropolímero en que se encuentran de manera alternante de N-acetil-glucosamina y el ácido N-acetilmurámico (41); este compuesto es un mucopéptido que se encuentra en un 60-80% en las bacterias grampositivas y en un 20% aproximadamente en las gramnegativas. Esta prueba permite observar la sensibilidad o resistencia constante frente a dicha sustancia. La prueba se realiza mediante siembra masiva

del microorganismo en una concentración 0,5 escala de Mac Farland en medio de Agar sangre o Mueller Hinton de acuerdo con el microorganismo que se estudia. Luego se coloca en el centro de la siembra el disco de penicilina, se incuba a 37°C por 24 a 48 horas y se observa si hay o no inhibición de crecimiento alrededor del disco. En la sensibilidad de la penicilina se debe mencionar que la primera resistencia a este antibiótico fue por *Streptococcus pneumoniae* hasta que ocurrió el brote sudafricano de cepas multirresistentes a fines de la década del 70 a través de modificaciones en mosaico de los genes que codifican sus proteínas ligadoras de PEN (PBP) (42).

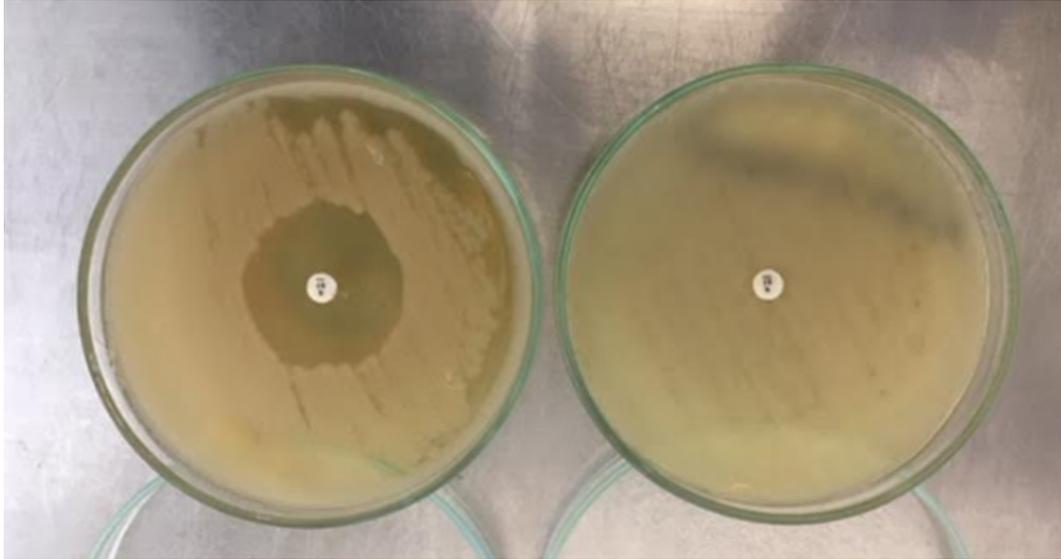


Figura 20. Prueba de sensibilidad a la penicilina 10 (U), (el cultivo de la derecha muestra sensibilidad y el de la izquierda resistencia) /L. Corrales.

Prueba de susceptibilidad a la Optoquina (P)

El clorhidrato de etildihidrocupreína (optoquina) es un compuesto químico que inhibe selectivamente el crecimiento de *Streptococcus pneumoniae*, el cual, a muy baja concentración, lisa el microorganismo por cambios en la tensión superficial en su pared (41). Esta prueba se emplea para la diferenciación de *Streptococcus pneumoniae* (sensibles) y *Streptococcus* del grupo Viridans α -hemolíticos (resistentes) con P a concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ o menos; Aunque ya se informan cepas de *S. pneumoniae* resistentes (43, 44).

