

17.02

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas



\* 5 3 0 9 5 8 2 8 2 4 \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae*.  
Patrón de proteínas fijadoras de penicilina (PBPs)  
como marcador epidemiológico

TESIS DOCTORAL

Rosario Muñoz Moreno

Madrid 1.991



ARCEIVO

**Autora:**

ROSARIO MUÑOZ MORENO

**Resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae*.  
Patrón de proteínas fijadoras de penicilina (PBPs)  
como marcador epidemiológico.**

**Directora:**

Cecilia Martín-Bourgon  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Consejera Técnica  
Instituto de Salud "Carlos III"

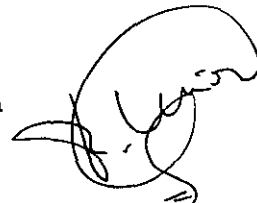
**Tutora:**

Margarita Flores  
Doctora en Ciencias Biológicas  
Profesora Titular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Complutense de Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
Facultad de Ciencias Biológicas

Año 1.991

Memoria del trabajo que presenta  
**ROSARIO MUÑOZ MORENO**  
para optar al grado de Doctor  
en Ciencias Biológicas



Madrid, 30 de Abril de 1.991

Vº Bº

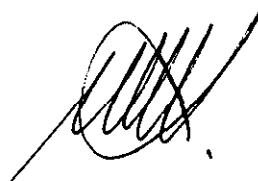
LA DIRECTORA DE LA TESIS

Cecilia Martín Bourgon

Fdo. Cecilia Martín-Bourgon

Vº Bº

LA TUTORA DE LA TESIS



Fdo. Margarita Flores

**CECILIA MARTIN-BOURGON**, Consejera Técnica del Instituto de Salud "Carlos III"

**CERTIFICA** que:

el presente trabajo, realizado por ROSARIO MUÑOZ MORENO para optar al grado de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS titulado: "Resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae*. Patrón de proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) como marcador epidemiológico", ha sido realizado bajo su dirección en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (C.N.M.V.I.S.) del Instituto de Salud "Carlos III" y considera que está preparado para su presentación.

Y para que conste, extiende el presente certificado en Madrid a 30 de Abril de Mil novecientos noventa y uno.

C. Martín Bourgon

A mis padres

Agradezco a Cecilia Martín-Bourgon su dirección y útiles discusiones durante estos años de trabajo.

A Margarita Flores por su ayuda a lo largo del trabajo experimental y de la preparación del manuscrito.

A Alexander Tomasz por la confianza depositada en mí y por su valiosa colaboración en el desarrollo experimental sin la cual no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

A Julio Casal, Asunción Fenoll, Dolores Vicioso y a todo el personal del Laboratorio de Neumococos del C.N.M.V.I.S. por el apoyo y amistad que recibí de ellos en todo momento.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Rockefeller, especialmente a Marilyn Chung por su ayuda técnica y amistad.

A Brian Spratt y Jim Musser por su colaboración en algunas de las técnicas utilizadas en este trabajo.

A Carmen Cabellos por su inestimable apoyo y amistad.

A el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FISss) por la concesión de una Beca de Iniciación a la Investigación.

A La Organización del Tratado del Atlántico Norte (OTAN) por su beca del Programa de Colaboración en Investigación.

Gracias a todos ellos y a mi familia y amigos ha sido posible la realización de este trabajo.

**INDICE**

## INDICE

## 1. INTRODUCCION

1.1. EL ORGANISMO: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
1.1.1. Características biológicas.....	2
1.1.2. Características estructurales	
1.1.2.1. Cápsula.....	6
1.1.2.2. Pared celular.....	8
1.1.2.3. Membrana plasmática.....	12
1.1.3. Marcadores epidemiológicos.....	13
1.1.3.1. Marcadores en <i>S.pneumoniae</i> .....	15
1.2. RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS	
1.2.1. Antibióticos $\beta$ -lactámicos.....	18
1.2.2. Proteínas fijadoras de penicilina.....	20
1.2.3. Bases bioquímicas y genéticas de la resistencia.....	22
1.3. RESISTENCIA A PENICILINA EN <i>S. pneumoniae</i>	
1.3.1. Epidemiología.....	25
1.3.2. Mecanismo de resistencia.....	28

## 2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS..... 35

## 3. MATERIAL Y METODOS

3.1. CEPAS Y AISLADOS BACTERIANOS	
3.1.1. Cepas de laboratorio.....	39
3.1.2. Aislados clínicos.....	40
3.2. MATERIALES	
3.2.1. Productos y reactivos.....	49
3.2.2. Medios de cultivo.....	50

## VIII

### 3.3. METODOS

3.3.1. Crecimiento bacteriano.....	53
3.3.2. Serogrupado (reacción de precipitación capsular).....	53
3.3.3. Efectos de la penicilina en los cultivos	
3.3.3.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	54
3.3.3.2. Curvas de lisis.....	55
3.3.3.3. Curvas de supervivencia.....	55
3.3.4. Pase de los cultivos	
3.3.4.1. Pases consecutivos <i>in vivo</i> .....	56
3.3.4.2. Pases consecutivos <i>in vitro</i> .....	57
3.3.4.3. Pases en medio conteniendo penicilina.....	57
3.3.5. Marcaje de las Proteínas fijadoras de penicilina (PPBs)	
3.3.5.1. Marcaje de las PBPs <i>in vivo</i> .....	57
3.3.5.2. Electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida.....	58
3.3.5.3. Fluorografía y detección de PBPs.....	59
3.3.6. Transformación genética	
3.3.6.1. Preparación de DNA cromosómico.....	60
3.3.6.2. Preparación de células en estado competente.....	62
3.3.6.3. Transformación.....	63
3.3.6.4. Aislamiento de transformantes.....	64
3.3.7. Estudio de los péptidos de pared celular	
3.3.7.1. Preparación de paredes celulares.....	65
3.3.7.2. Digestión con autolisina.....	66
3.3.7.3. Análisis de los péptidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	67

## IX

3.3.8. Electroforesis de isoenzimas	
3.3.8.1. Preparación de los extractos.....	69
3.3.8.2. Electroforesis en geles de almidón...	70
3.3.8.3. Teñido para enzimas específicas.....	70
3.3.9. Digestión de DNA cromosómico	
3.3.9.1. Digestión con endonucleasas de restricción.....	73
3.3.9.2. Electroforesis en geles de agarosa...	74
3.3.10. Digestión del gen de la PBP 2B y 2X	
3.3.10.1. Amplificación génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	75
3.3.10.2. Digestión y marcaje de fragmentos...	76
3.3.10.3. Electroforesis.....	77

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ESTUDIO DE LA LISIS Y PERDIDA DE VIABILIDAD INDUCIDA POR PENICILINA

4.1.1. Lisis de los cultivos mediante tratamiento con penicilina.....	79
4.1.2. Supervivencia de los cultivos después del tratamiento con penicilina.....	83
4.1.3. Relación "lisis-supervivencia" en cultivos de <i>S.pneumoniae</i> .....	84

### 4.2. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE BAJO NIVEL A PENICILINA ("BORDERLINE") EN AISLADOS CLINICOS DE *S. pneumoniae* EN ESPAÑA

4.2.1. Distribución de serogrupos en neumococos con distinto nivel de resistencia a penicilina....	88
4.2.2. Estudio de las bases genéticas de la resistencia de bajo nivel a penicilina .....	89

4.3. ESTUDIO DE LOS PATRONES DE PBPs EN AISLADOS CLINICOS DE <i>S.pneumoniae</i>	
4.3.1. Unico patrón de PBPs en aislados sensibles..	94
4.3.2. Múltiples patrones de PBPs en aislados resistentes.....	95
4.3.3. "Familias" de patrones PBPs en aislados resistentes.....	99
4.3.4. Reproducibilidad y estabilidad del patrón de PBPs	
4.3.4.1. Estabilidad durante pases sucesivos <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> y en presencia de antibiótico.....	111
4.3.4.2. Estabilidad durante transformación genética.....	113
4.4. CARACTERIZACION DE LOS AISLADOS QUE COMPARTEN UN PATRON DE PBPs	
4.4.1. Serotipado de los aislados.....	122
4.4.2. Análisis de los péptidos de pared celular.....	123
4.4.3. Análisis de isoenzimas.....	128
4.4.4. Análisis de los fragmentos obtenidos al digerir enzimáticamente DNA cromosómico.....	131
4.4.5. Análisis de los fragmentos obtenidos al digerir enzimáticamente los genes que codifican para la PBP 2B y PBP 2X.....	135
<b>5. DISCUSION</b>	
5.1. Distribución de serogrupos en neumococos resistentes a penicilina.....	142

5.2. Incidencia de aislados clínicos de neumococos tolerantes a penicilina.....	147
5.3. Patrón de PBPs en los transformantes resistentes a penicilina.....	151
5.4. Patrón de PBPs como marcador epidemiológico en neumococos resistentes a penicilina.....	154
5.5. Asociación clonal entre aislados que comparten un patrón de PBPs.....	158
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>163</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>169</b>

**TABLAS**

Tabla I	Identificación presuntiva de estreptococos
Tabla II	Designación danesa de tipo y fórmula antigénica de los 84 serotipos neumocócicos
Tabla III	Trabajos publicados desde 1.984 describiendo la existencia de neumococos resistentes a penicilina
Tabla IV	Propiedades de los aislados clínicos utilizados en este estudio
Tabla V	Composición del medio semisintético "medio C"
Tabla VI	Enzimas analizadas y sistemas recomendados para su estudio
Tabla VII	Lisis producida por penicilina (10 x CMI)
Tabla VIII	Supervivencia frente a penicilina (10 x CMI)
Tabla IX	Características epidemiológicas de los aislados pertenecientes a la misma familia de PBPs
Tabla X	Frecuencias de transformación al utilizar distintas cepas como receptoras de DNA
Tabla XI	Frecuencias obtenidas en los experimentos de transformación
Tabla XII	Resistencia hacia distintos antibióticos mostrada por los transformantes (valores de CMI)
Tabla XIII	Composición peptídica de las paredes celulares de neumococos
Tabla XIV	Tipos electroforéticos de 11 isoenzimas en neumococos resistentes a penicilina incluidos en familias de patrones de PBPs

**FIGURAS**

- Figura 1 Fotografía al microscopio electrónico de una sección delgada de un neumococo no capsulado (cepa R6)
- Figura 2 Diagrama esquemático de la pared celular de *S.pneumoniae*
- Figura 3 Estructura de los péptidos laterales del peptidoglicano aislados de paredes celulares de *S.pneumoniae*
- Figura 4 Proteínas fijadoras de penicilina de *Streptococcus pneumoniae* en la cepa sensible R6 y en el aislado resistente SA 8249
- Figura 5 Curvas de lisis producidas por penicilina
- Figura 6 Curvas de supervivencia después del tratamiento con penicilina
- Figura 7 Distribución de los serogrupos de 961 neumococos aislados en España durante el período 1.988-1.990 en función del valor CMI a penicilina
- Figura 8 Afinidad hacia penicilina de las PBPs de un aislado con bajo nivel de resistencia a penicilina (0,06µg/ml) y del transformante Pen 0,015t
- Figura 9 Patrón de PBPs de una muestra de aislados procedentes de Hungría con diferente nivel de resistencia a penicilina
- Figura 10 Patrón de PBPs de un aislado resistente mostrando afinidad disminuida hacia penicilina
- Figura 11 "Familias" de patrones de PBPs encontradas en neumococos resistentes
- Figura 12 Patrones de PBPs de aislados incluidos en las Familias 1 y 2 (CMI 0,25-0,5µg/ml)
- Figura 13 Patrón de PBPs de aislados incluidos en las Familias 4,5 y 6 (CMI>1µg/ml)

- Figura 14 Confirmación de la existencia de la Familia 6 de patrón de PBPs
- Figura 15 Identidad en el patrón de PBPs (Familia 5) de aislados procedentes de España y de Estados Unidos
- Figura 16 Estabilidad y reproducibilidad del patrón de PBPs
- Figura 17 Patrón y afinidad hacia penicilina de las PBPs de los transformantes Pen 0,05t
- Figura 18 Patrón y afinidad hacia penicilina de las PBPs de los transformantes Pen 1t
- Figura 19 Cromatogramas de los péptidos de pared celular de neumococos
- Figura 20 Patrón de restricción con *Hind*III del DNA cromosómico de aislados incluidos en la Familia 4 de PBPs
- Figura 21 Patrón de restricción con *Hind*III del DNA cromosómico de aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs
- Figura 22 Patrón de los fragmentos originados después de la digestión con *Sty*I en el gen de la PBP 2B de aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs
- Figura 23 Patrón de los fragmentos originados después de la digestión doble con *Dde*I y *Mse*I en el gen de la PBP 2X de aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs

## **INTRODUCCION**

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. EL ORGANISMO: *Streptococcus pneumoniae*

#### Clasificación:

Familia STREPTOCOCCACEAE (Buchanan y Gibbons, 1974)

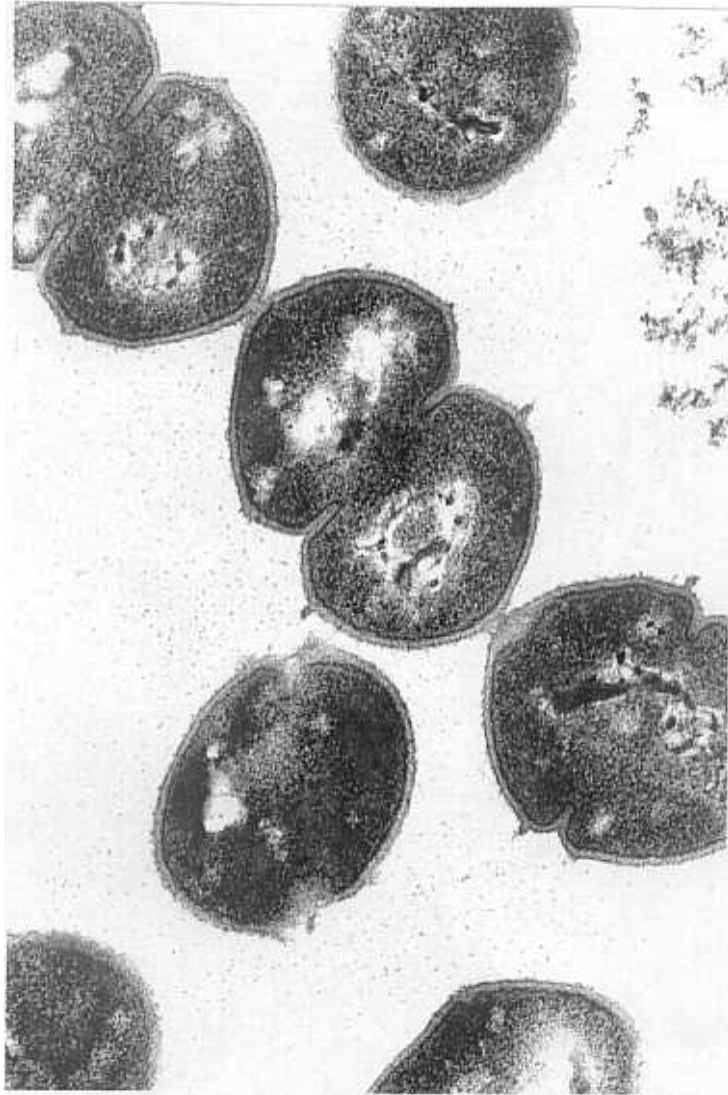
Género *Streptococcus* (Rosenbach, 1884)

Especie *Streptococcus pneumoniae* (Chester, 1901)

#### 1.1.1. CARACTERISTICAS BIOLÓGICAS

*Streptococcus pneumoniae* (neumococo) cuando se aísla a partir de su hábitat natural (tracto respiratorio superior) presenta forma esférica, con un tamaño de 0,5 a 1,25  $\mu\text{m}$ ; típicamente crece en pares, aunque a veces puede aparecer de forma individual o formando cortas cadenas. La Figura 1 muestra el aspecto que ofrecen los neumococos en una fotografía tomada con microscopio electrónico. El neumococo es capsulado, inmóvil y no forma esporas. La tinción de Gram es positiva en células jóvenes pero puede perderse en cultivos viejos, los cuales aparecen teñidos como Gram-negativos. Los neumococos producen una fuerte hemólisis en placas de agar-sangre cuando se incuban aerobíamente. Poseen un contenido G+C (Guanina y Citosina) en su DNA de 38,5 moles% calculado mediante análisis químico (Rotta, 1986).

Los patrones clínicos de la infección neumocócica en hombre son numerosos, incluyendo neumonía, meningitis, otitis media y algunos otros menos frecuentes como abscesos, conjuntivitis, pericarditis y artritis.



**Figura 1**

Fotografía al microscopio electrónico de una sección delgada de un neumococo no capsulado (cepa R6)

La Tabla I refleja las pruebas más sencillas utilizadas para la identificación presuntiva de las especies de estreptococos (Facklam y Carey, 1985). Las pruebas realizadas en los laboratorios clínicos para la identificación presuntiva de neumococos son:

1. SOLUBILIDAD EN SALES BILIARES. Algunos agentes tensoactivos como bilis, sales biliares y desoxicolato sódico producen la lisis de los neumococos como resultado de la activación de las enzimas autolíticas (Mosser y Tomasz, 1975). La prueba se realiza utilizando suspensiones salinas de células vivas, la mayoría de los neumococos se lisan rápidamente mientras que no lo hacen los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos. Sin embargo, algunos aislados de estreptococo pueden mostrar una tendencia a la disolución en presencia de estos agentes; por ello, esta prueba resulta muy útil pero no rigurosa para la identificación de neumococos.

