

## ACCION COMBINADA DE LA LISOZIMA CON VARIOS ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPICOS

DR. PLUTARCO NARANJO y DRA. J. C. DE MORENO

*Departamento de Investigaciones,  
Laboratorios LIFE, Quito.*

La lisozima es una enzima de bajo peso molecular y probablemente responsable, siquiera en parte, de algunos fenómenos de inmunidad natural<sup>1</sup>. Produce lisis de algunas bacterias, siendo el *Micrococcus lysodeikticus* el más susceptible. Según se desprende de los trabajos de Brumfitt<sup>2</sup>, Callerio<sup>3</sup> y Runti<sup>4</sup>, el efecto lisante de la lisozima se debería a que esta substancia produce la ruptura de las uniones glicosídicas entre el ácido murámico y la N-acetil-glucosamina que forman parte de la pared celular bacteriana. A diferencia de lo que sucede con el *M. lysodeikticus*, el cual se desintegra rápidamente en presencia de lisozima, otras bacterias no llegan a lisarse; sin embargo, el estudio al microscopio electrónico ha revelado, en algunas de ellas, una desintegración parcial de la membrana celular.

Las investigaciones tanto *in-vitro* como en animales de laboratorio y pacientes humanos llevadas a cabo por Magrassi y colab.<sup>5</sup>, Rocchi<sup>6</sup> y muchos

otros autores<sup>7-8</sup>, demuestran que la lisozima posee cierta actividad antibiótica y sobre todo confiere protección contra varios tipos de infecciones bacterianas y virales, aún en el caso de que *in-vitro* no se hubiera producido la lisis bacteriana o viral.

El presente trabajo se desarrolló con el objeto de estudiar si la lisozima es capaz de aumentar *in-vitro*, la potencia antibacteriana de varios antibióticos y quimioterápicos.

### MATERIALES Y METODOS

Se efectuaron dos series de experiencias. En la primera se utilizó el "método del disco" y en la segunda, cultivos líquidos en la que se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada antibiótico o quimioterápico.

a) **Método del disco.**—Se utilizó un medio sólido conteniendo Nutrientagar (2,3%) y Beef extract (1%). El pH se

ajustó a 7,4 y se esterilizó en autoclave a 118° C. por media hora. Se dejó enfriar y cuando llegó a 46° se añadió un mililitro de la suspensión de bacterias, correspondientes a un cultivo de 24 horas, en medio líquido. Luego se agitó la preparación y se distribuyó en cajas de Petri estériles a razón de 20 ml. por cada una y se dejó solidificar.

Después se colocaron los discos de papel conteniendo las sustancias en estudio. Se utilizaron discos de papel de 6 mm. de diámetro, unos de la Difco (Bacto-sensitivity disks), otros de la Baltimore Biological Laboratory (sensitivity-discs, BBL) y otros, hechos en nuestro laboratorio con papel N° 740-E de Carl Schleider & Schnell.

Por cada antibiótico o quimioterápico y por cada dosis, hasta encontrar la concentración apropiada para que produzca inhibición, se emplearon 3 discos: dos conteniendo el agente en estudio: al uno se le agregó 0,01 ml. de solución salina y, al otro 0,01 ml. de una solución de lisozima que, para el *M. lysodeikticus* contenía 0,01 mcg. y para las otras bacterias 10 mcg. El tercer disco tuvo sólo la lisozima, en la misma cantidad. Para cada ensayo se hicieron de 5 a 10 duplicados. Los cultivos se incubaron a 37° C, durante 20 horas, al cabo de las cuales se midió el diámetro del halo de inhibición y se establecieron los respectivos promedios.

b) **Método de la dilución seriada.**— Se utilizó un medio líquido, correspondiente a la siguiente fórmula: peptona, 3%; glucosa, 0,3% y rojo-fenol, 6,2% de una solución al 0,04%. Se ajustó el pH a 7,4 y se esterilizó en

autoclave a 118° C, por media hora. A este medio de cultivo se agregó la suspensión de bacterias en la proporción de 0,1 ml. de un cultivo líquido de 24 horas por cada 100 ml. A esta preparación se le llamó "inóculo".