Para la prueba se toman tres o cuatro colonias con asa curva, se siembra por rejilla en agar sangre un área de alrededor de 3 cm^2 y luego se coloca en el centro de la siembra el disco de optoquina de 5 $\mu\text{g/ml}$ o menores. Incubar a 37°C por 24 a 48 horas en atmósfera del 5 al

7% de CO_2 ; se observa si hay o no inhibición de crecimiento alrededor del disco (13).

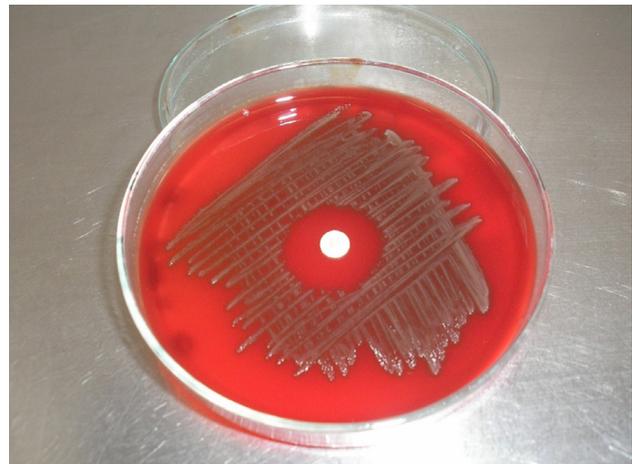


Figura 21. Prueba de sensibilidad a la optoquina/ L. Corrales.

Susceptibilidad a la Bacitracina (A) y al Trimetoprim – sulfometoxazol (SXT)

La Bacitracina, es un antibiótico producido por una mezcla de polipéptidos cíclicos de síntesis no ribosomal relacionados unos con los otros y producidos por cepas de la varie-

dad Tracy de la bacteria *Bacillus subtilis* aislado en 1945. El antibiótico está indicado para el tratamiento de bacterias Gram positivas, especialmente provenientes de heridas y mucosas. Actúa sobre la formación de la pared celular, inhibiéndola. Los *Streptococcus* beta hemolíticos del grupo A son sensibles (45).

El Trimetoprim y sulfametoxazol son dos tipos de antibióticos que por su actividad complementaria suelen utilizarse en conjunto, recibiendo la asociación el nombre de cotrimoxazol. La proporción de los dos antibióticos suele estar en una relación de 1:5, es decir, que 1 mg de trimetoprima suele asociarse a 5 mg de sulfametoxazol. La trimetoprima es un antibiótico bacteriostático

derivado de la trimetoxibenzilpirimidina, mientras que el sulfametoxazol es una sulfonamida de acción intermedia. Ambos actúan sobre la ruta de síntesis del tetrahydrofolato, cuya inhibición provoca finalmente que las bacterias afectadas no puedan sintetizar purinas (46).

Para la prueba se toman tres o cuatro colonias con el asa y se estrictan desde el centro hasta la mitad en una placa de agar sangre. Luego se coloca un disco de Bacitracina (A) de 0,04 unidades y de SXT (1.25 µg de trimetoprima/ 23,75 µg de sulfametoxazol) equidistantes en el centro de la siembra, incubar a 37 °C por 24 a 48 horas en aerobiosis. Se observa si hay o no inhibición del crecimiento bacteriano (13).