2. SENSIBILIDAD A OPTOQUINA. Esta prueba se basa en la diferente sensibilidad a optoquina (hidrocloruro de etilhidrocupreina) que presentan los neumococos y los estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos (Bowers y Jeffries, 1955). La prueba se realiza utilizando la técnica de discos de papel de filtro de forma semejante a la técnica empleada para probar la sensibilidad bacteriana a agentes antimicrobianos. La optoquina tiene una actividad específica contra neumococos aunque recientemente se ha descrito la aparición de aislados clínicos de neumococo resistentes a este compuesto (Muñoz et al., 1989).

3. IDENTIFICACION SEROLOGICA. El método más seguro para la identificación de neumococos es una prueba serológica conocida como reacción de *quellung* o de precipitación capsular; en esta reacción el suero antineumocócico se une al polisacárido

Tabla I

Identificación presuntiva de estreptococos

	Categorías						
	1	2	3	4	5	6	7
	—	—	—	—	—	—	—
Hemólisis	$\beta$	$\beta^*$	$\beta$	$\alpha, \beta$	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$
Sensibilidad a:							
Bacitracina	+	-*	-*	-	-	-*	+/-
SXT <sup>a</sup>	-	-	+	-	+	+	?
Hidrólisis de:							
Hipurato	-	+	-	-*	-	-*	-
PYR <sup>b</sup>	+	-	-	+	-	-	-
CAMP <sup>c</sup>	-	+	-	-	-	-	-
Bilis-esculina	-	-	-	+	+	-*	-
Crecim. 6,5% ClNa	-	+	-	+	-	-	-
Bilis y Optoquina <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	+

Categorías: 1, estreptococos del Grupo A; 2, Grupo B; 3, estreptococos  $\beta$ -hemolíticos que no son de los Grupos A, B o D; 4, Grupo D, enterococos; 5, Grupo D, no enterococos; 6, grupo viridans; 7, neumococo

Símbolos: +, reacción positiva o sensible; -, reacción negativa o resistente; \*, ocurren excepciones ocasionalmente.

<sup>a</sup> SXT, trimetoprim y sulfametoxazol; <sup>b</sup> PYR, L-pyrrilidonil- $\beta$ -naftilamida; <sup>c</sup> CAMP, producción del Factor CAMP; <sup>d</sup>, Solubilidad en bilis y sensibilidad a optoquina

capsular específico originando un aumento en la visibilidad de la cápsula. En neumococos existen 84 polisacáridos capsulares distintos que son la base para la diferenciación de los neumococos en 84 serotipos. Algunos de estos serotipos presentan reactividad serológica cruzada lo que indica la posesión de determinantes antigénicos comunes, los serotipos que poseen antígenos comunes se agrupan en serogrupos. En la actualidad, se han descrito 46 serogrupos neumocócicos distintos.

### **1.1.2. CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES**

Para comprender mejor el mecanismo de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se deben revisar algunos aspectos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos del neumococo. El neumococo presenta la estructura típica de una bacteria Gram-positiva, en la que se diferencian la cápsula, la pared celular y la membrana plasmática.

#### **1.1.2.1. CAPSULA**

La cápsula en neumococos consiste en polisacáridos complejos que forman geles hidrofílicos en la superficie de los organismos. Estos polisacáridos son antigénicos y forman la base para la separación de los neumococos en 84 serotipos diferentes. Se conoce la composición de la mayoría de estos polisacáridos capsulares, aunque sólo se ha determinado la estructura en treinta de ellos (Jennings, 1990). Por ejemplo, el polisacárido capsular presente en neumococos de serotipo 3 es uno de los más sencillos y consiste en unidades repetidas de

ácido celobiurónico unidas mediante enlaces  $\beta$ 1-3 glucosídicos (Reeves y Goebel, 1941).

El polisacárido capsular es el responsable de la patogenicidad del neumococo. Aunque el polisacárido por sí mismo no es tóxico para el hombre, la cápsula protege a los neumococos de la fagocitosis, resultando esencial para la virulencia (Dhingra et al., 1977). Por ello, las cepas capsuladas son patógenas para el hombre, mientras que los neumococos no-capsulados (rugosos) no son patógenos siendo rápidamente fagocitados. Cultivos de neumococos capsulados generan variantes no-capsuladas en una proporción definida pero muy baja.

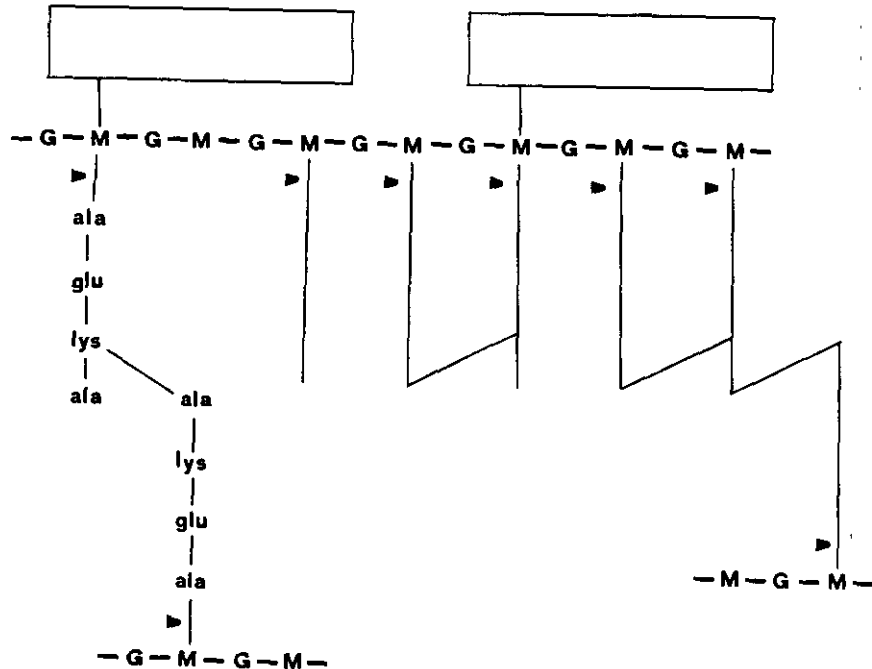
En base a los polisacáridos capsulares inmunológicamente distintos se han identificado 46 serogrupos neumocócicos, observándose que sólo unos pocos grupos originan la mayoría de las infecciones neumocócicas; por ejemplo, en España, sólo 10 serogrupos representan el 70,5% de los neumococos aislados de infección sistémica (serogrupos 3, 6, 23, 19, 9, 1, 5, 8, 7 y 14) (Fenoll et al., 1991). También se conoce que en niños varía la distribución de serogrupos, siendo los más frecuentes 23, 6, 19 y 15 (Latorre et al., 1988).

La inmunización con polisacárido capsular protege contra una infección posterior del tipo homólogo, siendo esta la base de la vacuna antineumocócica. Estudios recientes indican que se puede conseguir un alto nivel de protección, aproximadamente un 90%, con la vacuna 23-valente actual (Hager et al., 1990) (Verhaegen et al., 1990) (Fenoll et al., 1991). La formulación de esta vacuna está basada en la prevalencia de los serotipos de los neumococos aislados en Estados Unidos y Europa.

#### 1.1.2.2. PARED CELULAR

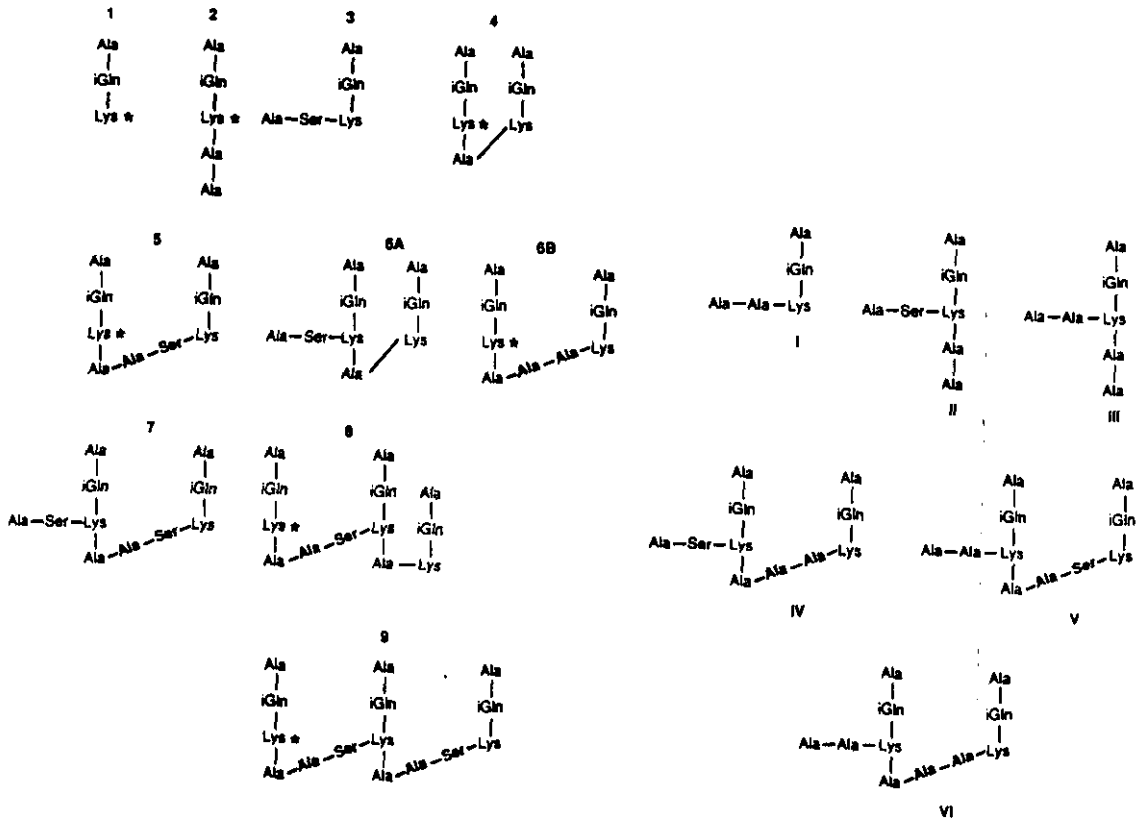
La pared celular bacteriana constituye un esqueleto covalente continuo que determina la forma de la célula y le confiere la fuerza mecánica necesaria para sobrevivir en un ambiente hipotónico. La pared celular de *Streptococcus pneumoniae* interacciona con el sistema del complemento e induce algunos de los síntomas de la enfermedad bacteriana en el hombre (Ripley-Petzoldt et al., 1988) (Tomasz y Saukkonen, 1989). La Figura 2 muestra una representación esquemática de la pared celular neumocócica, compuesta por peptidoglicano y ácidos teicoicos (Mosser y Tomasz, 1975); el peptidoglicano, o mureina, es el componente común de todas las paredes celulares bacterianas y sobre su ensamblaje actúan los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

El peptidoglicano es el componente principal de la pared celular representando un 60% del volumen total, mantiene la forma de la bacteria y la protege de cambios de presión osmótica. El peptidoglicano es una molécula de gran tamaño, rígida y compuesta por dos componentes básicos: N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico, unidos alternativamente mediante enlaces  $\beta$ 1-4 (Figura 3). Cada residuo de ácido N-acetil murámico se encuentra covalentemente unido a subunidades tetrapeptídicas (mayoritariamente L-alanina, ácido-D-glutámico, L-lisina y D-alanina) las cuales se encuentran enlazadas unas a otras mediante enlaces en dos planos formando dímeros y trímeros que originan una capa tridimensional. El esqueleto peptídico de las paredes celulares del neumococo se ha determinado recientemente (García-Bustos et al., 1987). La Figura 3 muestra la estructura de los péptidos de pared de neumococos. Aproximadamente el 40% de todos los residuos de L-lisina participan en enlaces cruzados con péptidos laterales;



**Figura 2**

Diagrama esquemático de la pared celular de *S. pneumoniae*. Las cadenas de glucano están representadas por -G-M-G-M- que indican los residuos de N-acetil glucosamina (G) y de ácido N-acetil murámico (M). Las cadenas peptídicas laterales están representadas como líneas dispuestas verticalmente. En el lado izquierdo del diagrama aparece especificada la secuencia de aminoácidos de los péptidos (Ala-Glu-Lys-Ala). El rectángulo representa el ácido teicoico de pared conteniendo colina. Los triángulos (▶) indican el enlace sensible a la autolisina entre los residuos de L-alanina y ácido-N-acetil murámico (modificado de Tomasz, 1981).



**Figura 3**

Estructura de los péptidos laterales del peptidoglicano aislados de paredes celulares de *S. pneumoniae*. Los números árabes y romanos identifican los péptidos observados en los perfiles de elución mediante cromatografía líquida de alta resolución HPLC. Los asteriscos señalan residuos libres de lisina (no sustituidos) (García-Bustos y Tomasz, 1990)

por otra parte, el 77% de todos los péptidos de pared está constituido por 3 monómeros, 5 dímeros y 2 trímeros (péptidos 1 a 9 en la Figura 3). Se han encontrado dos tipos de uniones: una unión directa entre el residuo D-alanina en la posición 4 de una cadena lateral donante y el residuo L-lisina en la posición 3 de un péptido anterior, y uniones alanil-serina o alanil-alanina entre ambos residuos.

Los ácidos teicoicos son los componentes secundarios de la pared celular de las bacterias Gram-positivas. Su principal función es la de actuar como resinas de intercambio iónico ya que representan los polímeros polianiónicos más cargados de la superficie de las bacterias Gram-positivas y proveen a la célula de una carga superficial que facilita el transporte de solutos (Baddiley, 1970). Además, los ácidos teicoicos participan en fenómenos fisiológicos como modificadores de la sensibilidad celular a agentes líticos de membrana (Davie y Brock, 1966) o activadores de la ruta alternativa del complemento (Winkelstein y Tomasz, 1978). Los ácidos teicoicos son polímeros lineales, compuestos por residuos alternantes de ribitol y de fosfato unidos mediante enlaces de tipo éster. Los ácidos teicoicos se unen covalentemente al peptidoglicano de la pared celular a través de residuos de ácido-N-acetil murámico (Mosser y Tomasz, 1975) (Figura 2).

Los neumococos tienen un requerimiento nutricional absoluto de colina, ya que la eliminación de colina en el medio origina el cese del crecimiento (Tomasz, 1967). Los requerimientos nutricionales se pueden satisfacer con etanolamina, sin embargo esta modificación tiene unas consecuencias muy importantes en la estructura de la pared celular: las células hijas permanecen unidas después de la división celular, las células pierden la capacidad de autólisis, la solubilidad en desoxicolato y la

capacidad para transformar. El 85% de la colina presente en neumococos se encuentra como componente estructural de los ácidos teicoicos de pared celular y el 15% restante es el "antígeno de Forssman" o ácido lipoteicoico de membrana.

#### 1.1.2.3. MEMBRANA PLASMÁTICA

En la membrana plasmática existen algunos componentes importantes para comprender el efecto bactericida y bacteriolítico de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Uno de estos componentes es la enzima autolítica o autolisina que hidroliza las uniones amida entre los residuos de ácido-N-acetil murámico y L-alanina del peptidoglicano de pared celular; su actividad está regulada por los residuos de colina presentes en los ácidos teicoicos de pared y en el ácido lipoteicoico de membrana. La autolisina neumocócica está implicada en numerosos procesos fisiológicos como son la separación de las células hijas al final de la división celular (Tomasz, 1968), liberación de la progenie fágica (Ronda et al., 1977), etc.; además, la autolisina es la responsable de la lisis inducida por detergentes característica de los neumococos (Mosser y Tomasz, 1975) y de los efectos irreversibles originados por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Tomasz y Holtje, 1977).

Cuando los neumococos se exponen a penicilina (o a otro inhibidor de la pared celular) experimentan una rápida pérdida de viabilidad acompañada de una activación de la autolisina. La aparición conjunta de lisis y muerte celular en estas bacterias condujo a la idea que la causa de la muerte celular era la actividad incontrolada de la autolisina; sin embargo, existen

bacterias "tolerantes" con un sistema autolítico deficiente, las cuales en respuesta a antibióticos bacteriolíticos detienen su crecimiento no experimentando autólisis. Recientemente se ha postulado que la penicilina puede destruir los neumococos por dos mecanismos diferentes: uno que implica la activación de la autolisina y otro mecanismo independiente de autolisina (Moreillon et al., 1990).

En la membrana plasmática también se encuentran las enzimas sensibles a penicilina implicadas en la síntesis y organización del peptidoglicano durante el crecimiento y la división celular. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se unen covalentemente a algunas de las enzimas que inhiben, por ello las proteínas sensibles a penicilina se pueden detectar como las proteínas que resultan marcadas mediante penicilina radiactiva (Blumberg y Strominger, 1974) (Spratt y Strominger, 1976). En secciones siguientes se realizará una descripción detallada de estas proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) y de su función en la biosíntesis de pared celular.