Se prepararon luego series de 10 tubos estériles. En los tubos del 2 al 10 se puso 0,5 ml. de solución salina. En los tubos 1 y 2 se puso la solución del agente antibacteriano, en un volumen de 0,5 ml., pero del tubo 2 se quitó luego 0,5 ml. que se pasó al 3 y así sucesivamente, de modo que en cada tubo hubo una concentración mitad del anterior. En una serie, se agregó lisozima en igual cantidad para todos los tubos y siempre en un volumen de 0,5 ml/tubo. En la que se ensayó sólo el antibiótico se agregó 0,5 ml/tubo de solución salina y finalmente en todos se agregó 1 ml/tubo del inóculo. Se agitó bien y se incubó a 37° C por 20 horas al cabo de las cuales se observaron los resultados. En los tubos que hubo desarrollo bacteriano hubo viraje del color, del rojo al amarillo. Se consideró como concentración mínima inhibitoria (CMI) a la inmediata superior a la del último tubo de los que habían virado de color. Después de los ensayos preliminares para determinar una escala apropiada de concentraciones, se hizo el ensayo definitivo, repetido en 5 a 10 duplicados, en cuyos valores se calculó el promedio respectivo.

Las bacterias utilizadas fueron *M. lysodeikticus*, *M. pyogenes* var. *aureus* y var. *albus* y *Escherichia coli* patógeno cepa 0119 B14, los tres últimos ob-

tenidos de pacientes.

La lista de drogas utilizadas aparecen en las tablas de resultados. Cuando fue necesario se utilizó la respectiva sal soluble.

### RESULTADOS

a) **Método del disco.**—La lisozima por sí sola produjo el característico halo de inhibición sólo cuando se la ensayó frente al *M. lysodeikticus*. El diámetro del halo de inhibición, utilizando una cantidad tan baja de lisozima como 0,01 mcg/disco fue de 8,9 mm. con una desviación estándar de

$\pm 0,4$  mm. Con las otras dos bacterias no se observó ningún halo de inhibición.

Los resultados obtenidos con los antibióticos se presentan en la tabla I. La adición de lisozima a los discos conteniendo cloranfenicol, penicilina y rovamicina no produjo aumento del halo de inhibición.

La adición de colimicina dio por resultado un aumento del 19,8% del halo de inhibición de *E. coli*, pero ningún aumento frente a las dos bacterias Gram positivas. En cambio, la kanamicina, la oxitetraciclina, y la tetraciclina, en presencia de lisozima, dieron

TABLA I

#### DIAMETRO DEL AREA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO PRODUCIDA POR VARIOS ANTIBIOTICOS SOLOS Y ASOCIADOS A LA LISOZIMA

Antibiótico	Dosis/disco	<i>M. lysodeikticus</i>	<i>M. pyogenes</i> var. <i>albus</i>	<i>E. Coli</i>
Cloranfenicol	5 mcg	20,5 mm	8,1 mm	23,1 mm
Cloranfenicol + lisozima*		20,6 mm	8,3 mm	23,3 mm
Penicilina	2 U	16,2 mm	20,2 mm	0 mm
Penicilina + lisozima		16,3 mm	20,0 mm	0 mm
Rovamicina	5 mcg	18,4 mm	7,1 mm	0 mm
Rovamicina + lisozima		18,3 mm	7,2 mm	0 mm
Colimicina	1 mg	23,2 mm	6,0 mm	16,1 mm
Colmicina + lisozima		23,1 mm	6,1 mm	19,3 mm
Kanamicina	5 mcg	17,3 mm	13,2 mm	14,1 mm
Kanamicina + lisozima		19,8 mm	15,4 mm	14,6 mm
Oxitetraciclina	5 mcg	20,2 mm	16,3 mm	20,1 mm
Oxitetraciclina + lisozima		24,1 mm	19,4 mm	20,0 mm
Tetraciclina	5 mcg	19,8 mm	15,9 mm	19,1 mm
Tetraciclina + lisozima		23,2 mm	18,1 mm	19,2 mm

\* La lisozima, por sí sola, produjo inhibición ( $8,9 \pm 0,4$  mm) sólo del *M. lysodeikticus*, con una dosis de 0,01 mcg/disco. Para *M. Pyogenes* y *E. coli* se utilizó una dosis de 10 mcg/disco de lisozima.

un halo de inhibición mayor con los gérmenes Gram positivos que varió entre un 14,4 y 20,3%, según el antibiótico y la bacteria. Estos mismos antibióticos no modificaron su halo de inhibición por la adición de lisozima cuando se ensayaron frente a *E. coli*.

Los resultados obtenidos con los quimioterápicos, se presentan en la tabla II.