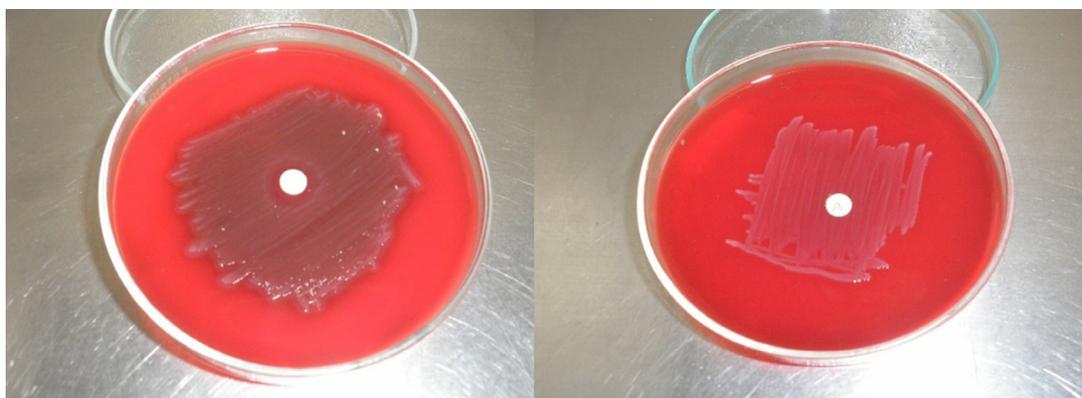


Figura 22. Prueba de sensibilidad a la Bacitracina (A) y Trimetoprim – sulfametoxazol (SXT). (Derecha A sensible e Izquierda SXT resistente) / L. Corrales.

Prueba de CAMP

Los *Streptococcus* del grupo B producen el factor CAMP (Christie, Atkins, Munich-Paterson) que es una proteína difusible y termoestable que aumenta la zona de β -hemólisis del *Staphylococcus aureus* β -lisi-

na, generando una hemólisis en forma de punta de flecha ya que éste produce esfingomielinasa C que se une a las membranas de los eritrocitos y los lisa (47, 48). Para la prueba se toma una colonia de *Staphylococcus aureus* β -lisina y se siembra en una placa de agar sangre en forma horizontal; tomar

una colonia del microorganismo en estudio y sembrarlo perpendicularmente a la estría sembrada de *Staphylococcus aureus* evitando que las estrías se toquen. Incubar a 37°C

por 18 a 24 horas en aerobiosis. Observar si se produce una zona de hemólisis ampliada en forma de punta de flecha (49).

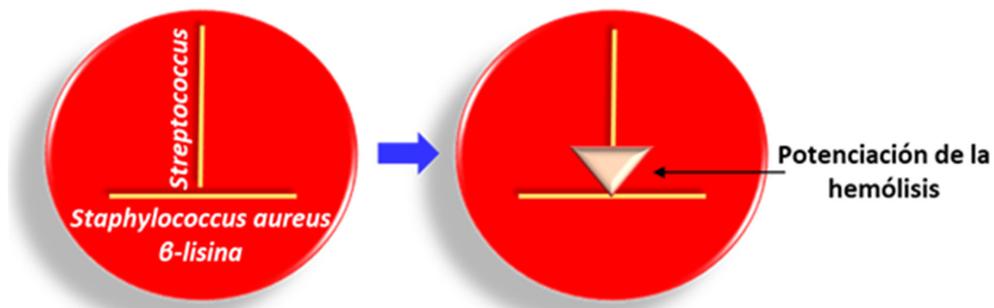


Figura 23. esquema de la técnica para la prueba de CAMP/L. Corrales.



Figura 24. Prueba de identificación del factor CAMP. (izquierda microorganismo CAMP positivo con hemólisis en punta de flecha, centro microorganismo CAMP positivo con hemólisis en rectángulo y derecha microorganismo CAMP negativo). / L. Corrales

Esta prueba es utilizada para confirmación del *Streptococcus agalactiae* también denominado Streptococcus β -hemolítico del grupo B (EGB), debido a que es un agente etiológico de un amplio espectro de infecciones, siendo un coco Gram positivo, anaerobio

facultativo, saprofita del tracto gastrointestinal y urogenital humano, pero relevante en aislamientos de gestantes pre-termino, por su alta riesgo de transmisión vertical generando afectaciones serias en el embarazo (50).