### 1.1.3. MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS

Durante los últimos años se han desarrollado un gran número de técnicas especiales para reconocer y tipar la mayoría de los organismos patógenos; estos métodos ayudan a diferenciar o a agrupar organismos cercanos basándose en caracteres sencillos del organismo a los que se llama "marcador". Cuando los aislados muestran diferencias de acuerdo con el marcador aplicado, se considera que son epidemiológicamente distintos; mientras que cuando presentan el mismo patrón, se toma como evidencia de la existencia de una relación epidemiológica entre los aislados. Asimismo, cuando se dispone de una gran variedad

de marcadores epidemiológicos se puede probar la validez del concepto de "clon" (Ørskov y Ørskov, 1983); una definición de clon es "cualquier aislado microbiano que pertenece a un conjunto de aislados microbianos los cuales han sido obtenidos independientemente de distintas fuentes, en diferentes localizaciones y posiblemente, en épocas diferentes, pero que muestran muchos marcadores idénticos, por lo que la explicación más lógica de su identidad sea un origen común" (Einsenstein, 1990). Durante los últimos años con el desarrollo de técnicas de genética molecular se ha podido determinar la clonalidad entre aislados clínicos, permitiendo aumentar la fiabilidad en la evaluación de la extensión epidémica de los organismos; aunque la clonalidad no puede ser nunca totalmente segura, se puede obtener una certeza en función del poder discriminatorio de los marcadores utilizados para caracterizar el cultivo.

Un marcador epidemiológico debe cumplir varias características fundamentales entre las que se encuentran: (a) tipabilidad, debe permitir que la mayoría de los aislados sean reconocidos; un marcador se considera de poca utilidad si la mayoría de los aislados son no tipables; (b) discriminación, debe reconocer un gran número de tipos o patrones y (c) reproducibilidad, de forma que estudios realizados en distinto momento o lugar deben presentar idénticos o similares resultados. Otras características deseables para un buen método de tipificación son una estandarización adecuada, asequibilidad y sensibilidad.

Los principales métodos de tipificación aplicados a bacterias son: perfiles biológicos (biotipia), determinación serológica (serotipia), sensibilidad a antibióticos (antibiotipia), sensibilidad a fagos (fagotipia), sensibilidad o producción de bacteriocinas (bacteriocinotipia), resistencia

a productos químicos (resistotipia), análisis de DNA, etc. Para algunos organismos (generalmente, Gram-positivos) existe un único método de tipificación, mientras que en otros existen numerosas posibilidades para la elección de un marcador adecuado.

#### 1.1.3.1. MARCADORES EN *S.pneumoniae*

En *Streptococcus pneumoniae* la serotipia es el único método de tipado epidemiológico utilizado de forma rutinaria. Durante los últimos años se ha descrito la posible utilización de otros marcadores para discriminar entre aislados pertenecientes a un mismo serotipo capsular, sin embargo estos marcadores no han sido aplicados con éxito a estudios epidemiológicos. Entre los marcadores utilizados se encuentran el patrón de proteínas totales (Pease et al., 1986), patrón de proteínas antigénicas (Muñoz et al., 1988), reactividad frente a anticuerpos monoclonales dirigidos contra proteínas específicas (Waltman et al., 1988), patrón de restricción del DNA cromosómico (Viering y Fine, 1989), peso molecular de la proteína A (Waltman et al., 1990), etc.

En la actualidad el tipado epidemiológico en neumococo está basado en la diversidad antigénica existente en el polisacárido capsular. Desde muy antiguo se ha admitido que el comportamiento antigénico de los neumococos estaba determinado por las cápsulas que rodean las células bacterianas. Posteriormente, se puso de manifiesto que este hecho puede ser utilizado para la identificación de los tipos de neumococos (Armstrong, 1931); cada tipo neumocócico está caracterizado por un polisacárido capsular específico que determina su comportamiento antigénico. Estos serotipos se pueden determinar

por aglutinación, reacción de precipitación capsular (*quellung*) o mediante pruebas de precipitación.

Para la designación de los serotipos neumocócicos se utiliza la nomenclatura danesa, revisada por Kauffmann y Lund en 1.954, que combina números y letras y está basada en interrelaciones antigénicas: los serotipos que poseen antígenos capsulares comunes componen serogrupos naturales. Existen 46 serogrupos que se designan por un número, la combinación del número con la letra mayúscula sirve para designar los 84 serotipos; sin embargo, números y letras minúsculas sirven para indicar la fórmula antigénica. Por ejemplo, existen dos serotipos incluidos dentro del serogrupo 6, llamados 6A y 6B, siendo sus fórmulas antigénicas 6a,6b y 6a,6c, respectivamente. La Tabla II muestra los 84 serotipos de neumococos descritos hasta la actualidad y su fórmula antigénica. La reactividad serológica cruzada existente entre algunos de los serotipos indica la posesión de determinantes antigénicos comunes, probablemente debido a la existencia de unidades mono-, di- u oligosacáridas similares o idénticas en los polisacáridos capsulares de estos serotipos.

Tabla II

Designación danesa de tipo y fórmula antigénica de los 84 serotipos de neumococos

TIPO	FORMULA ANTIGENICA	TIPO	FORMULA ANTIGENICA
1	1a	20	20a, 20b, 7g
2	2a	21	21a
3	3a	22F	22a, 22b
4	4a	22A	22a, 22c
5	5a	23F	23a, 23b, 18b
6A	6a, 6b	23A	23a, 23c, 15c
6B	6a, 6c	23B	23a, 23b, 23d
7F	7a, 7b	24F	24a, 24b, 24d, 7h
7A	7a, 7b, 7c	24A	24a, 24c, 24d
7B	7a, 7d, 7e, 7h	24B	24a, 24b, 24e, 7h
7C	7a, 7d, 7f, 7g, 7h	25	25a, 25b
8	8a	27	27a, 27b
9A	9a, 9c, 9d	28F	28a, 28b, 16b, 23d
9L	9a, 9b, 9c, 9f	28A	28a, 28c, 23d
9N	9a, 9b, 9e	29	29a, 29b, 13b
9V	9a, 9c, 9d, 9g	31	31a, 20b
10F	10a, 10b	32F	32a, 27b
10A	10a, 10c, 10d	32A	32a, 32b, 27b
11F	11a, 11b, 11c, 11g	33F	33a, 33b, 33d
11A	11a, 11c, 11d, 11e	33A	33a, 33b, 33d, 33f
11B	11a, 11b, 11f, 11g	33B	33a, 33c, 33d, 33f
11C	11a, 11b, 11c, 11d, 11f	33C	33a, 33c, 33e
12F	12a, 12b, 12d	34	34a, 34b
12A	12a, 12c, 12d	35F	35a, 35b, 34b
13	13a, 13b	35A	35a, 35c, 20b
14	14a	35B	35a, 35c, 29b
15F	15a, 15b, 15c, 15f	35C	35a, 35c, 20b, 42a
15A	15a, 15c, 15d, 15g	36	36a, 9e
15B	15a, 15b, 15d, 15e, 15h	37	37a
15C	15a, 15d, 15e	38	38a, 25b
16	16a, 16b, 11d	39	39a, 10d
17F	17a, 17c	40	40a, 7g, 7h
17A	17a, 17c	41F	41a
18F	18a, 18b, 18c, 18f	41A	41a
18A	18a, 18b, 18c, 18d	42	42a, 20b, 35c
18B	18a, 18b, 18e, 18g	43	43a, 43b
18C	18a, 18b, 18c, 18e	44	44a, 44b, 12b, 12d
19F	19a, 19b, 19d	45	45a
19A	19a, 19c, 19e, 7h	46	46a, 12c, 44b
19B	19a, 19c, 19e, 7h	47F	47a, 35a, 35b
19C	19a, 19c, 19f, 7h	47A	47a, 43b
		48	48a

## 1.2. RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS

### 1.2.1. ANTIBIOTICOS $\beta$ -LACTAMICOS

Las bacterias poseen peptidoglicano en sus paredes celulares, pero esta macromolécula está ausente en las células de mamíferos; por ello, los antibióticos que inhiben la síntesis de peptidoglicano resultan muy útiles como agentes quimioterápicos. La síntesis de peptidoglicano tiene lugar en 3 etapas fundamentales:

1. Síntesis de precursores en el citoplasma (UDP-N-acetil glucosamina y UPD-N-acetil muramil pentapéptido)
2. Transferencia de estos precursores a una molécula lipídica transportadora (undecaprenil fosfato) que los transporta desde el lugar de síntesis intracelular a la membrana citoplásmica
3. Inserción de las unidades de peptidoglicano en la pared celular, ensamblaje mediante una transpeptidación y, posteriormente, unas etapas finales de maduración (Tipper y Wright, 1979).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos representan el grupo más importante de compuestos que inhiben la etapa final de la síntesis del peptidoglicano. El nombre de estos antibióticos deriva de la posesión de un anillo amida cíclico de 4 miembros. Hasta hace poco tiempo, los antibióticos  $\beta$ -lactámicos se definieron y clasificaron mediante una nomenclatura trivial, en la cual el nombre del compuesto estaba relacionado con el organismo productor y con alguna de sus características químicas; recientemente, estos antibióticos han sido clasificados utilizando un sistema basado en un esqueleto  $\beta$ -lactámico parental definido, diferenciándose 10 clases de compuestos.

Los estudios iniciales (1950-65) sobre el modo de acción de la penicilina condujeron a la teoría que su primer sitio de acción era la reacción de transpeptidación que unía las cadenas contiguas de peptidoglicano. En 1.965, Tipper y Strominger formularon la hipótesis que la penicilina podía ser un análogo estructural de la porción acil-D-alanil-D-alanina de la cadena lateral del péptido; por lo que era razonable suponer que una enzima que catalizase la reacción de transpeptidación confundiría a la molécula de antibiótico por su sustrato original, produciéndose un compuesto intermedio "antibiótico-enzima" estable y covalentemente unido, que inactivaría la enzima y así se inhibiría la síntesis de peptidoglicano.

Hasta 1960 se asumió que las bacterias contenían un único tipo de enzima transpeptidasa, siendo ésta el único sitio para la acción de la penicilina. Posteriormente utilizando ensayos *in vitro*, se demostró en *E. coli* que además de la reacción de transpeptidación ocurrían otras dos reacciones que resultaban inhibidas por penicilina: la eliminación de la D-alanina carboxi-terminal, con la formación de enlaces peptídicos (reacción D,D-carboxipeptidasa) y la rotura de uniones cruzadas entre cadenas peptídicas (reacción endopeptidasa). De forma similar, en otras bacterias se detectaron reacciones semejantes sensibles a penicilina, y en todos los casos el sustrato era el enlace D-alanil-D-alanina. La identificación de más de una reacción sensible a penicilina en la síntesis de peptidoglicano libre de células, implicaba a proteínas capaces de interaccionar con penicilina (y otros  $\beta$ -lactámicos); la introducción de técnicas de marcaje con penicilina radiactiva confirmó la existencia de varias proteínas capaces de interaccionar con penicilina.

### 1.2.2. PROTEINAS FIJADORAS DE PENICILINA (PBPs)

En la mayoría de las especies bacterianas existen varias proteínas fijadoras de penicilina (PBPs). Las PBPs se designan numéricamente, haciendo referencia a su tamaño molecular relativo respecto al grupo de PBPs detectado en una bacteria particular (de esta forma la PBP 1 es la que tiene el mayor peso molecular).

Las PBPs son compuestos minoritarios de la membrana plasmática; en *E. coli* existen aproximadamente 3.000 moléculas por célula, constituyendo el 1% de las proteínas totales de la membrana (Spratt, 1977). Mediante la utilización de técnicas bioquímicas y genéticas se han establecido las funciones de algunas PBPs, encontrándose que las PBPs catalizan reacciones transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas. Las PBPs de *E. coli* constituyen el conjunto de PBPs más estudiado pudiéndose considerar dos grupos:

a) PBPs de elevado peso molecular (PBP 1 a 3), esenciales. Catalizan las reacciones de transglicosilación (polimerización de las unidades de disacárido en las cadenas de glicano) y de transpeptidación (formación de uniones cruzadas entre las cadenas laterales del peptidoglicano). La actividad transglicolasa es insensible a antibióticos  $\beta$ -lactámicos, por el contrario, la actividad transpeptidasa es sensible a estos compuestos. Esta actividad enzimática doble se origina, probablemente, por la presencia en el mismo polipéptido de dos centros distintos activos catalíticamente, una zona amino-terminal que cataliza la reacción de transglicosilación y una zona carboxi-terminal con actividad transpeptidasa sensible a antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La presencia de ambas actividades enzimáticas en el mismo polipéptido, puede permitir un estrecho

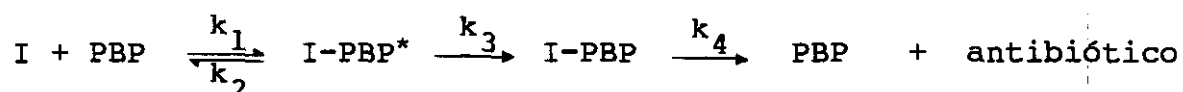
control en la inserción y sobrecruzamiento de las unidades de glicano en el esqueleto creciente del peptidoglicano (Matsubishi et al., 1982).

b) PBPs de bajo peso molecular (PBPs 4 a 6), no esenciales. Desempeñan un papel minoritario en la síntesis del peptidoglicano (Spratt, 1980a). La PBP 4 presenta una actividad endopeptidasa que hidroliza uniones cruzadas en el peptidoglicano y probablemente contribuye al remodelamiento del peptidoglicano necesario para el crecimiento y división de la célula. Las PBPs 5 y 6 catalizan una reacción D-alanina carboxipeptidasa que probablemente controla la extensión de las uniones cruzadas en el peptidoglicano (Amanuma y Strominger, 1980).

En *E. coli* las PBPs 4, 5 y 6 no parecen ser esenciales para el crecimiento, por lo que su interacción con el antibiótico no se considera responsable de la acción bactericida de los antibióticos (Spratt, 1980b) (Broome-Smith y Spratt, 1982). Las PBPs 1A, 1B, 2 y 3 son los sitios de acción letales iniciales; la unión del  $\beta$ -lactámico, potencialmente letal, provoca la inactivación de la actividad transpeptidasa. La inactivación de las PBPs 2 y 3 origina cambios morfológicos previos a la muerte celular (Spratt, 1975).

En otras bacterias Gram-negativas la actividad enzimática de las PBPs no es muy conocida; sin embargo, se han identificado en algunas PBPs actividades transpeptidasa, carboxipeptidasa y endopeptidasa. Como mecanismo de reacción general, las PBPs que presentan actividad transpeptidasa utilizan como sustrato la porción D-alanil-D-alanina del péptido, formándose un intermedio "acil-enzima" y liberándose el residuo D-alanina terminal durante la reacción. De forma

similar, la asociación de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos con las PBPs (unión y eliminación) viene representada por la siguiente ecuación:



siendo: I, Inhibidor (antibiótico  $\beta$ -lactámico); PBP, Proteína fijadora de penicilina; I-PBP\*, Complejo inicial no covalente; I-PBP, Complejo covalente "inhibidor-PBP";  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$ , Constantes de primer orden

El sitio activo de las PBPs es un residuo de serina al cual se unen el sustrato natural y los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. En algunas PBPs se ha determinado la secuencia de aminoácidos en la región cercana al sitio activo observándose que en todas las PBPs analizadas la secuencia "Ser-X-X-Lys" está conservada (Ghuysen, 1988)). Mediante la aplicación de técnicas cristalográficas de Rayos-X a PBPs purificadas, se ha podido concluir que las distintas afinidades mostradas por los distintos antibióticos  $\beta$ -lactámicos por la misma PBP, está determinada por la estructura tridimensional de los sitios activos y de las moléculas de antibiótico (Kelly et al., 1989).

### 1.2.3. BASES BIOQUIMICAS Y GENETICAS DE LA RESISTENCIA

Durante más de 40 años los antibióticos se han utilizado para el tratamiento de las infecciones bacterianas. Sin embargo, casi desde el periodo inicial de comercialización de la penicilina, se observó que ciertas bacterias no se destruían por el antibiótico. Hoy en día, se reconocen dos amplias

categorías de resistencia a los antibióticos, resistencia intrínseca y resistencia adquirida. El término "intrínseca" implica el hecho que algunas cualidades inherentes de la célula son las responsables de la prevención en la acción del antibiótico, y lo distingue de la "resistencia adquirida", la cual ocurre cuando los aislados resistentes emergen a partir de poblaciones bacterianas existentes previamente, generalmente después de la exposición al antibiótico en cuestión. La resistencia intrínseca viene expresada -generalmente- por genes cromosómicos, mientras que la resistencia adquirida se origina a partir de mutaciones en los genes cromosómicos, o por la adquisición de plásmidos y transposones. En el contexto de la Microbiología Clínica, la resistencia adquirida a antibióticos se origina esencialmente a partir de una presión selectiva ejercida en la bacteria durante la administración de antibióticos para quimioterapia.