La adición de lisozima al cetrimide, la furazolidona y el trimerosal, no pro-

dujo ningún aumento del halo de inhibición. En cuanto a las sulfamidas, que por sí mismas no produjeron inhibición de las dos especies de *Micrococcus*, la adición de sulfas a la lisozima, en el caso del *M. lysodeikticus*, produjo un aumento del 20% al 23% del halo de inhibición. Las dos drogas, ni solas ni asociadas inhibieron al *M. pyogenes*, en cambio, las sulfas produjeron inhibición del *E. coli*, que aumentó por la presencia de lisozima.

TABLA II

DIAMETRO DEL AREA DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO BACTERIANO, PRODUCIDA POR VARIOS QUIMIOTERAPICOS SOLOS Y ASOCIADOS A LA LISOZIMA

Quimioterápico	Dosis/ disco	<i>M. lyso- deikticus</i>	<i>M. pyogenes</i> var. <i>albus</i>	<i>E. Coli</i>
Cetrimide	1 mcg	20,8 mm	11,3 mm	9,4 mm
Cetrimide + lisozima*		20,6 mm	11,5 mm	9,5 mm
Furazolidone	100 mm	21,2 mm	9,1 mm	15,1 mm
Furazolidone + lisozima		21,6 mm	10,1 mm	15,2 mm
Thimerosal	1 mcg	22,2 mm	9,0 mm	10,2 mm
Thimerosal + lisozima		23,8 mm	10,2 mm	10,2 mm
Sulfadiazine	250 mcg	0 mm	0 mm	19,1 mm
Sulfadiazine + lisozima		10,6 mm	0 mm	22,2 mm
Sulfamethazine	250 mcg	0 mm	0 mm	19,2 mm
Sulfamethazine + lisozima		11,1 mm	0 mm	22,6 mm
Sulfathiazole	250 mcg	0 mm	0 mm	18,3 mm
Sulfathiazole + lisozima		10,8 mm	0 mm	21,6 mm

\* La lisozima, por sí sola, produjo inhibición ( $8,9 \pm 0,4$  mm) sólo del *M. lysodeikticus*, con una dosis de 0,01 mcg/disco. Para *M. pyogenes* y *E. coli* se utilizó una dosis de 10 mcg/disco de lisozima.

En todos los casos cuando hubo aumento del diámetro del halo de inhibición, por la adición de lisozima, la desviación estándar no llegó al 10% y las

diferencias fueron significativas, con  $P < 0,01$ .

b) Método de la dilución seriada.— Los resultados aparecen en la tabla III.

Con excepción de la kanamicina, se confirmaron los resultados obtenidos por el método del disco, es decir, la lisozima no aumentó la actividad anti-

bacteriana del cloranfenicol, la penicilina y la rovamicina. La CMI de cada uno de estos antibióticos fue la misma en presencia o ausencia de lisozima.

TABLA III

**CONCENTRACION MINIMA EFECTIVA DE VARIOS ANTIBIOTICOS Y QUIMIOTERAPICOS PARA IMPEDIR EL CRECIMIENTO BACTERIANO**

Antibiótico	M. pyogenes var. albus	M. pyogenes var. aureus	E. coli
Clorafenicol	6,2 mcg	8,3 U	1,9 mcg
Clorafenicol + lisozima*	6,1 mcg	8,1 U	1,8 mcg
Kanamicina	5,0 mcg	5,0 U	5,1 mcg
Kanamicina + lisozima	5,0 mcg	5,0 U	5,0 mcg
Penicilina	12,5 U	21,6 U	20,0 U
Penicilina + lisozima	12,5 U	20,8 U	20,0 mcg
Rovamicina	15,2 mcg	10,2 U	15,1 mcg
Rovamicina + lisozima	15,0 mcg	10,6 U	15,1 mcg
Colimicina	410,0 U	400,0 U	106,0 U
Colimicina + lisozima	408,9 U	400,0 U	49,5 U
Estreptomina	122,0 mcg	152,0 mcg	7,5 mcg
Estreptomina + lisozima	61,0 mcg	150,0 mcg	7,4 mcg
Oxitetraciclina	15,5 mcg	30,0 mcg	6,4 mcg
Oxitetraciclina + lisozima	7,2 mcg	14,8 mcg	6,2 mcg
Tetraciclina	31,3 cmg	33,6 mcg	15,3 mcg
Tetraciclina + lisozima	15,4 mcg	15,2 mcg	15,2 mcg
Furazolidone	10,6 mcg	15,8 mcg	10,3 mcg
Furazolidone + lisozima	10,4 mcg	15,6 mcg	10,0 mcg
Nitrofurazona	50,0 mcg	100,0 mcg	51,2 mcg
Nitrofurazona + lisozima	50,5 mcg	108,0 mcg	50,8 mcg

\* La lisozima se utilizó en la concentración de 50 mcg/ml. Por sí sola no inhibió el crecimiento de estas bacterias.