Conclusiones

Las enzimas como catalizadores y por tanto, como compuestos químicos inciden en la velocidad de las reacciones variando el mecanismo de reacción de dichos procesos; en este sentido, la cinética de una reacción química o bioquímica depende de la relación entre la disminución de la concentración de los reactivos y el consecuente aumento en la concentración de productos relacionados simultáneamente en función a la variable “tiempo”.

Las enzimas intervienen en las reacciones en su forma proteica aislada; sin embargo, hay algunas en las que esta parte, denominada apoenzima, se complementa con la acción química de un compuesto que se denomina cofactor, esta consideración reviste importancia en el contexto fisiológico y bioquímico en atención a que en ausencia del cofactor la enzima no cumple con su función catalítica.

Factores como la concentración de sustrato, el pH y la temperatura, inciden directamente en la actividad enzimática y se constituyen en puntos de regulación de dichas reacciones; así mismo, permiten controlar el curso de los procesos bioquímicos en los que intervienen.

La identificación fenotípica en bacterias se apoya en la evaluación de las características que son observables tales como la morfolo-

gía macro y microscópica, las particularidades en el desarrollo y las propiedades bioquímicas y metabólicas. En este sentido, la detección de enzimas hace parte de las técnicas fenotípicas utilizadas en la rutina del laboratorio de microbiología; sin embargo, en la práctica se presentan limitaciones asociadas a factores fisicoquímicos relacionados con las condiciones de reactividad que tienen las enzimas y que marcan el curso y la velocidad de las reacciones.

Referencias

1. Joaquín Ramírez Ramírez, Marcela Ayala Aceves. Enzimas: ¿qué son y cómo funcionan? Revista Digital Universitaria, UNAM. 2014; 15, No.12. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art91/index.html>> ISSN: 1607-6079.
2. Melo R V, Cuamatzi O. Bioquímica de los procesos metabólicos. Editorial Reverte, 2007.
3. P. Chelikani, I. Fita and P. C. Loewen. Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences. 2004; 61, 192-208.
4. J. A. Imlay. Pathways of oxidative damage. Annual Review of Microbiology. 2003; 57, 395-418.
5. P. Nicholls, I. Fita and P. C. Loewen. Enzymology and structure of catalases. Advances in Inorganic Chemistry. 2001; 51, 51-106.
6. Adelaida Díaz. La estructura de las catalasas. REB. 2003; 22 (2): 76-84
7. Poole RK. Oxygen reactions with bacterial oxidases and globins: binding, reduction and regulation. Antonie Van Leeuwenhoek. 1994;65(4):289-310.
8. Rodríguez Perón José Miguel, Menéndez López José Rogelio, Trujillo López Yoel. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cub Med Mil [Internet]. 2001 Mar [citado 2021 Oct 26]; 30(1): 15-20. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572001000100007&lng=es.