La resistencia adquirida hacia antibióticos  $\beta$ -lactámicos se puede obtener mediante tres mecanismos diferentes, los cuales separada o conjuntamente determinan la resistencia a estos compuestos. Estos mecanismos son la reducción en la permeabilidad de la membrana externa hacia el antibiótico (en bacterias Gram-negativas), la síntesis de  $\beta$ -lactamasas y la modificación de una o más PBPs. Las alteraciones en las PBPs se pueden clasificar en cuatro categorías (Spratt, 1989):

1.- Alteración en la afinidad de las PBPs hacia antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Las bacterias para protegerse del antibiótico producen PBPs resistentes a la inhibición por  $\beta$ -lactámicos; la obtención de resistencia mediante la producción de PBPs con una afinidad reducida hacia el antibiótico parece una estrategia extraña, puesto que debe ser muy reducido el número de sustituciones de aminoácidos que permiten a las PBPs reducir su

afinidad por el sustrato y que no alteren la estructura de su centro activo.

2.- Alteraciones en la cantidad de PBPs. La producción de grandes cantidades de PBPs puede proporcionar un mecanismo de resistencia incrementándose así la cantidad de antibiótico necesaria para reducir la actividad de la PBP a un nivel que limite la síntesis de peptidoglicano. Este mecanismo no se ha demostrado rigurosamente en aislados clínicos de ninguna bacteria.

3.- Resistencia mediada por la adquisición ilegítima de una PBP resistente. En este mecanismo la bacteria obtiene resistencia mediante la adquisición una nueva PBP de otra bacteria, esta nueva PBP posee una baja afinidad por los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Cuando se incuba en presencia del antibiótico la PBP resistente puede realizar las funciones de todas las PBPs normales de la bacteria. Se dice "ilegítima" en el sentido de que el fragmento de DNA codificado para la PBP no tiene homología en la bacteria receptora, y su integración en el cromosoma no implica una recombinación homóloga. De esta forma el organismo resistente contiene todas las PBPs normales y una PBP extra.

4.- Resistencia mediada por la adquisición homóloga de una PBP resistente. Una vía alternativa para adquirir una PBP resistente es reemplazar una PBP normal por una de una especie relacionada, mediante la toma e integración por recombinación homóloga de un fragmento de DNA codificante para una PBP más resistente.

### 1.3. RESISTENCIA A PENICILINA EN *S. pneumoniae*

#### 1.3.1. EPIDEMIOLOGIA

Hasta la introducción de la penicilina para el tratamiento de las infecciones neumocócicas en 1.940, los neumococos se consideraban muy sensibles a este antibiótico (CMI 0,005  $\mu\text{g/ml}$ ) (Jones y Finland, 1957) estableciéndose que no era necesaria la utilización de pruebas *in vitro* de sensibilidad a penicilina. Durante los años 40 se seleccionaron en laboratorio neumococos mutantes resistentes a penicilina (McKee y Houck, 1943) (Eriksen, 1945) y veinte años después se describieron en Boston (Mass., EE.UU.) los primeros aislados clínicos presentando una sensibilidad reducida hacia penicilina (CMI 0,1 y 0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) (Kislak et al., 1965). Sin embargo, el significado de este descubrimiento fué olvidado hasta que en 1.967 se aisló en Australia el primer neumococo resistente a penicilina descrito como tal (Hansman y Bullen, 1967). Se trataba de un neumococo serotipo 23 que presentaba una resistencia intermedia a penicilina (CMI 0,6  $\mu\text{g/ml}$ ) y a tetraciclina, aislado de un paciente tratado previamente con una variedad de antibióticos, entre los que se incluían penicilina, tetraciclina y eritromicina. Ese mismo año, se detectaron en Australia otros neumococos relativamente resistentes a penicilina (CMI 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ ), a partir de portadores sanos en un área donde la penicilina era utilizada habitualmente para el tratamiento de las infecciones neumocócicas (Hansman et al., 1971).

A partir de entonces, han sido muy numerosos los trabajos describiendo aislados clínicos relativamente resistentes a penicilina (revisión Klugman, 1990). Aunque estos trabajos provocaron una gran preocupación, todas los aislados descritos

hasta 1.977 mostraban únicamente una resistencia relativa a penicilina, resistencias 8 a 16 veces mayores que la sensibilidad media. En 1.968 Gunnison *et al.* observaron que se necesitaban pocos pases en medio conteniendo penicilina para obtener neumococos con una resistencia 2.000 veces superior a la de la cepa parental, por lo que la posibilidad de un gradual aumento en la resistencia de los neumococos (hasta niveles muy altos) fué real y alarmante.

De hecho, en 1.977 aparecieron por primera vez en Suráfrica aislados de neumococos con niveles muy altos de resistencia a penicilina (CMI 4-8 $\mu$ g/ml) presentando, además, resistencias a otros antibióticos (Appelbaum *et al.*, 1977). Desde entonces se extendió por todo el mundo la distribución de aislados resistentes a penicilina (CMI < 1 $\mu$ g/ml), describiéndose focos con más de un 10% de neumococos resistentes a penicilina en Nueva Guinea, Israel, España, Polonia, Suráfrica y en algunas áreas de Estados Unidos (Appelbaum, 1987). La Tabla III refleja algunos de los trabajos publicados describiendo neumococos resistentes a penicilina a partir de 1.984 (Klugman, 1990).

En 1.988 Casal y Fenoll revisaron los trabajos publicados describiendo la incidencia de neumococos resistentes a penicilina en España. En 1.981 se describió el primer neumococo presentando sensibilidad reducida a penicilina (CMI > 0,16 $\mu$ g/ml) y a otros antibióticos (Cruz *et al.*, 1981). En 1982, Casal en un estudio realizado con 318 neumococos aislados de sangre, encontró que un 8,7% de las cepas presentaban una resistencia intermedia a penicilina; un año después Liñares *et al.* (1983) encontraron un porcentaje del 9% de cepas resistentes a penicilina. Sin embargo hasta entonces era escasa la información existente sobre el grado de resistencia a penicilina en neumococos aislados de población infantil; en

**Tabla III**

Trabajos publicados desde 1.984 describiendo la existencia de neumococos resistentes a penicilina (Klugman, 1990, revisada).

<u>País</u>	<u>Años</u>	<u>Número aislados</u>	<u>Resist (%)</u>	<u>Tipo de aislados</u>
<b>América del Norte</b>				
Alaska	1980-1986	284	5,3	Clínicos
Alaska	1987	155	26,0	Portadores
Canadá	1984-1986	468	1,3	Clínicos
<b>América del Sur</b>				
Chile	1983-1985	178	21,9	Clínicos
<b>Australia/NZ</b>				
Nueva Zelanda	1981-1986	233	1,3	Clínicos
<b>Europa</b>				
España	1984-1986	147	14,3	Sangre
España	1984-1986	91	52,7	Clínicos
España	1987	159	35,9	Portadores
España	1979-1989	2197	28,0	Sangre+LCR
Francia	1980-1986	1266	0,3	Clínicos
Inglaterra	1987	100	4,0	Clínicos
Irlanda N.	1986-1987	488	0,8	Clínicos
Suiza	1984-1985	133	2,3	Clínicos
Bélgica	1980-1988	2765	0,9	Clínicos
<b>Asia</b>				
Malasia	1984-1985	249	2,0	Clínicos
<b>Africa</b>				
Zambia	1986	39	2,6	Portadores
Suráfrica	1983-1986	3568	7,0	Sangre+LCR
Suráfrica	1986	302	24,2	Portadores

1.985, Latorre et al. analizaron la resistencia de neumococos aislados a partir de niños hospitalizados, encontrando que el porcentaje de neumococos que presentaban algún grado de resistencia se elevaba al 51%. En 1.987, Pérez et al. encontraron que el 35% de los neumococos aislados a partir de niños portadores sanos presentaba una sensibilidad disminuída hacia penicilina.

En un estudio realizado durante el periodo 1.979-1.989 (Fenoll et al., 1991) se describe que el porcentaje de aislados resistentes a penicilina ha experimentado un incremento gradual desde un 6,0% en el año 1.979 hasta un 44,3% en el año 1.989. Por otro lado, hasta 1.984 todos los aislados presentaban una resistencia intermedia a penicilina, sin embargo desde 1.984 hasta 1.989 se ha observado que un 33% de los neumococos poseían un valor de CMI superior a 1µg/ml. Al analizar la distribución de serogrupos en los aislados resistentes a algún antibiótico se observa que los neumococos resistentes aparecen en más de 20 serogrupos, sin embargo, un 75% de los aislados que presentan resistencia a penicilina pertenecen sólo a 4 serogrupos (serogrupos 23, 6, 9 y 19). Estos datos confirman que España es uno de los países que presenta una mayor incidencia de neumococos resistentes a penicilina a nivel mundial.

### 1.3.2. MECANISMO DE RESISTENCIA

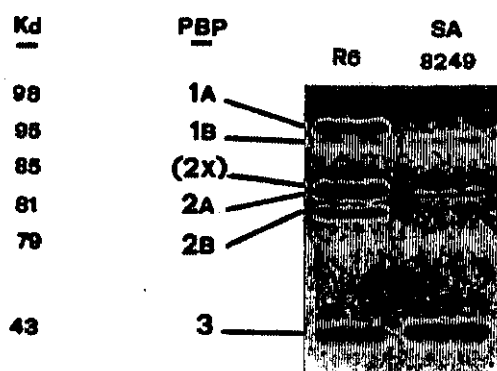
La resistencia a penicilina en neumococos se debe únicamente a alteraciones en las PBPs (Hakenbeck et al., 1980) (Zighelboim y Tomasz, 1980); en neumococos no se ha descrito actividad  $\beta$ -lactamasa, ni tampoco mutaciones que reducen la accesibilidad de la penicilina a las PBPs. La ausencia de estos

mecanismos de resistencia y la elevada exposición de los neumococos a penicilina, han producido un entorno ideal para el desarrollo de resistencia mediada por alteraciones en las PBPs. Por ello, es lógico que en este organismo se encuentre el mejor ejemplo de desarrollo de resistencia a penicilina mediado por alteraciones en las PBPs.

En 1.970 Shockley y Hotchkiss comprobaron en el laboratorio que la resistencia a penicilina se adquiere de forma gradual; los mutantes con resistencia aumentada a penicilina (2 a 4 veces en el valor de su CMI) se obtenían con una frecuencia de  $10^{-8}$ - $10^{-9}$ , los mutantes en el segundo nivel se obtenían con una frecuencia menor, por lo que era necesario repetir el proceso de selección hasta obtener mutantes con niveles considerablemente aumentados. El estudio de mutantes de laboratorio ha mostrado que en todos los casos el desarrollo de resistencia va asociado a alteraciones en la afinidad de las PBPs (Handwerger y Tomasz, 1986a) (Laible y Hakenbeck, 1987)

Los aislados de *S. pneumoniae* sensibles a penicilina contienen 6 PBPs cuyo tamaño molecular es: PBP 1A (98 Kd), PBP 1B (95 Kd), PBP 2X (85 Kd), PBP 2A (81 Kd), PBP 2B (79 Kd) y PBP 3 (43 Kd) (Percherson y Bryan, 1980). En los fluorogramas la PBP 2X aparece muy próxima e indistinguible de la PBP 2A (Figura 4) por lo que a veces sólo se indica la presencia de la PBP 2A (Hakenbeck et al., 1986).

Se han realizado muchos intentos para correlacionar la unión de una PBP particular a un antibiótico  $\beta$ -lactámico con la muerte o algún efecto morfológico en neumococos, sin embargo estos intentos no han originado unos resultados concluyentes (Williamson et al, 1980) (Williamson y Tomasz, 1985) (Hakenbeck et al, 1987). Las alteraciones en las PBPs en mutantes de



**Figura 4**

Fluorografía mostrando las Proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) de *Streptococcus pneumoniae*, en la cepa sensible R6 y en el aislado resistente SA 8249

laboratorio o en aislados clínicos con niveles aumentados de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos implican a las PBPs 1A, 2X, 2A y 2B, por lo que se piensa que estas son las PBPs fisiológicamente importantes en neumococos. La PBP 3, de forma semejante a las PBPs de bajo peso molecular en otras bacterias, cataliza una reacción D-alanina carboxipeptidasa y posiblemente no está implicada en los mecanismos bactericidas de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en neumococos (Hakenbeck y Kohiyama, 1982) (Schuster et al., 1990).

Se han descrito algunas alteraciones que aparecen en las PBPs de los aislados clínicos de neumococos resistentes a penicilina (Zighelboim y Tomasz, 1980) (Hakenbeck et al., 1980) (Handwerger y Tomasz, 1986), observándose que los neumococos con niveles intermedios de resistencia a penicilina (CMI 0,05-0,2  $\mu\text{g/ml}$ ) poseen formas modificadas en las PBPs de los grupos 1 y 2 con una afinidad disminuída hacia penicilina. En los aislados clínicos más resistentes (CMI  $>1 \mu\text{g/ml}$ ) existen alteraciones más complejas consistentes en una aparente pérdida de PBPs, así como cambios en la afinidad de alguna de estas PBPs hacia penicilina. El estudio de PBPs más detallado en un neumococo resistente se ha realizado en el aislado surafricano SA 8249 (Handwerger y Tomasz, 1986b) en el cual sólo resultan marcadas con penicilina radiactiva las PBPs 1B, 2A y 3, no detectándose las PBPs 1A o 2B (Figura 4). La aparente ausencia de la PBP 2B es debida a un drástico descenso en la afinidad hacia penicilina de forma que no se puede detectar por el ensayo fluorográfico de PBPs, pero puede ser detectada utilizando un anticuerpo anti-PBP 2B (Hakenbeck et al., 1986). Además de estos cambios, la PBP 2A del aislado SA 8249 muestra una afinidad muy reducida hacia penicilina en comparación con la de los aislados sensibles; de hecho, la única PBP que

mantiene sus propiedades inalteradas es la PBP 3 (Zigheboim y Tomasz, 1980) (Handwerger y Tomasz, 1986b).

No existe una relación cuantitativa entre afinidad hacia penicilina de una PBP y el valor de CMI, debido a que la afinidad hacia penicilina no refleja el cambio en la actividad enzimática de las PBPs hacia sus sustratos naturales en los aislados resistentes (Laible y Hakenbeck, 1987). Recientemente, se han clonado y secuenciado los genes neumocócicos que codifican para la PBP 2X (Laible et al., 1989) y PBP 2B (Dowson et al., 1989a). La sustitución de siete aminoácidos consecutivos en la secuencia carboxi-terminal de la PBP 2B parece ser el cambio fundamental asociado con la afinidad disminuída hacia penicilina de las cepas resistentes (Dowson et al., 1989b); estas sustituciones ocurren en un área cercana al residuo de serina del centro activo de unión a penicilina en las  $\beta$ -lactamasas y en algunas PBPs (Dideberg et al., 1987) (Herzberg y Moulton, 1987) (Joris et al., 1988). También se han detectado alteraciones en esta zona en las PBPs de *N.gonorrhoeae* resistentes a penicilina (Spratt, 1988) y en *E.coli* resistente a cefalexina (Hedge y Spratt, 1985). La secuenciación parcial de los genes que codifican para las PBPs de neumococo ha revelado una homología elevada con algunas PBPs de *E. coli* (Laible et al., 1989).

Mediante experimentos realizados utilizando DNA del aislado SA 8249 para transformar la cepa sensible R6 a niveles aumentados de resistencia a penicilina, se ha observado que la transformación de esta resistencia ocurre de manera gradual y las PBPs de los transformantes se hacen gradualmente semejantes a las del aislado donante de DNA (Zigheboim y Tomasz, 1980). Sin embargo, en 1988 Chalkley y Koornhof realizando un experimento similar consiguieron una rápida selección de

transformantes con alto nivel de resistencia los cuales presentaban patrones de PBPs múltiples y diferentes. Igualmente, al examinar un elevado número de aislados de neumococos resistentes a penicilina se ha observado un alto grado de variación en el patrón de PBPs (Chalkley et al., 1989) (Markiewicz y Tomasz, 1989), pudiéndose identificar grupos de aislados que comparten un patrón de PBPs, descritos como "familias" de PBPs (Jabes et al., 1989). Estas observaciones sugieren que los neumococos son capaces de remodelar sus PBPs de más de una manera para conseguir una menor afinidad hacia penicilina, con lo cual la resistencia a penicilina puede haber surgido en más de una ocasión desarrollándose a partir de un número de clones diferentes en todo el mundo (Jabes et al., 1989).

La variabilidad observada en el patrón de PBPs en los neumococos resistentes a penicilina sugiere que el patrón de PBPs pueda ser considerado como un marcador epidemiológico adecuado para estos aislados, el cual nos permitiría estudiar la evolución de los neumococos resistentes en función del tiempo y de la localización geográfica.

**JUSTIFICACION Y OBJETIVOS**

## 2. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

El establecimiento de una bacteria resistente es un proceso que implica dos fases: la aparición del mecanismo de resistencia (por ejemplo, una mutación) y su posterior dispersión mediante una mayor supervivencia del organismo resistente sobre el sensible. La rápida expansión observada en los neumococos resistentes necesita un desarrollo paralelo en los métodos de caracterización epidemiológica de estos aislados; métodos que permitan una caracterización racional de los neumococos, de forma que al analizar aislados distintos pero que presentan marcadores idénticos se pueda concluir que estos organismos se han originado a partir de un único clon.