Así mismo se confirmaron los resultados de potenciación del efecto antibiótico de la colimicina frente a la *E. coli* y las dos tetraciclinas frente a los *Micrococcus*. Se agregó el ensayo con estreptomina, cuyo efecto aumentó

por la presencia de la lisozima, frente a los *Micrococcus*.

La MCI de los derivados nitrofuránicos tampoco se modificó por la adición de la lisozima.

En la tabla IV se presentan los

valores relativos del aumento de actividad antibacteriana de las varias sustancias, producida por la lisozima. Se observa que cuando el ensayo se hizo en medio sólido la potenciación es de un 13,8% a un 20%, según el antibió-

tico y la bacteria; en cambio que cuando se hace en medio líquido oscila entre el 114% y el 397%, probablemente debido a la mejor difusión, en el medio líquido, tanto de la lisozima como del antibiótico.

TABLA IV

**AUMENTO PORCENTUAL DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE VARIAS SUBSTANCIAS POR LA PRESENCIA DE LISOZIMA**

Ensayos en medios sólido y líquido

Substancia	M. lysodeikticus		M. pyogenes var:				E. coli	
	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	Líquido
Colimicina	0	—	—	0	—	0	20%	114%
Estreptomina	—	—	—	397%	—	201%	—	0
Kanamicina	14,4%	—	16,7%	0	—	0	0	0
Oxitetraciclina	19,3%	—	16,9%	216%	—	202%	0	0
Tetraciclina	17,%	—	13,8%	203%	—	221%	0	0
Sulfadiazina	10,6%	—	0	—	—	—	16%	—

### DISCUSION

Los resultados descritos revelan que la lisozima es capaz de potencializar el efecto antimicrobiano de sólo ciertos antibióticos y sólo sobre ciertas bacterias.

Los estudios de Runti<sup>4</sup> y otros demuestran que las bacterias Gram positivas tienen una proporción mucho más alta que los Gram negativos de uniones ácido acetil—murámico—1—4—N—acetil—glucosamina, que sería el sitio selectivo de acción de la lisozima y por consiguiente las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la acción lítica de esta enzima. Como indican los resultados de Hartsell y Cald-

well<sup>9</sup> el efecto lítico de la lisozima permite, inclusive, diferenciar varias especies de *Streptococcus*. Es posible que este efecto lítico de la pared celular permita, selectivamente con ciertos antibióticos una más fácil difusión hacia el interior de la bacteria y aumente así el poder antibacteriano del antibiótico o el quimioterápico. Por otra parte la potenciación o no del efecto antibacteriano por la lisozima debe depender también del mecanismo específico de acción del antibiótico o quimioterápico.

Brumfitt y Glynn<sup>10</sup> han encontrado que la destrucción del *M. lysodeikticus*, intracelularmente en los macrófagos, se debería a la lisis por la lisozima

contenida en dichos leucocitos, tanto que los mutantes lisozima-resistentes sobreviven a la acción de los macrófagos.

La administración de la lisozima a animales o pacientes humanos, podría pues, por varios mecanismos, potenciar el efecto de ciertos antibióticos y quimioterápicos; ésto parece desprenderse también de los trabajos de Imbriano y Mazzuco<sup>11</sup>. Por otra parte, Losito y Rottini<sup>12</sup>, en ensayos utilizando el método del disco, pero agregando la lisozima al medio del cultivo y no al disco con el antibiótico, no han encontrado potenciación de la actividad de las tetraciclinas, ni la estreptomycinina ni las sulfamidas; en cambio Ermolieva y colaboradores<sup>13</sup>, han demostrado que la lisozima vuelve sensibles a dosis sólo 5 veces mayores que para las cepas sensibles, a las cepas de *M. pyogenes* var. *aureus* resistentes a la penicilina y la oxitetraciclina y que además, al microscopio electrónico se descubre que dichas bacterias por acción de la lisozima se hinchan, se deforman y cambian la densidad electrónica.

La discordancia observada del efecto asociado entre kanamicina y lisozima, en los dos procedimientos de ensayo, escapa de momento, a una explicación plausible.