9. Jurtshuk P Jr, McQuitty DN. Use of a quantitative oxidase test for characterizing oxidative metabolism in bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1976 May;31(5):668-79
10. Corrales Ramírez Lucía Constanza, Caycedo Lozano Liliana. Principios fisicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología. *Nova* [Internet]. 2020 June [cited 2022 Mar 25];18(33):73-100. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702020000100073&lng=en. Epub Dec 29, 2020. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>.
11. Sandeep Thirunavukkarasu, Rathish K C. Evaluation of direct tube coagulase test in diagnosing staphylococcal bacteremia. *J Clin Diagn Res.* 2014 May;8(5):DC19-21
12. Qinfang Qian, Karen Eichelberger, James E Kirby. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by use of the direct tube coagulase test. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(7):2267-9.
13. Corrales L., Ávila S., Estupiñán. S., *Bacteriología: teoría y práctica*. Bogotá: 1a edición, editorial UCMC, 2013.
14. Forbes B, Sahm D, Weissfeld A. *Diagnóstico Microbiológico de Bailey & Scott*. 12 ed. Editorial Panamericana S.A. Argentina.
15. Palomino, Alvarez, Siuce, Calle. Resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus coagulasa positiva (CoPS)* aislados de perros con otitis externa. *Rev Inv Vet Perú* [Internet] 2020; 31(1) [Consultado 2022 mar 28]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v31n1/1609-9117-rivep-31-01-e17558.pdf>
16. Gerceker D, Karasartova D, Elyürek E, Barkar S, Kiyan M, Ozsan TM, Calgin MK, Sahin F. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. *J Gen Appl Microbiol.* 2009 Aug;55(4):291-4.
17. Pimenta FP, Souza MC, Pereira GA, Hirata R Jr, Camello TC, Mattos-Guaraldi AL. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. *Lett Appl Microbiol.* 2008 Mar;46(3):307-11
18. Koneman, Elmer. *Diagnóstico Microbiológico*, España: 6a edición, editorial Panamericana, 2008
19. Morejón García Moisés. Betalactamasas de espectro extendido. *Rev cubana med.* 2013; 52(4): 272-280.
20. Gonzalo Fernández Balaguer, Carmen del Águila, Carolina Hurtado Marcos y Rubén Agudo Torres. reconstrucción ancestral de una β -lactamasa y comparativa con sus homólogos actuales. *An. Real Acad. Farm.* 2021; 87,(2): 155 – 170
21. Guillermo Urquiza Ayala, Dra. Jackeline Arce Chuquimia, Dra. Gladys Alanoca Mamani. Resistencia bacteriana por beta lactamasas de espectro extendido: un problema creciente. *Rev Med La Paz.* 2018; 24(2)
22. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A funtional classification scheme for B-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:1211-33
23. C. Suarez, F. Gudiol. Estructura química de los β -lactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(2):116–129.
24. Karen Bush, 2018. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 62. pp. 1076-18.
25. Jeimmy Castañeda, Karen Gómez, Lucía Corrales, Sebastián Cortés. Perfil de resistencia a antibióticos en bacterias que presentan la enzima NDM-1 y sus mecanismos asociados: una revisión sistemática. *NOVA.* 2016; 13 (25): 95-111.
26. Stephen J. *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. Seattle: DATA; 2005
27. Calvo J, Cantón R, Fernandez F, Mirelis B, Navarro F. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España: EIMC; 2011
28. González, Zapata, Sánchez, Chávez. Resistencia a antibióticos β -lactámicos y eritromicina en bacterias de la cavidad oral. *NOVA.* [Internet] 2020; 18 (34): 27-45 [Consultado 2022 mar 28]. Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1038/2674>
29. Esparza. Bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos en Colombia: un desafío continuo al sistema de salud. *Infect.* [Internet] June 2020 vol.24 no.2 [Consultado 2022 mar 28]. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922020000200055