El único marcador epidemiológico utilizado en neumococos es la serotipia basada en la diversidad antigénica mostrada por el polisacárido capsular. Sin embargo, durante los últimos años se han buscado nuevos marcadores que permitan discriminar entre aislados incluidos dentro de un mismo tipo capsular y que puedan ser aplicados a estudios epidemiológicos. La diversidad de patrones de PBPs encontrada entre los neumococos resistentes a penicilina parece indicar que el patrón de PBPs pueda ser un marcador adecuado para estos aislados.

El desarrollo de métodos que permitan una mejor caracterización de los neumococos resistentes a penicilina es fundamental en un país como España, que presenta una de las mayores incidencias descritas a nivel mundial de estos aislados, observándose una tendencia general hacia un gradual aumento en el número de aislados resistentes así como en el nivel de resistencia. Por ello, los neumococos resistentes a penicilina constituyen un grave problema sanitario en nuestro país.

Finalmente, es preciso señalar que el conocimiento existente sobre los orígenes y transmisión de los neumococos resistentes a penicilina es muy limitado, por lo que resulta esencial la aplicación de nuevos métodos de tipado epidemiológico que permitan aumentar la información sobre estos aspectos. La información obtenida en los estudios realizados mediante la utilización de métodos de tipado adecuados, puede ser aplicada para mejorar la prevención, diagnóstico y terapia de estas infecciones, y ayudar a la comprensión de la patogénesis de los neumococos resistentes a penicilina.

El propósito fundamental de este trabajo ha sido la profundización en el conocimiento de la base bioquímica y genética de la resistencia a penicilina en aislados clínicos de *Streptococcus pneumoniae* y su aplicación práctica para el desarrollo de métodos de tipado que permitan una mejor caracterización de estos organismos.

Los objetivos fundamentales han sido:

1. Determinar la frecuencia de neumococos tolerantes a penicilina en aislados clínicos procedentes de zonas geográficas que presentan una elevada incidencia de neumococos resistentes a este antibiótico
2. Analizar la distribución de serogrupos en neumococos que presentan distinto nivel de resistencia a penicilina, especialmente en aquellos con un bajo nivel de resistencia a penicilina ("borderline")

3. Estudiar la alteración en el patrón de PBPs como mecanismo de resistencia a penicilina en una muestra de aislados clínicos de *S. pneumoniae*
4. Describir los principales patrones de PBPs encontrados en los aislados clínicos estudiados.
5. Agrupar en "familias" de patrones de PBPs los aislados que comparten un modelo común de PBPs y comparar con otras familias descritas previamente.
6. Valorar la posible utilización del patrón de PBPs como marcador epidemiológico para aislados de neumococo resistentes a penicilina.
7. Establecer la estabilidad y reproducibilidad del modelo de PBPs como condiciones necesarias para su utilización como marcador epidemiológico.
8. Estudiar la posible relación clonal entre los neumococos pertenecientes a la misma "familia" de patrón de PBPs.

## **MATERIAL Y METODOS**

### 3. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1 CEPAS Y AISLADOS BACTERIANOS

##### 3.1.1 CEPAS DE LABORATORIO

Las cepas de laboratorio utilizadas en esta tesis han sido:

R36A	wt	no-capsulada	Hex <sup>+</sup> lytA Cps <sup>-</sup> Cid <sup>+</sup>
R6	wt	no-capsulada	Hex <sup>+</sup> lytA Cps <sup>-</sup> Cid <sup>+</sup>
R6Hex <sup>-</sup>		no-capsulada	Hex <sup>-</sup> lytA Cps <sup>-</sup> Cid <sup>+</sup>
R6RUP25		no-capsulada	Hex <sup>-</sup> Lyt <sup>-</sup> Cps <sup>-</sup> Cid <sup>+</sup>

donde: wt, cepa salvaje tipo; Cps<sup>-</sup>, representa una mutación en los determinantes genéticos para la producción de polisacáridos capsulares; lytA, es el gen que codifica para la autolisina neumocócica; Lyt<sup>-</sup>, en este caso lytA::ermC, por la inserción de un plásmido de resistencia a eritromicina ermC en el gen lytA, confiriendo un fenotipo estable.

*Streptococcus pneumoniae* R36A y *Streptococcus pneumoniae* R6 han sido utilizadas como cepas salvajes de referencia en todos los experimentos. Avery en 1.916 aisló un neumococo capsulado serotipo 2, D39S, a partir de un paciente (Dubos, 1976); el crecimiento de esta cepa durante 36 pases en un caldo conteniendo suero de conejo antineumocócico tipo 2 permitió el aislamiento de la variante rugosa, no capsulada, R36 (Avery et al., 1949). Esta cepa, después de algunos pases en caldo conteniendo sangre, originó una serie de variantes rugosas, distinguibles por la morfología de las colonias; de estas

variantes, sólo R36A pudo ser transformada con DNA (McLeod y Krauss, 1947). La cepa R6 es un subcultivo de R36A seleccionado por su continua competencia para la transformación (Dubos, 1976).

*Streptococcus pneumoniae* R6Hex<sup>-</sup> fué obtenida por Lacks en 1970 al someter cultivos de la cepa R6 a 10 tratamientos con 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina. Encontró una mutación que aparecía con alta frecuencia que llamó "hex", y cuyo fenotipo mutante (Hex<sup>-</sup>) mostraba una alta eficiencia en la integración de los diferentes marcadores donantes durante la transformación.

*Streptococcus pneumoniae* R6RUP25 es una cepa derivada de R6 y obtenida por Tomasz et al. en 1.988. La propiedad fundamental de esta cepa es la ausencia de un gen funcional para la autolisina; en ella la secuencia codificante *lytA* está interrumpida por la inserción de *ermC*, un gen estafilocócico que confiere resistencia a eritromicina. El plásmido pGL80 con el gen *lytA* se cortó y unió a un fragmento de 20kb de pE194 conteniendo el gen *ermC*, el cual posteriormente se utilizó para transformar *S.pneumoniae* R6 seleccionando los transformantes por un fenotipo "Erm<sup>r</sup> Lyt<sup>-</sup>" estable.

### 3.1.2 AISLADOS CLINICOS

La mayoría de los aislados clínicos de *S.pneumoniae* utilizados en este estudio pertenecen a la colección del Laboratorio de Neumococos del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias (C.N.M.V.I.S.). Se utilizaron además otros aislados cedidos amablemente por las siguientes personas: J. Liñares, Hospital de Bellvitge,

Barcelona, España; A. Marton, Heim Pál Children's Hospital, Budapest, Hungría; H. J. Koornhof, South African Institute for Medical Research, Johannesburgo, Suráfrica; M. R. Jacobs, Case Western Reserve University, Ohio, Estados Unidos y A. Parkinson, Center for Disease Control Arctic Branch, Alaska, Estados Unidos.

La Tabla IV muestra algunas de las características de los 255 aislados clínicos utilizados en este estudio.

Tabla IV

Propiedades de los aislados clínicos utilizados en este estudio

## ESPAÑA (1)

Aislado	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Serogrupo (Serotipo)	$k_{360}$ [ $10^3$ ]	UFC $\log_{10}$
Sp 114	2	6 (6B)	0,81	2
Sp 257	2	23 (23F)	0,25	3
Sp 429	2	19	2,04	4
Sp 496	2	23 (23F)		
Sp 499	2	23 (23F)	-0,41	2
Sp 500	4	23		
Sp 521	1	19	1,84	5
Sp 590	1	19		
Sp 591	2	9	3,13	4
Sp 619	0.06	6 (6A)	0,49	4
Sp 622	2	23 (23F)		
Sp 623	1	19 (19A)		
Sp 625	2	6 (6B)	-0,19	3
Sp 629	1	9		
Sp 655	2	23		
Sp 656	2	6 (6B)	1,54	4
Sp 722	1	14		
Sp 753	1	14		
Sp 795	1	9		
Sp 811	2	9	1,36	4
Sp 873	2	6 (6B)	0,18	3
Sp 917	2	19		
Sp 946	4	9		
Sp 949	2	23 (23F)	0,11	3
Sp 961	2	6 (6B)		
Sp 962	2	23 (23F)	-0,33	4
Sp 970	2	6 (6B)	-1,14	4
Sp 980	2	6		
Sp 990	1	9		
Sp 994	4	6		
Sp 998	2	9	0,05	2
Sp 1010	2	9	2,10	4
Sp 1013	1	14	8,66	4
Sp 1024	2	9		
Sp 1033	2	14		
Sp 1044	2	14	3,00	4
Sp 1045	2	14		
Sp 1054	2	19		

Tabla IV (continuación)

## ESPAÑA (2)

Aislado	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Serogrupo (Serotipo)	$k_{360}$ [ $10^3$ ]	UFC $\log_{10}$
Sp 1069	1	14	5,59	4
Sp 1073	2	9		
Sp 1126	2	19	9,00	5
Sp 1149	2	9		
Sp 1177	1	9		
Sp 1182	2	14		
Sp 1191	1	19		
Sp 1238	2	6 (6B)	-1,57	2
Sp 1295	1	14		
Sp 1300	2	9		
Sp 1432	1	23 (23F)		
Sp 1625	2	6 (6B)		
Sp 1827	2	19 (19A)	3,49	4
Sp 1832	1	15 (15A)		
Sp 1998	0.06	6 (6A)	3,24	4
Sp 2057	0.03	1	6,11	6
Sp 2066	2	23 (23F)	-0,51	3
Sp 2067	2	6 (6B)		
Sp 2559	0.06	6 (6A)	0,86	6
Sp 2657	4	23 (23F)		
Sp 2690	0.06	1		
Sp 2809	0.03	6 (6A)	2,38	5
Sp 2811	1	6 (6A)		
Sp 2812	2	6 (6B)		
Sp 2990	1	23		
Sp 3067	0.015	19 (19A)		
Sp 3070	2	23		
Sp 3072	0.015	6 (6A)	0,65	5
Sp 3409	1	23		
Sp 3875	2	6		
Sp 4000	0.015	12 (12F)		
Sp 4283	0.03	34		
Sp 4309	0.015	6 (6B)	5,03	5
Sp 4364	2	23		
Sp 4368	1	15 (15A)		
Sp 4800	2	6 (6B)		
Sp 4855	0.015	19 (19F)		
Sp 4864	2	6 (6B)		
Sp 4971	0.03	2	2,82	>6
Sp 5041	2	9 (9V)		
Sp 5219	2	6		

Tabla IV (continuación)

**ESPAÑA (3)**

<b>Aislado</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Serogrupo (Serotipo)</b>	<b>k<sub>360</sub> [10<sup>3</sup>]</b>	<b>UFC log<sub>10</sub></b>
Sp 5224	2	6		
Sp 5229	1	14		
Sp 5311	0.06	3	8,79	6
Sp 5367	1	9 (9V)		
Sp 6694	0.015	23 (23A)	-1,17	3
Sp 7013	0.03	5		
Sp 7017	0.03	8	6,80	4
Sp 8792	2	6		
Sp 9300	2	23		
Sp 9545	2	14		
Sp 9887	1	14		
Sp 9890	2	6		
Sp 10199	2	23 (23F)		
Sp 10424	0.007	19 (19A)		
Sp 10427	0.06	3		
Sp 10539	2	23 (23F)		
Sp 10788	2	6		
Sp 10789	2	2		
Sp 11125	2	6		
Sp 11126	1	9 (9V)		
Sp 11128	2	6		
Sp 11837	0.015	8		
Sp 11848	0.015	23 (23A)	2,90	5
Sp 12294	0.03	8		
Sp 12303	0.015	24 (24F)		
Sp 12798	0.015	1		
Sp 12799	0.03	2		
Sp 29191	1	9 (9V)		

**SURAFRICA (1)**

SA Durbam 1	4	19	-9,01	1
SA 8		0.12	19	
SA 16		0.03	19	
SA 107	2	19		
SA 1172	2	19 (19A)	-1,18	0
SA 2852	0.12	6	1,12	3
SA 3118	2	23 (23F)		
SA 6368	0.25	19		

Tabla IV (continuación)

**SURAFRICA (2)**

<b>Aislado</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Serogrupo (Serotipo)</b>	<b>k<sub>360</sub> [10<sup>3</sup>]</b>	<b>UFC log<sub>10</sub></b>
SA 8249	6.2	19 (19A)	0,63	3
SA 8251	8	19 (19A)		
SA 17506	0.25	19 (19A)	5,61	4
SA 19794	0.25	14		
SA 22713	0.25	19 (19A)	9,23	>6
SA 22914	0.12	6 (6B)	0,68	0
SA 22915	0.25	6 (6B)	2,25	2
SA 22917	0.12	6 (6B)	-0,94	1
SA 27222	0.25	19 (19A)	4,99	5
SA 30445	0.25	19 (19A)	3,79	5
SA 34034	0.06	4		
SA 34104	2	23 (23F)	0,84	2
SA 34292	2	14		
SA 34295	2	14	-8,16	2
SA 43918	2	23 (23F)	0,83	4
SA 44165	4	6 (6B)	0,55	5
SA 61159	0.25	19 (19A)	8,20	5
SA 61192	0.25	6 (6B)	4,06	4
SA 61193	0.25	19 (19A)	5,08	5
SA 62332	0.25	19 (19A)	9,32	5
SA 65147	4	6 (6B)	-0,75	3
SA 66403	0.25	6	4,77	4
SA 70297	2	19 (19A)		
SA 70870	4	6	1,21	3
SA 135880	2	19 (19A)	2,08	3
SA 136584	2	19 (19A)	0,93	3

**HUNGRIA (1)**

Hun 146	8	19 (19A)	2,29	4
Hun 164	0.12	19 (19A)		
Hun 415	0.007	14	8,94	>6
Hun 524	2	19 (19A)	0,18	2
Hun 560	0.12	23 (23F)	0,74	3
Hun 663	4	19 (19A)	1,40	3
Hun 665	0.25	19 (19A)	1,50	2
Hun 701	0.5	19 (19F)	-0,24	4
Hun 859	8	19 (19A)	2,12	3
Hun 963	4	19 (19F)	3,25	6

Tabla IV (continuación)

**HUNGRÍA (2)**

<b>Aislado</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Serogrupo (Serotipo)</b>	<b>k<sub>360</sub> [10<sup>3</sup>]</b>	<b>UFC log<sub>10</sub></b>
Hun 2773	0.5	14	4,23	4
Hun 2842	0.25	23 (23F)	5,21	5
Hun 2863	2	19 (19A)	1,69	1
Hun 2888	0.12	14	7,46	3
Hun 4530	0.5	6	2,75	4
Hun 14210	0.12	9 (9N)	2,83	3
Hun 14315	2	19 (19A)	0,77	1
Hun 17543	0.12	6 (6B)	2,29	4
Hun 18619	0.007	15	3,80	4
Hun 18620	0.015	39	1,40	4
Hun 18621	0.007	1	3,34	6
Hun 18622	0.007	13	3,50	6
Hun 18623	0.015	1	1,38	3
Hun 18624	0.007	10	4,10	4
Hun 18628	0.015	5	3,33	4
Hun 21956	0.12	11 (11A)	2,69	2
Hun 21959	0.007	6	0,51	2
Hun 21960	0.007	4	0	4
Hun 21962	0.03	6 (6A)	1,76	5
Hun 21966	0.015	39	1,86	5
Hun 23995	0.25	19 (19A)	2,46	3
Hun 24058	2	11 (11A)	3,80	6
Hun 24369	0.12	11 (11A)	2,11	>6
Hun 25419	0.12	23 (23F)	0,69	2
Hun 27689	4	9 (9N)	0,09	4
Hun 27942	0.25	9 (9N)	0,23	4

**ALASKA (1)**

A 175		0.006	8	
A 661		0.06	6	
A 2513	0.5	6		
A 2514	0.03	6		
A 2515	0.03	6		
A 2516	0.25	6		
A 2517	0.25	6		
A 2518	0.06	6		
A 2519	0.06	6		
A 2520	0.03	6		
A 2521	0.03	6		

Tabla IV (continuación)

**ALASKA (2)**

<b>Aislado</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Serogrupo (Serotipo)</b>
A 2522	0.25	6
A 2523	0.03	6
A 2524	0.03	6
A 2526	0.03	6
A 2527	0.5	6
A 2528	0.25	6
A 2529	0.015	6
A 2530	0.03	6
A 2531	0.03	6
A 2532	0.03	6
A 2533	0.015	6
A 2534	0.03	6
A 2535	0.06	6
A 2536	0.06	6
A 2537	0.25	6
A 2538	0.03	6
A 2539	0.5	6
A 2541	0.5	6
A 2542	0.5	6
A 2543	0.25	6
A 2544	0.25	6
A 2545	0.03	6
A 2546	0.03	6
A 2547	0.03	6
A 2548	0.03	6
A 2549	0.03	6
A 2550	0.03	6
A 2551	0.5	6
A 2552	0.25	6
A 2553	0.03	6
A 2554	0.5	6
A 2555	0.03	6
A 2556	0.03	6
A 2557	0.03	6
A 2558	0.5	6
A 2559	0.03	6
A 2560	0.03	6
A 2561	0.25	6
A 2562	0.25	6
A 2563	0.25	6
A 2564	0.25	6
A 2565	0.03	6

Tabla IV (continuación)

**ALASKA (3)**

<b>Aislado</b>	<b>CMI (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Serogrupo (Serotipo)</b>
A 2566	0.5	6
A 2567	0.5	6
A 2743	0.015	6
A 2744	0.03	6
A 2745	0.015	6
A 2746	0.5	6
A 2747	0.03	6
A 2748	0.015	6
A 2749	0.03	6
A 2750	0.03	6
A 2751	0.25	6
A 2752	0.03	6

**OTROS**

US 1961	2	23 (23F)
US 1969	2	23 (23F)
US 1977	2	23 (23F)
US 1983	2	23 (23F)
US 10481	2	23 (23F)
US 399123	1	14
US 937900	2	23 (23F)
US 1071562	2	23 (23F)
US C.J.H.	1	14
US M.G.H.	2	23
PNG 2955	2	6
Czch 29044	16	14
Czch 29055	8	14

$k_{360}$  - lisis producida mediante penicilina ( $10 \times \text{CMI}$ ) a las 6 h

$$k_{360} = \text{Ln} (A_0/A_{360}) \times \text{min}^{-1}$$

UFC - medida de la pérdida de  $\log_{10}$  en las unidades formadoras de colonias (UFC), después de 4 h de tratamiento con penicilina ( $10 \times \text{CMI}$ )

## 3.2. MATERIALES

### 3.2.1. PRODUCTOS Y REACTIVOS

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico y disponibles comercialmente.