#### RESUMEN

En ensayos *in-vitro* se investigó si la lisozima aumenta la actividad antibacteriana de varios quimioterápicos y antibióticos. En una serie de experiencias se utilizó el sistema de "dis-

cos" y en otra, el de cultivo de las bacterias en medios líquidos apropiados a los que se agregaron las drogas. En el primer caso el efecto antibacteriano se evaluó en términos de diámetro del área de inhibición y en el segundo, como concentración mínima efectiva para inhibir completamente el desarrollo bacteriano.

Se encontró que la lisozima potencializa el efecto de las sulfamidas tanto sobre bacterias Gram positivas como sobre Gram negativas, de la colimicina sobre gérmenes Gram negativos y del grupo de derivados tetraciclínicos así como de la estreptomycinina, sobre gérmenes Gram positivos y negativos.

La penicilina, el clorafenicol y otros agentes antibacterianos no fueron potencializados, en su efecto, por la lisozima.

#### SUMMARY

*In-vitro* investigations have been made to study whether lysozyme increases the antibacterial activity of several chemotherapeutic agents and antibiotics. In the first series of experiments the "disc method" was used and in the second series of experiments liquid culture media were used where the bacteria were allowed to grow in the presence of the different concentrations of a chemotherapeutic agent or an antibiotic. In the first case antibacterial effect was evaluated by measuring the diameter of the halo of inhibition and in the second case the minimal effective concentration of the active agent necessary to inhibit com-

pletely the growth was established.

It was found that lysozyme enhanced the effect of sulfonamides both in the Gram-positive and Gram-negative bacteria. It also enhanced the effect of colistin (Colymycin) on the Gram-negative germs as well as that of the group of tetracyclines and streptomycin in the Gram-positive germs. Penicillin, chloramphenicol and other antibacterial agents were not potentiated by lysozyme.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.—DEL CAMPO, A., FAZZI, P. L.: Azione del lisozima su alcuni fattori umorali e cellulari dell'immunità naturale. En: Atti del 1º Symposium Internazionale sul lisozima di Fleming. Milano, p. 159, 1959.
- 2.—BRUMFITT, W.: Alteration of bacterial sensitivity to lysozyme by simple chemical treatment. Idem. p. 88.
- 3.—CALLERIO, C.: Osservazioni sul dosaggio biologico del lisozima. Idem. p. 153.
- 4.—RUNTI, C.: Recenti progressi sull'attività lisante e farmacologica del lisozima. Atti del 2º Symposium Internazionale sul lisozima di Fleming. Milano, I. Sezione, p. 35, 1961.
- 5.—MAGRASSI: Le basi sperimentali per l'applicazione del lisozima nelle infezioni virali. Atti del 1º Symposium Internazionale sul lisozima di Fleming. Milano, p. 219, 1959.
- 6.—ROCCHI, F.: Il lisozima nelle malattie infettive, Idem, p. 304.
- 7.—NARANJO, P., DE LA TORRE, F.: Trattamento di infezioni virali con lisozima. Atti. del 2º Symposium Internazionale sul lisozima di Fleming. Milano, II. Sezione, p. 23, 1961.
- 8.—PLETCITYI, D. F., MONAYENKOV, A. M., OSTROVSKY, U. B.: Le lysozyme et l'immunogenese. Idem, III. Sezione, p. 1.
- 9.—HARTSELL, S. E., CALDWELL, J.: Lysozyme and the differentiation of group D streptococci. Idem. I. Sezione, p. 1.
- 10.—BRUMFITT, W., GLYNN, A. A.: The intracellular killing of *M. lysodeikticus* by macrophages and by polymorphonuclear leucocytes. Idem, I. Sezione, p. 47.
- 11.—IMBRIANO, E., MAZZUCCO, P.: Actividad sinérgica de la lisozima sobre diversos antibióticos. Idem, I. Sezione, p. 155.
- 12.—LOSITO, G., ROTTINI, E.: Lisozima e sensibilità batterica agli antibiotici "in vitro". Idem, III. Sezione, p. 81.
- 13.—ERMOLIEVA, Z. V., FURER, N. M., RAVITCH, I. V., BRAUDE, A. I., JAU-KOVSKAYA, N. A., BALEZINA, T. I., VIEDMINA, E. A., NAVACHIN, S. M., SOBOLEV, V. R.: Le lysozyme, étude expérimentale et application clinique. Idem. I. Sezione, p. 13.