30. Barría C, Carrasco S, Lima C, Aguayo A, Domínguez M, KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Rev. chil. infectol.* [Internet] 2017; vol.34 no.5 476 [Consultado 2021 11 22] Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182017000500476
31. Biomérieux. rapidec® carba np [INTERNET]. [Consultado 2021 abril 22]. Disponible en <https://www.biomerieux.com.co/diagnostico-clinico/rapidec-carba-np>
32. Germán Bou, Ana Fernández-Olmos, Celia García, Juan Antonio Sáez-Nieto, Sylvia Valdezate. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Bioanálisis.* 2012; 1: 22-34.
33. Samantha T Compton , Stephen A Kania, Amy E Robertson, Sara D Lawhon, Stephen G Jenkins, Lars F Westblade, David A Bemis. Evaluation of Pyrrolidonyl Arylamidase Activity in *Staphylococcus delphini*. *J Clin Microbiol.* 2017 Mar;55(3):859-864.
34. Chen CH, Huang LU, Lee JH, Lee WH, Zhonghua Yi Xue Za Zhi. Presumptive identification of streptococci by pyrrolidonyl-beta-naphthylamide (PYR) test. (Taipei). 1997 Apr;59(4):259-64.
35. Oberhofer TR. Value of the L-pyrrolidonyl-beta-naphthylamide hydrolysis test for identification of select gram-positive cocci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1986 Jan;4(1):43-7.
36. Bombicino KA, Almuzara MN, Famiglietti AM, Vay C. Evaluation of pyrrolidonyl arylamidase for the identification of nonfermenting Gram-negative rods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007 Jan;57(1):101-3.
37. Alvin Fox. Microbiology and Immunology, University of South Carolina de Sur, School of Medicine. Chapter thirteen, Bacteriology. On Line. <https://microbiologybook.org/book/bact-sta.htm>. Consultado August 27, 2021.
38. Schmidt H, Naumann G. Phosphatase-novobiocin-mannose-inhibition test (PNMI-test) for routine identification of the coagulase-negative staphylococcal urinary tract pathogens *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*. *Zentralbl Bakteriol.* 1990 Apr;272(4):419-25.
39. Pasachova, Martínez, Muñoz. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. *NOVA publ. cient.* [Internet] 2019; 17 (32): 25-38 [Consultado 2022 mar 28]. Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1030/1419>
40. Lutz Heide. New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *Int J Med Microbiol.* 2014 Jan;304(1):31-6.
41. Lopardo. Sensibilidad disminuida a los antibióticos beta-lactámicos en estreptococos beta-hemolíticos. *Bol. CESNI.* [Internet] 2021; 28: 38 - 42. [Consultado 2022 mar 28]. Disponible en: https://www.medicinainfantil.org.ar/images/stories/volumen/2021/xxviii_1_038.pdf
42. Paweł Berczyński, Aleksandra Kładna, Irena Kruk, Hassan Y Aboul-Enein. Radical-scavenging activity of penicillin G, ampicillin, oxacillin, and dicloxacillin. *Luminescence.* 2017 May; 32(3):434-442.
43. Ercibengoa M. Assessment of the Optochin Susceptibility Test to Differentiate *Streptococcus pneumoniae* from other Viridans Group Streptococci. *Clin Lab.* 2021 Mar 1;67 (3).
44. Raddaoui A, Ben Tanfous F, Achour W, Baaboura R, Ben Hassen A. Description of a novel mutation in the *atpC* gene in optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolates from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(5):803-805.
45. Suaya JA, Fletcher MA, Georgalis L, Arguedas AG, McLaughlin JM, Ferreira G, Theilacker C, Gessner BD, Verstraeten T. Identification of *Streptococcus pneumoniae* in hospital-acquired pneumonia in adults. *J Hosp Infect.* 2021;108:146-157.
46. Barış A, Anlıaçık N, Bulut ME, Deniz R, Yücel E, Aktaş E. Evaluation of Mascia Brunelli rapid antigen test in the diagnosis of group A streptococcal pharyngitis. *Mikrobiyol Bul.* 2017 Jan;51(1):73-78.
47. Kemnic TR, Coleman M. Trimethoprim Sulfamethoxazole. 2021 Jul 18. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. PMID: 30020604. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30020604/>

48. Guo D, Xi Y, Wang S, Wang Z. Is a positive Christie-Atkinson-Munch-Peterson (CAMP) test sensitive enough for the identification of *Streptococcus agalactiae*?. *BMC Infect Dis*. 2019 Jan 3;19(1):7.
49. Savini V, Paparella A, Serio A, Marrollo R, Carretto E, Fazii P. *Staphylococcus pseudintermedius* for CAMP-test. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Mar 15;7(4):1733-4. eCollection 2014.
50. Pérez, Francia. "Utilidad del medio chromagar orientation, para la identificación de *streptococcus agalactiae* en urocultivos de gestantes en el hospital san bartolome, enero 2016 a marzo 2019, lima – Perú. [Internet] [Consultado 2022 mar 28]. Disponible en: http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/4249/T061_47021176_09489281_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y