Acrilamida (Bio-Rad), N,N'-metilenbisacrilamida (Bio-Rad), Almidón (Connaught) y Agarosa (FMC) fueron de grado electroforético.

Los antibióticos utilizados han sido: bencilpenicilina (Eli Lilly & Co), piperacilina (Lederle), cefotaxima (Roussell), cloranfenicol (Parke Davis), tetraciclina (Llorens) y eritromicina (Ested).

[Bencil-4-<sup>3</sup>H]-penicilina, Sal de etilpiperidinio, con una actividad específica de 72,80 mCi/mg, fué donada por el Dr. Allen N. Jones, Merck, Sharp & Dohme (Rahway, N.J., EE.UU.). Este compuesto se prepara sintéticamente a partir de 6-APA y para-[<sup>3</sup>H]-fenil-acetil-cloruro y se almacena a -20°C para limitar su degradación. Antes de cada experimento es necesario eliminar la acetona de las muestras. La sal de piperidinio de la bencilpenicilina posee la misma actividad biológica que la sal potásica, así la cepa R6 muestra el mismo valor de CMI con ambas sales. La ventaja de la sal de piperidinio es que permite su solubilidad en acetona disminuyéndose de esta forma la degradación de la penicilina radiactiva.

Los precursores radiactivos [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP y [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dTTP (30 Ci/mmol) fueron adquiridos a Amersham Internacional.

Los ácidos desoxirribonucleicos del bacteriofago lambda y del plásmido pBR322 utilizados como marcadores de pesos moleculares fueron obtenidos de Pharmacia. Los oligonucleótidos utilizados se sintetizaron en el Departamento de Genética Microbiana de la Universidad de Sussex. El iniciador universal y los desoxinucleótidos fueron adquiridos a Boerinhger.

Se utilizaron las siguientes proteínas: enzimas de restricción (Pharmacia), fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* (Boerinhger) *Taq* polimerasa (Cetus), RNasa y proteínasa K (Sigma). La autolisina neumocócica fué purificada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Rockefeller.

El material fotográfico utilizado fué: Película XAR-2 (Kodak) para fluorografía, película Rx (Fuji) para autorradiografía, y películas instantáneas Polaroid 665 (positivo-negativo) y Polaroid 667 (positivo).

### 3.2.2. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los aislados se crecieron en un medio semi-sintético (medio "C") de pH 8,0, suplementado con extracto de levadura (Difco) en una concentración final de 1 mg/ml (medio "C+Y"). Este medio descrito por Lacks y Hotchkiss en 1.960 fué modificado posteriormente (Tomasz y Hotchkiss, 1964) para el crecimiento de células en estado competente, por ello se le llamó medio "C" ("C" de competencia). La Tabla V muestra la composición de este medio. En los experimentos de transformación genética se utilizaron dos modificaciones de este medio: medio "CpH 8 + albúmina" (medio "C" suplementado

con 800 mg/l de seroalbúmina bovina) y medio "CpH 6,6" (medio "C" con un pH de 6,6).

Las placas de agar-sangre se prepararon disolviendo 40 gr de Agar Tripticasa Soja (TSA) en 1 litro de agua destilada. Después de esterilizar en autoclave durante 15 minutos, se dejó enfriar hasta 45°C y se le añadió 5% de sangre de carnero defibrinada y estéril. Para placas conteniendo antibiótico, los antibióticos se añadieron antes de distribuir las placas.

Tabla V

**Composición del medio semi-sintético "C"**

(Tomasz y Hotchkiss, 1.964)

## Ingredientes por litro:

K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H	8,5 g
Hidrolizado de Caseina (Difco)	5,0 g
Acetato sódico	2,0 g
Glucosa	2,0 g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,5 g
Sacarosa	200,0 mg
Cisteina	35,0 mg
Glutamina	10,0 mg
Triptófano	6,0 mg
Adenina	5,0 mg
CaCl <sub>2</sub>	2,5 mg
Pantotenato cálcico	0,6 mg
Acido nicotínico	0,2 mg
Piridoxina-HCl	0,2 mg
Tiamina-HCl	0,2 mg
Riboflavina	0,1 mg
MnSO <sub>4</sub> -4H <sub>2</sub> O	25,0 µg
FeSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,5 µg
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0,5 µg
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0,5 µg
Biotina	0,2 µg

### 3.3. METODOS

#### 3.3.1. CRECIMIENTO BACTERIANO

El crecimiento de los cultivos de neumococos se valoró mediante la medida de la densidad óptica (turbidez) o absorbancia a 620 nm ( $DO_{620}$ ) utilizando un espectrofotómetro (Sequioa-Turner Instruments). Los cultivos se prepararon a partir de cultivos congelados con  $10^8$  unidades viables/ml ( $DO_{620}$  0,6) y glicerol a una concentración final del 10% (v/v). Para su conservación, los cultivos fueron congelados utilizando un baño de hielo seco-acetona y mantenidos a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.2. SEROGRUPADO (REACCIÓN DE PRECIPITACION CAPSULAR)

El serogrupado de los neumococos se realizó mediante la reacción de precipitación capsular o "quellung" que es un método basado en el fenómeno óptico que se produce al poner en contacto el neumococo con su suero anticapsular homólogo, ya que el precipitado formado por la unión del polisacárido capsular y el anticuerpo capsular homólogo posee propiedades refractoras, y al microscopio, el neumococo aparece rodeado por un halo.

A partir de un cultivo en medio sólido se preparó una suspensión homogénea y poco densa. En un porta de vidrio se realizó una extensión de la suspensión y se dejó secar a temperatura ambiente. Sobre la extensión se colocaron y mezclaron  $10\mu\text{l}$  de antisuero (Statens Seruminstitut, Dinamarca) y  $20\mu\text{l}$  de azul de metileno (1%). La preparación se cubrió con un cubre-objetos y se examinó al microscopio óptico con el

objetivo de inmersión. Debido a la existencia de un elevado número de tipos neumocócicos individuales, el tipado se realizó en tres etapas: primero utilizando un suero polivalente altamente concentrado, *omnisuero*, el cual reacciona con todos los tipos capsulares neumocócicos; después, la reacción de "quellung" se repitió con sucesivos sueros multivalentes, compuestos por anticuerpos contra 7-11 tipos, hasta que se encontró una reacción positiva, y finalmente, se probaron los antisueros contra tipos individuales comprendidos en el suero multivalente hasta que se obtuvo una reacción tipo-específica.

### **3.3.3. EFECTOS DE LA PENICILINA EN LOS CULTIVOS**

#### **3.3.3.1. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI)**

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración menor de antibiótico que no permite el crecimiento del microorganismo. El estudio de los valores de CMI se realizó en medio sólido, utilizando placas de agar-sangre a las que se le añadieron diluciones dobles de bencilpenicilina, sal potásica (Eli Lilly & Co), que variaban desde  $0,007\mu\text{g/ml}$  hasta  $8\mu\text{g/ml}$ . Las placas se sembraron mediante un replicador "Steers" utilizando como inóculo cultivos de  $10^5$  UFC/ml en medio C+Y. Las placas fueron incubadas aeróbicamente durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ .

Las categorías de sensibilidad se establecieron siguiendo los valores de CMIs determinados en el Manual del Comité Nacional para Laboratorios Clínicos Estandar M7-A-S2 de los Estados Unidos (Jones, 1988), siendo: sensibles, CMI menor de

0,12µg/ml; resistencia intermedia, CMI comprendida entre 0,1 y 1µg/ml; resistentes, CMI mayor de 1µg/ml

### 3.3.3.2. CURVAS DE LISIS

La autólisis producida en el cultivo como consecuencia de su exposición a penicilina fué medida en 10 ml de cultivo en crecimiento exponencial ( $DO_{620}$  0,25, que corresponde a  $10^8$  UFC/ml), al cual se le añadió el antibiótico en una concentración final 10 veces superior al valor de su respectiva CMI. Después de la adición del antibiótico se midió la  $DO_{620}$  del cultivo durante 6 h a intervalos de 30 min; asimismo, se determinó la  $DO_{620}$  de los cultivos a las 24 h de incubación en presencia de penicilina. Para evaluar la autólisis en fase estacionaria se utilizaron cultivos control que no habían recibido el antibiótico.

Las cantidades de autólisis se expresaron como la constante de primer orden " $k_{360}$ " (Liu y Tomasz, 1985) donde  $A_0$  representa la lectura  $DO_{620}$  en el momento de adición del antibiótico y  $A_{360}$  es la lectura  $DO_{620}$  después de 360 min (6 h) de incubación en presencia del antibiótico

$$k_{360} = \text{Ln} (A_0/A_{360}) \times \text{min}^{-1}$$

### 3.3.3.3. CURVAS DE SUPERVIVENCIA

Se estudió la supervivencia del cultivo para determinar el efecto del tratamiento con antibiótico en el número de bacterias viables del cultivo. Para ello, a partir de los cultivos utilizados en las curvas de lisis, se tomaron

fracciones de 100 $\mu$ l antes de la adición del antibiótico y después de 4 h de exposición. Las muestras fueron diluídas de forma seriada en el medio C+Y suplementado con 100 unidades de penicilinas por ml (Becton Dickinson) para eliminar el exceso de penicilina, y sembradas en placas de agar-sangre. Se determinó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) antes de la adición del antibiótico (tiempo 0) y después de 4 horas de incubación.

### **3.3.4. PASE DE LOS CULTIVOS**

#### **3.3.4.1. PASES CONSECUTIVOS IN VIVO**

El pase de los cultivos *in vivo* se realizó mediante inyección intraperitoneal en ratones. El ratón blanco es muy sensible a la infección neumocócica cuando es inoculado por vía intraperitoneal, a partir del ratón muerto es posible aislar el neumococo en un cultivo puro debido a que el ratón blanco suele eliminar otras bacterias presentes en la muestra. Se inocularon intraperitonealmente ratones hembras CD-1 de 8 semanas con 0,4 ml de un inóculo bacteriano en fase exponencial de crecimiento. Los aislados bacterianos fueron pasados en ratones cinco veces consecutivas de la siguiente manera. Grupos de 3 ratones fueron inoculados utilizando inóculos densos ( $10^7$ - $10^8$  UFC) de un aislado determinado. En un período de 12-24 h los ratones morían de sepsis neumocócica; después, los bazos eran extraídos asépticamente, homogeneizados, suspendidos en un medio nutritivo e incubados a 37°C durante 16-18 h. Este cultivo fué utilizado para inocular un segundo lote de animales.

#### 3.3.4.2. PASES CONSECUTIVOS *IN VITRO*

Los cultivos de neumococos fueron crecidos en el medio semisintético C+Y aproximadamente durante 150-200 generaciones.

#### 3.3.4.3. PASES EN MEDIO CONTENIENDO PENICILINA

Mediante la exposición no continua a elevadas concentraciones de antibiótico se consigue una selección de neumococos tolerantes pero con valores de CMI inalterados (Moreillon y Tomasz, 1988). El procedimiento utilizado consistió en someter 10 ml de cultivos en medio C+Y creciendo en fase exponencial ( $10^8$  UFC/ml) a un tratamiento con penicilina en una concentración 5 veces superior al valor de su CMI. Después de una incubación de 4 h las células se lavaron y resuspendieron en un medio libre de penicilina. Las bacterias supervivientes se crecieron en medio C+Y y posteriormente, fueron tratadas de nuevo con el antibiótico. Este procedimiento fué repetido durante 10 ciclos.

#### 3.3.5. MARCAJE DE LAS PROTEINAS FIJADORAS DE PENICILINA (PBPs)

##### 3.3.5.1. MARCAJE DE PBPs *IN VIVO*

Las Proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) fueron identificadas al marcar bacterias vivas y completas con penicilina radiactiva según el método descrito por Williamson et al. (1980). Se utilizaron fracciones de 1 ml de cultivos en fase de crecimiento exponencial temprana, con densidades

ópticas similares y representando  $10^8$  UFC/ml (aproximadamente, 80-100  $\mu\text{g/ml}$  de proteína total). Los cultivos se incubaron durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$  con [ $^3\text{H}$ ]-bencilpenicilina Merck, Sharp & Dohme) en una concentración final de  $1\mu\text{g/ml}$ ; en los experimentos diseñados para determinar la afinidad de las PBPs hacia penicilina marcada, las fracciones del cultivo fueron expuestas a una serie de concentraciones de [ $^3\text{H}$ ]-bencilpenicilina que variaban de 10 a 5.000 ng/ml. El marcaje de las PBPs se detuvo mediante la transferencia a un baño de hielo y por la adición de un exceso de penicilina no marcada (en una concentración final de  $200\mu\text{g/ml}$ ). Las bacterias fueron recuperadas mediante una centrifugación ( $6.000 \times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$ ) y el sedimento se resuspendió en  $50\mu\text{l}$  de tampón fosfato potásico 50mM pH 7,0. Las células se lisaron mediante la incubación durante 10 min a  $37^\circ\text{C}$  en Sarcosil-NL-97 (INC Pharmaceuticals) a una concentración final del 2%.

Después de realizado el marcaje de las PBPs las muestras fueron preparadas para electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida mediante la adición de  $25\mu\text{l}$  de tampón de electroforesis Tris-ClH 0,008M pH 6,8 conteniendo SDS (3%), glicerol (30%) y azul de bromofenol (0,02%); finalmente, se añadieron  $10\mu\text{l}$  de 2- $\beta$ -mercaptoetanol.

### 3.3.5.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE SDS-POLIACRILAMIDA

Se denomina "electroforesis" al transporte de partículas en un campo eléctrico. En la electroforesis en presencia de 2- $\beta$ -mercaptoetanol y del detergente aniónico dodecil-sulfato sódico (SDS), las proteínas se disocian en sus subunidades y los complejos "proteína-SDS" se comportan como partículas

alargadas en las que la longitud de la partícula varia únicamente con el peso molecular de las cadenas polipeptídicas.

Para la detección de las PBPs se utilizó un sistema de electroforesis discontinuo en geles de poliacrilamida conteniendo SDS. La electroforesis se realizó esencialmente según el método de Laemmly y Favre (1973), pero las concentraciones de acrilamida y N,N'-metilenbisacrilamida (Bio-Rad) utilizadas fueron 7,49% y 0,12% en el gel separador y 3,58% y 0,057% en el gel concentrador, respectivamente. Los tampones utilizados fueron Tris-ClH 1,5M pH 8,8 en el gel separador y Tris-ClH 0,5M pH 6,8 en el gel concentrador.

La electroforesis fué realizada a un voltaje constante de 60 voltios en el gel concentrador y 120 voltios en el gel separador.

Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (Bio-Rad) por el método de Fairbanks et al. (1971) y decolorados mediante varios cambios de una solución de metanol:ácido acético:agua en la proporción 30:10:60.

### 3.3.5.3. FLUOROGRAFIA Y DETECCION DE PBPs

Los geles fueron preparados para fluorografía según el método de Bonner y Laskey (1974). Para ello los geles fueron impregnados en dimetil-sulfóxido (DMSO)(EM Science) durante dos periodos de 30 min, seguidos de un tratamiento durante 90 min con PPO-DMSO al 20% (PPO, 2,5-Difeniloxazol). Posteriormente, los geles fueron secados al vacio y expuestos a una película XAR-2 (Eastman Kodak) sensibilizada previamente. Este proceso consistió en someter la película a un pulso durante 40 seg con

un filtro 0 a 100 mA y 40 Kvp; mediante la utilización de este tipo de película se obtiene una relación proporcional entre la radiactividad incorporada y la impresión que aparece en la película (Laskey y Mills, 1975). El tiempo de exposición de los fluorogramas fué de 6 días a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las películas se revelaron utilizando un procesador Kodak RP X-Omat (Modelo MGB).

Los pesos moleculares de las PBPs fueron estimados mediante comparación con los controles de peso molecular (Sigma) en los geles teñidos con azul de Coomassie y en los fluorogramas. El número e intensidad de las bandas en los fluorogramas fué evaluado mediante una observación visual.

### **3.3.6. TRANSFORMACION GENETICA**

#### **3.3.6.1. PREPARACION DE DNA CROMOSOMICO**

El procedimiento utilizado para la preparación y purificación de DNA cromosómico implicó varias etapas (Sambrook et al., 1989). Los cultivos de neumococo se crecieron en el medio C+Y (200 ml) hasta alcanzar un valor de  $\text{DO}_{620}$  igual a 0,650, después de lo cual fueron sedimentados mediante una centrifugación durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  (10.000 rpm en un rotor Sorvall GSA). Los sedimentos fueron lavados y resuspendidos en 7 ml de tampón TES (20mM Tris, 50mM ClNa, 10mM EDTA) pH 7,5. Posteriormente, se añadieron 100 $\mu\text{l}$  de desoxicolato sódico al 4% y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5-15 min hasta que fué evidente la lisis de las células (observándose una pérdida en la turbidez y un aumento en la viscosidad de la suspensión debido a la liberación del DNA). El lisado celular obtenido fué

desproteínizado dos veces mediante la agitación en una mezcla compuesta por fenol:cloroformo:isoamilalcohol en la proporción 25:24:1. El RNA fué hidrolizado enzimáticamente mediante el tratamiento durante 1 h a 37°C con ribonucleasa A (Type I-AS, Sigma) en una concentración de 100 µg/ml (la ribonucleasa fué hervida previamente durante 15 min para inactivar cualquier posible nucleasa contaminante). Después, se repitió el procedimiento de desproteínización hasta que la interfase conteniendo las proteínas fué menor de 1mm de espesor. El DNA fué precipitado añadiendo suavemente dos volúmenes de etanol absoluto a -70°C; para eliminar los contaminantes solubles en agua, el DNA precipitado fué lavado con etanol al 70%. Finalmente, el DNA se disolvió en tampón TE (10mM Tris, 1mM EDTA) pH 8,0; el volumen de tampón TE añadido varió en función de la cantidad de DNA obtenido, como norma general se pretendió ajustar a una concentración de 1µg de DNA por ml de tampón.

Para valorar la concentración de DNA en una muestra pura (es decir, sin cantidades importantes de contaminantes como proteínas, fenol u otros ácidos nucleicos) el método más simple consiste en medir la cantidad de radiación UV absorbida por las bases nitrogenadas (Sambrook et al., 1989). Para ello, las soluciones de DNA fueron sometidas a lecturas a 260nm y 280nm en un espectrofotómetro (LKB-Biochrom); la lectura a 260nm permitió calcular la concentración de ácidos nucleicos de la muestra ya que a esa longitud de onda una densidad óptica de 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de DNA de doble cadena, 40 µg/ml de RNA o DNA de una sólo cadena, ó a 20 µg/ml de oligonucleótidos.

La relación entre las lecturas de absorbancia a 260nm y 280nm ( $DO_{260}/DO_{280}$ ) dá una aproximación de la pureza del ácido nucleico; de forma que las preparaciones puras de DNA y RNA

poseen una relación de 1,8 y 2,0 respectivamente, sin embargo la relación es menor de estos valores cuando existe contaminación con fenol o proteínas.

### 3.3.6.2. PREPARACION DE CELULAS EN ESTADO COMPETENTE

En *S. pneumoniae* la competencia para la transformación genética es un estado celular especializado (Tomasz, 1971) (Morrison et al., 1982) (Morrison, 1990). Las células alcanzan este estado sólo en un cultivo creciendo activamente y con una concentración celular determinada (Tomasz y Hotchkiss, 1964) (Tomasz, 1966). El estado de competencia está regulado por una proteína llamada "Factor de competencia" (FC), de forma que cuando el FC se acumula por encima de un determinado nivel se induce la competencia del cultivo. La respuesta celular frente al FC es compleja y origina algunas propiedades nuevas en el cultivo, entre ellas la posesión de un sistema más efectivo para procesar el DNA durante la recombinación (Chandler y Morrison, 1987).

El procedimiento utilizado para obtener células competentes fué una modificación del método de Tiraby y Fox (1974). Un cultivo de  $10^7$  células/ml crecidas en medio CpH 6,6 fué utilizado como inóculo en el medio CpH 8 + albúmina, en una proporción 1:10, seguido de una incubación a 37°C. El tiempo de incubación a 37°C necesario para alcanzar el óptimo en el estado de competencia varió entre 60 y 90 min dependiendo del tiempo de generación del cultivo utilizado. Pasado este tiempo, se tomaron fracciones del cultivo (2,5 ml) e incubaron a 30°C durante 30 min, después de lo cual las células se encontraban en estado competente. Las células competentes se conservaron congeladas a -70°C en glicerol al 10%.

La competencia del cultivo se valoró al realizar una transformación utilizando un DNA que codifica para resistencia a estreptomicina; la resistencia a este compuesto se consigue en un único ciclo y es un carácter que presenta una alta frecuencia de transformación. El estado de competencia se determinó como el número de colonias resistentes a estreptomicina obtenidas en el experimento de transformación.

### 3.3.6.3. TRANSFORMACION

Se utilizó una modificación del método de Kent et al. (1963). Una fracción de 100µl de la suspensión de células competentes (conteniendo  $2-5 \times 10^5$  unidades viables) fue añadida a 0,9 ml de medio CpH 8 + albúmina. Se realizó una preincubación durante 5 min a 30°C para asegurar que las células competentes alcanzaron esta temperatura; después, se le añadió 1µg de DNA. La mezcla se incubó a 30°C durante 30 min para permitir la interacción entre las células competentes y el DNA; pasado este tiempo, las células se diluyeron en 2 ml del medio C+Y y se incubaron a 37°C durante 90 minutos para permitir la expresión del fenotipo transformado. Al final del tiempo de expresión, los cultivos se valoraron para el número de organismos viables totales y para organismos capaces de crecer bajo las condiciones selectivas de los marcadores implicados (placas de agar-sangre conteniendo antibiótico). En todos los experimentos de transformación, los tubos control fueron procesados igual que los tubos experimentales, excepto que en ellos no se añadió DNA.

#### 3.3.6.4. AISLAMIENTO DE TRANSFORMANTES

El aislamiento de transformantes resistentes a penicilina implica varios ciclos de transformación (Shockley y Hotchkiss, 1970). Las colonias transformantes obtenidas después del primer ciclo de transformación y recogidas a partir de placas conteniendo una determinada concentración de penicilina, se purificaron en placas de agar-sangre sin antibiótico y posteriormente, en medio C+Y. Los cultivos transformantes así obtenidos se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

La construcción de transformantes con un nivel superior de resistencia a penicilina requirió otro ciclo de transformación, en el que se utilizaron como receptores de DNA las células competentes obtenidas a partir de los transformantes del primer ciclo. Todos los transformantes se purificaron en placas de agar-sangre y en medio C+Y antes de ser almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en un medio conteniendo glicerol al 10%.

#### 3.3.7. ESTUDIO DE LOS PEPTIDOS DE PARED CELULAR

Se puede determinar el esqueleto peptídico de las paredes celulares del neumococo utilizando un procedimiento consistente en solubilizar las paredes celulares con la autolisina neumocócica, fraccionar el material peptídico obtenido y someterlo a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (García-Bustos et al., 1987).

### 3.3.7.1. PREPARACION DE PAREDES CELULARES

Las paredes celulares se prepararon según el método descrito previamente (García-Bustos et al., 1987). Los neumococos se crecieron en el medio C+Y hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, correspondiente a una  $DO_{620}$  entre 0,5-0,6. Las células fueron sedimentadas mediante una centrifugación a 4°C, 5.000 x g, durante 15 min; el sedimento se resuspendió en tampón Tris-ClH 50mM pH 7,0. Para inactivar la autolisina se le añadió SDS al 5% a la suspensión celular, hirviéndose durante 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm en un rotor Beckman SS34 durante 10 min. El sedimento fué lavado dos veces en ClNa 1M y tres veces en agua destilada para eliminar el SDS. Posteriormente, se realizó la desintegración de las células sometiénolas a 10 ciclos de 1 min de agitación mecánica con bolas de vidrio (Serva 20-120). El grado de rotura se comprobó mediante un examen al microscopio. Después, se realizó una centrifugación a 2.000 rpm (5 min, temperatura ambiente) en un rotor SS34 para separar las células intactas de las paredes celulares. El sobrenadante fué sometido a una nueva centrifugación a 15.000 rpm (rotor SS34) durante 15 min a temperatura ambiente, de esta forma las paredes quedaron sedimentadas.

Las paredes fueron resuspendidas en tampón Tris 100mM pH 7,5 conteniendo  $NaN_3$  al 0,05%. Para degradar los ácidos nucleicos, las suspensiones de pared se sometieron a un tratamiento a 37°C durante 2 horas con  $MgSO_4$  (20mM concentración final), DNasa (10µg/ml) y RNasa (50µg/ml). Para degradar las proteínas se añadió una proteasa, tripsina, en una concentración de 100µg/ml, además se añadió  $CaCl_2$  10mM para prevenir la autodigestión de la tripsina. Se dejó actuar a 37°C

durante toda la noche con agitación magnética. Se le añadió SDS (concentración final 1%) a 60-80°C durante 15 min para eliminar todas las proteínas; después de lo cual se realizó una sedimentación y un lavado posterior en agua destilada a 15.000 rpm (rotor SS34) durante 15 min a temperatura ambiente.

El sedimento así obtenido se resuspendió en ClLi 8M para eliminar el material adherido mediante puentes iónicos, como por ejemplo el ácido teicoico recién sintetizado. Después, se sometió a una centrifugación a 15.000 rpm durante 15 min a 37°C. El sedimento fue lavado dos veces con EDTA 100mM para eliminar los cationes divalentes. Posteriormente, se le añadió acetona para asegurar que no existe ácido lipoteicoico en este punto de la preparación; se lavó y se resuspendió en agua destilada. Las paredes fueron conservadas liofilizadas; por término medio, se obtuvieron 7,6 mg de pared seca por litro de cultivo inicial.

### 3.3.7.2. DIGESTION CON AUTOLISINA

La autolisina neumocócica es una amidasa N-acetil muramil-L-alanina, que rompe el enlace amida entre los residuos de L-alanina y de ácido murámico originando dos clases de productos: una fracción de elevado peso molecular que contiene el esqueleto de glucano y los ácidos teicoicos, y una fracción de peso molecular menor que contiene los monómeros, dímeros y trímeros del tetrapéptido.

La digestión se realizó según el método descrito por García-Bustos *et al.* (1987), para lo cual fue necesario resuspender la pared celular liofilizada en un tampón consistente en N-metilmorfolina-ácido acético 50mM pH 7,0 con

0,1% de Brij-35, el detergente se utilizó para aumentar la estabilidad del enzima. La autolisina se añadió en una concentración de 50mM por mol y se dejó actuar durante 18 horas a 37°C con agitación magnética. Pasado este tiempo, se realizó una sedimentación en minifuga durante 15 min, el sobrenadante se aspiró y el sedimento se secó al vacío. Cuando la solubilización no fué muy efectiva, el sedimento se sometió a una nueva digestión con autolisina.

Para extraer el tampón residual el sedimento seco se resuspendió en acetona (calidad UV) mediante sonicación hasta que se obtuvo un precipitado fino. Después, se realizó una centrifugación durante 15 min en una minifuga. El precipitado se secó y resuspendió en una solución de agua:acetonitrilo:isopropanol (30:25:25) conteniendo ácido trifluoroacético (ATF) al 0,1% (v/v) para extraer los péptidos. Se realizó una nueva sedimentación durante 15 min en minifuga. El sobrenadante se secó mediante evaporación al vacío, y el residuo, conteniendo los péptidos, se disolvió en ATF al 0,1%. Después de este procedimiento los péptidos quedaron preparados para su análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

### 3.3.7.3. ANALISIS DE LOS PEPTIDOS MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

La cromatografía es un método de separación en el que las mezclas se resuelven en función de la diferente movilidad de sus constituyentes durante su paso a través de una columna cromatográfica. El proceso de separación está determinado por la distribución de sustancias entre dos fases: la fase móvil y la fase estacionaria. La interacción que se produce entre las

moléculas de soluto y las moléculas de cada fase viene determinada por las propiedades físicas y químicas de las moléculas de soluto en un medio dado (Krstulovic y Brown, 1982). La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite una separación altamente resolutiva mediante la utilización de soportes cromatográficos particulados uniformemente. La utilización de HPLC permite la separación y recuperación de sustancias volátiles, por lo que se recomienda para resolver moléculas de alta polaridad, de elevado peso molecular, con elevado número de grupos iónicos o térmicamente inestables; todas estas propiedades son características de la mayoría de las macromoléculas biológicas (Hancock y Sparrow, 1983).

La HPLC se realizó en un sistema similar al descrito por García-Bustos et al. (1988); se utilizó un sistema cromatográfico Waters (Waters Associates, Mass.) constituido por un sistema controlador 721, dos bombas 510, un inyector U6K y un módulo de datos 730. El detector espectrofotométrico utilizado fué ISCO-V4 de longitud de onda variable, con una longitud de vía de 6mm y un volumen celular de flujo de 3,5 $\mu$ l. Se utilizó una columna VYDAC 218TP54 (The Separation Group, Calif.) El solvente de elución fué un gradiente lineal de 100 min desde 0,1% de ATF (Pierce) hasta 15% acetonitrilo (Burdick) en 0,1% ATF, bombeado a un flujo de 0,5 ml/min.

Las fracciones eluidas fueron detectadas por su absorbancia a 210 nm ( $A_{210}$ ), siendo ésta la longitud de onda a la que absorben las uniones amidas de los péptidos.

### 3.3.8. ELECTROFORESIS DE ISOENZIMAS

Esta técnica permite caracterizar los organismos en función de la movilidad electroforética relativa de enzimas celulares solubles en agua. La carga electrostática neta y por consiguiente, la migración de una proteína durante la electroforesis viene determinada por su secuencia de aminoácidos; por lo que las variantes en movilidad de una enzima ("electromorfos", "aloenzimas" o "isoenzimas") pueden ser asociadas a alelos en el locus del gen estructural correspondiente (Selander et al., 1986). La ventaja principal de esta técnica es que permite relacionar directamente la movilidad con la variación alélica de los genes específicos que codifican para enzimas específicas.

#### 3.3.8.1. PREPARACION DE LOS EXTRACTOS

Los cultivos de neumococos se crecieron en el medio C+Y en volúmenes de 200ml, hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial ( $DO_{620}$  0,6). Las células se sedimentaron mediante una centrifugación a 15.000 g durante 10 min y el sedimento fue resuspendido en 1,5 ml de tampón TE pH 8 (Tris-ClH 50mM y EDTA 5mM). Posteriormente, las células se lisaron mediante sonicación con una micropunta durante 45 segundos a 4°C y el extracto obtenido se centrifugó a 20.000 x g durante 20 min a 4°C. Alicuotas del sobrenadante se congelaron a -70°C hasta el momento de realización de la electroforesis.

### 3.3.8.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE ALMIDON

Se realizó un método similar al descrito por Selander *et al.* (1986), para lo cual se utilizaron geles de almidón (Connaught) al 11,4% en el correspondiente tampón (consultar Tabla VI). El tamaño de los geles fué de 19 x 21 cm. Las muestras (lisados celulares) se impregnaron en papel Whatmann 3MM (9 x 6 mm) y se colocaron, a intervalos de 3 mm, en un corte continuo realizado previamente en el gel. En ambos extremos se utilizó papel impregnado en marcador de amaranto como marcador de la electroforesis. Se utilizó un aparato de electroforesis horizontal para geles de almidón; la electroforesis se realizó a voltaje constante, variando de 150 a 300 voltios en función del tampón utilizado. Después de la electroforesis se cortaron 3 o 4 láminas horizontales del gel (de 1 a 2 mm de grosor) y se incubaron a 37°C en la solución de teñido para la enzima correspondiente.

### 3.3.8.3. TEÑIDO PARA ENZIMAS ESPECIFICAS

El tampón y colorante utilizados para cada enzima están reflejados en la Tabla VI. Después de añadir el colorante, los geles se incubaron a 37°C en oscuridad hasta que se observó la aparición de bandas; el tiempo de incubación varió desde 10 min hasta varias horas. El gel se lavó en agua y se fijó con una mezcla de ácido acético:metanol:agua en la proporción 1:5:5.

Tabla VI

Enzimas analizadas y sistemas recomendados para su estudio

1.- SOLUCIONES DE TEÑIDO PARA OXIDORREDUCTASAS  
(DESHIDROGENASAS)

Enz	Sustrato y Enzima acoplada	Tampón	Sal	Coenzima
LDH	DL-Lactato de litio	Glicil-glicina 0,1M (pH 7,5)		NAD
GP1	Fructosa difosfato Aldolasa	Tris-ClH (pH 8,0)	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	NAD NADP
GP2	Fructosa difosfato Aldolasa	Tris-ClH (pH 8,0)	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	NAD NADP
6PG	Ac-6-Fosfogluconico	Tris-ClH (pH 8,0)	MgCl <sub>2</sub> 0,1M	NADP
ADH	Etanol Isopropanol	Tris-ClH (pH 8,0)		NAD

## 2.- SOLUCIONES DE TEÑIDO PARA TRANSFERASAS

Enz	Sustrato y coenzima	Tampón y sal	Catalito
NSP	Iosina Xantina oxidasa	Fosfato sódico (pH 7,0)	MTT PMS
ADK	Glucosa ADP Hexoquinasa Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa NADP	Tris-ClH 0,2M (pH 8,0) MgCl <sub>2</sub> 0,1M	MTT PMS
PGM	Glucosa-1-fosfato Glucosa-1,6-difosfato Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	Tris-ClH 0,2M (pH 8,0) MgCl <sub>2</sub> 0,1M	MTT PMS

Tabla VI (continuación)

## 3.- SOLUCIONES DE TEÑIDO PARA HIDROLASAS

Enz	Sustrato y enzima	Tampón y sal	Colorante
EST	$\alpha/\beta$ -naftil acetato $\alpha/\beta$ -naftil-propionato	Fosfato sódico (pH 7,0)	Azul rápido
LAP	Hidrocloruro de L-leucina- $\beta$ -naftilamida	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1M (pH 5,5) MgCl <sub>2</sub> 0,1M	Negro K

## 4.- SOLUCIONES DE TEÑIDO PARA ISOMERASAS

Enz	Sustrato y enzima	Tampón y sal	Catalito
PGI	Fructosa-6-fosfato Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa NADP	Tris-ClH 0,2M (pH 8,0) MgCl <sub>2</sub> 0,1 M	PMS MTT

LDH	L-lactato deshidrogenasa		
GP1	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ( <i>locus</i> 1)		
GP2	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ( <i>locus</i> 2)		
6PG	6-Fosfogluconato deshidrogenasa		
ADH	Alcohol deshidrogenasa		
NSP	Nucleósido fosforilasa		
ADK	Adenilato quinasa		
PGM	Fosfoglucomutasa		
EST	$\alpha/\beta$ -naftil propionato esterasa		
LAP	Leucina aminopeptidasa		
PGI	Fosfoglucosa isomerasa		
MTT	dimetiltiazol tetrazolio		
PMS	fenazina metosulfato		

### 3.3.9. DIGESTION DE DNA CROMOSOMICO

Al digerir el DNA bacteriano con enzimas de restricción y someterlo a electroforesis en geles de agarosa se consigue un patrón de fragmentos de DNA; el modelo de bandas obtenido es específico del organismo y está determinado por un número restringido de sitios disponibles para la rotura enzimática característico del DNA.

#### 3.3.9.1. DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

El DNA cromosómico se obtuvo mediante el procedimiento mostrado en la sección 3.3.6.1. La digestión se realizó mediante una modificación del método descrito previamente (Viering y Fine, 1989); para lo cual 4µg de DNA cromosómico se digirieron durante 18 horas a 37°C en un volumen de 20µl conteniendo la enzima de restricción y el correspondiente tampón; como control de tamaño molecular se digirieron 0,5µg de DNA del bacteriófago lambda. El tampón utilizado fué "One-Phor-All" PLUS (Pharmacia), concentrado 10 veces y compuesto por Tris-acetato 100mM (pH 7,5), acetato magnésico 100mM y acetato potásico 500mM. La digestión se realizó en exceso de enzima de restricción, utilizándose 40 unidades de enzima para digerir 4µg de DNA; las dos enzimas de restricción utilizadas reconocen secuencias de 6 nucleótidos *HindIII* (A/AGCTT) y *EcoRI* (G/AATTC).

Antes de realizar la electroforesis, al DNA digerido se le añadió un marcador (5µl) compuesto por EDTA 1mM, ficol (20%), sacarosa (40%) y azul de bromofenol (0,25%).

### 3.3.9.2. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

El DNA digerido enzimáticamente se sometió a electroforesis en geles de agarosa (Seakem, FMC) al 0,4% y de un tamaño 20 x 25 x 0,9 cm. La electroforesis se realizó en una cubeta horizontal a un voltaje constante de 50 voltios durante 18 horas. El tampón de electroforesis utilizado fue Tris-acetato pH 8,0, compuesto por Tris-acetato 0,04 M y EDTA 1mM.

Después de la electroforesis, los fragmentos de DNA se teñieron durante 1 hr con una solución de 1µg/ml de bromuro de etidio en tampón Tris-acetato. Después de teñido, el gel se lavó durante varias horas en agua destilada para eliminar el exceso de bromuro de etidio. Posteriormente, el gel fue visualizado con luz UV de onda corta (302 nm) y fotografiado con película Polaroid 665 ("Positive/Negative Instant Pack film") o Polaroid 667 ("Coaterless Instant Pack film").

### 3.3.10. DIGESTION DEL GEN DE LA PBP 2B Y 2X

Un método adecuado para examinar la diversidad genética de un loci particular es el análisis de los fragmentos obtenidos al digerir mediante enzimas de restricción un gen obtenido a partir de DNA amplificado. El principio es similar al de DNA cromosómico, pero implica la amplificación de una secuencia corta del DNA, en este caso los genes que codifican para la PBP 2B y PBP 2X. Los fragmentos amplificados son digeridos con enzimas de restricción que cortan frecuentemente, marcados en los extremos, fraccionados en un gel de poliacrilamida y sometidos a autorradiografía (Zhang et al., 1990).

### 3.3.10.1. AMPLIFICACION GENICA MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método que permite la amplificación de un fragmento de DNA superior a un millón de copias. Es un método sencillo basado en ciclos sucesivos y automáticos de tres reacciones: desnaturalización de DNA, anillamiento de DNA y extensión de una secuencia inicial ("primer" o iniciador). La eficacia de la amplificación se ha aumentado con la utilización de la enzima termoestable *Taq* polimerasa (Chien et al., 1976) capaz de tolerar las etapas de desnaturalización térmica de la PCR sin una pérdida de actividad. La especificidad de la amplificación con PCR está basada en dos oligonucleótidos iniciales que flanquean el fragmento de DNA a amplificar e hibridan con las cadenas opuestas; para las amplificaciones de DNA se necesitan estos oligonucleótidos sintéticos iniciales por lo que su utilización está limitada a elementos genéticos perfectamente conocidos (White et al., 1989).

La amplificación se realizó utilizando un procedimiento similar al descrito por Zhang et al. (1990):

- Un fragmento de 1,5 Kb que codifica para el dominio transpeptidasa de la PBP 2B (EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Database accession X13136-X13137) (Dowson et al., 1989a) se amplificó a partir de DNA cromosómico (sección 3.3.6.1) mediante PCR utilizando los oligonucleótidos iniciadores: Pn2Bup (dGATCCTCTAAATGATTCTCAGGTGG, nucleótidos 812-836) y Pn2Bdown (dCAATTAGCTTAGCAATAGGTGTTGG, nucleótidos 2316-2292)

- El gen de la PBP 2X (EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Database accession X16367) (Laible et al., 1989) se amplificó a partir de DNA cromosómico como un fragmento de 2,0 Kb utilizando los siguientes oligonucleótidos sintéticos: Pn2Xup (dCGTGGGACTATTTATGACCGAAATGG, nucleótidos 478-503) y Pn2Xdown (dAATTCCAGCACTGATGGAAATAACATATTA, nucleótidos 2533-2503)

La mezcla de reacción para PCR (100µl) contenía: 1µg de DNA cromosómico, 1µM de cada uno de los dos oligonucleótidos iniciadores, KCl 50mM, tampón Tris-ClH 10mM pH 8,4, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, 200µM de los deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 200µg de gelatina. La mezcla se calentó a 90°C durante 5 min y se enfrió durante 30 min a 52°C. Después, se le añadieron 2 unidades de la enzima *Taq* polimerasa (Cetus). La amplificación se realizó durante 20 ciclos; cada ciclo consistió en 6 min de extensión a 70°C, 1 min de desnaturalización a 95°C y 2 min de anillamiento a 50°C. La etapa final de extensión a 70°C se prolongó durante 5 min adicionales. Las muestras se enfriaron a 4°C durante 10 min.

Las muestras se aplicaron a un gel de agarosa al 0,6% y los fragmentos amplificados, correspondientes a la PBP 2B o a la PBP 2X, se extrajeron del gel, se purificaron con Gene-Clean (Bio 101, La Jolla) y se resuspendieron en tampón TE Tris-ClH 10mM, EDTA 1mM (pH 7,4) en una concentración de 10ng/µl.

### 3.3.10.2. DIGESTION Y MARCAJE DE LOS FRAGMENTOS

Un total de 1µl del fragmento del gen purificado (10 ng aproximadamente) fué digerido durante 1 hora a 37°C con dos unidades del enzima de restricción; el fragmento del gen de la PBP 2B fué digerido con *StyI* o *HinfI*, mientras que el fragmento

del gen de la PBP 2X lo fué con *HinfI* o bien se realizó una digestión doble con *MseI* y *DdeI*. Las secuencias que reconocen estas enzimas son: *StyI* [C/C(A o T)(A o T)GG], *HinfI* [G/ANTC], *DdeI* [C/TNAG] y *MseI* [T/TAA]. El volumen final de digestión fué de 10 $\mu$ l conteniendo además: tampón Tris-ClH 50mM pH 7,5, ClNa 100mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM y ditiotreitól 1mM. Posteriormente, se le añadieron 5 $\mu$ l de una mezcla de marcaje y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente; la mezcla de marcaje contenía:

- Para DNA digerido con *StyI* Tris-ClH 10mM pH 7,4, MgCl<sub>2</sub> 10mM, ditiotreitól 6mM, dATP 0,1mM, dTTP 0,1mM, dGTP 0,1mM, 0,6 mCi de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP por  $\mu$ l y 0,1 unidades/ $\mu$ l del fragmento Klenow.
- Para DNA digerido con *HinfI* o con *DdeI* + *MseI*, la mezcla de marcaje fué la misma excepto que como nucleótido marcado se utilizó [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dTTP, por lo que el dTTP no marcado fué sustituido por dCTP 0,1mM.

### 3.3.10.3. ELECTROFORESIS

A la mezcla de marcaje (7 $\mu$ l) se le añadieron 2 $\mu$ l de tampón de electroforesis; 5 $\mu$ l de la mezcla resultante se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% con un tamaño de 31 x 39cm y en condiciones no desnaturalizantes. Como marcador se utilizó DNA del plásmido pBR322 digerido con *HpaII* y marcado en los extremos con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP.

La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 600 voltios hasta que el marcador de azul de bromofenol se situó a 10 cm del extremo inferior del gel. El gel fué fijado, transferido a papel de filtro Whatmann n° 1 y secado al vacío. Se realizó una autorradiografía de 4 a 24 horas en una película de rayos X (Fuji RX).

## **RESULTADOS**

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. ESTUDIO DE LA LISIS Y PERDIDA DE VIABILIDAD INDUCIDA POR PENICILINA**

El tratamiento con penicilina origina daños irreversibles en las bacterias como lisis, degradación de la pared celular y una rápida pérdida de viabilidad. Se estudió el efecto de la penicilina en la lisis y supervivencia de 93 aislados clínicos que presentaban un amplio rango de valores de CMI frente a penicilina y procedentes de España, 34 aislados, Hungría, 35 aislados y Suráfrica, 24 aislados (países con una alta incidencia de neumococos resistentes a penicilina). Para ello cultivos creciendo exponencialmente en medio líquido fueron tratados con penicilina en una concentración 10 veces superior al valor de su CMI, determinándose el efecto del antibiótico en la densidad óptica y en el título de organismos viables del cultivo.

#### **4.1.1. LISIS DE LOS CULTIVOS MEDIANTE TRATAMIENTO CON PENICILINA**

Para el estudio de la lisis mediante el tratamiento con penicilina se utilizaron como control las cepas de laboratorio sensibles a penicilina R6, con una autolisina activa, y R6RUP25, con el gen de la autolisina no funcional.

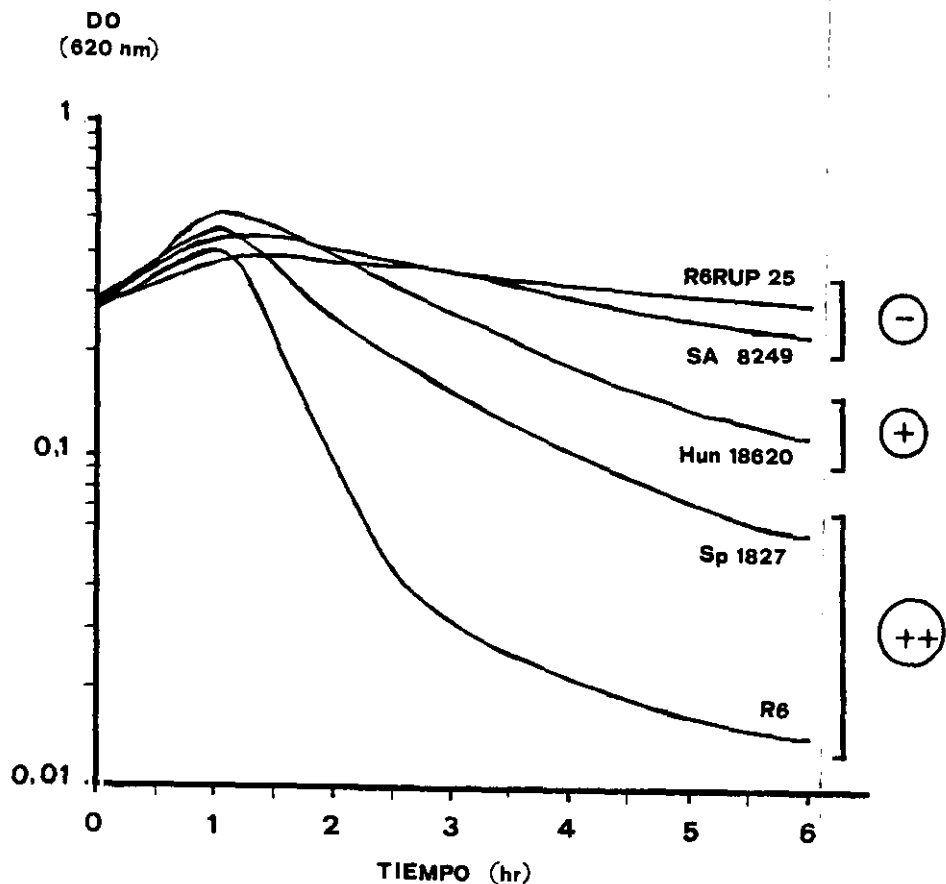
La Figura 5 muestra el efecto de la penicilina en la densidad óptica de los cultivos de las cepas control y de algunos aislados clínicos analizados. La cepa control R6 que posee una autolisina activa resulta lisada muy rápidamente,

como se deduce por el rápido descenso observado en la turbidez del cultivo después del tratamiento con penicilina. En contraste, la cepa de laboratorio carente de una autolisina funcional, R6RUP25, deja de crecer en respuesta al tratamiento con penicilina, pero sólo muestra un descenso mínimo en la densidad óptica del cultivo. Los 93 aislados clínicos analizados mostraron unos valores de turbidez intermedios a los encontrados en las cepas control.

El grado de autólisis se midió utilizando la constante  $k_{360}$ , la Tabla IV recoge estos valores para los aislados analizados. Se establecieron tres categorías de lisis en función de los valores  $k_{360}$  obtenidos:

1. Lisis negativa (-) que se corresponde a un valor  $k_{360}$  menor de 1 y equivalente a la lisis obtenida en la cepa control R6RUP25 deficiente en autolisina (R6RUP25  $k_{360}$  0,3)
2. Lisis muy positiva (++), correspondiente a valores  $k_{360}$  superiores a 3, e incluyendo a aislados que presentan una respuesta lítica similar, o ligeramente inferior, a la mostrada por la cepa R6 con un sistema autolítico funcional ( R6  $k_{360}$  7,5)
3. Lisis positiva (+) que comprende valores  $k_{360}$  mayores de 1 e inferiores a 3; en esta categoría se agrupan los aislados que presentan un patrón de lisis intermedio.

Los resultados obtenidos al analizar la lisis en la muestra de 93 aislados clínicos están reflejados en la Tabla VII. Se puede observar que los aislados se distribuyeron de forma homogénea en las tres categorías, ya que aproximadamente un 30% de los aislados aparece incluido en cada una de las tres



**Figura 5**

Curvas de lisis producidas por penicilina.

Cultivos (10 ml) en fase de crecimiento exponencial ( $10^8$  UFC/ml) se sometieron a penicilina en una concentración final de  $10 \times$  CMI. La penicilina se añadió a tiempo 0, la densidad óptica de los cultivos se siguió durante 6 horas. Están representados cultivos incluidos en las tres categorías de lisis, siendo sus respectivos valores  $k_{360}$ : R6RUP25 ( $k_{360}$  0,32), SA 8249 ( $k_{360}$  0,63), Hun 18620 ( $k_{360}$  1,40), Sp 1827 ( $k_{360}$  3,49) y R6 ( $k_{360}$  7,57).

Tabla VII

Lísis producida por penicilina (10 x CMI)

Penicilina CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número aislados	Patrón de lisis		
		(-) <1	(+) 1-3	(++) >3 <sup>a</sup>
<0,1	24	6	7	11
0,1 - 1	27	6	9	12
>1	42	23	12	7
		(38%)	(30%)	(32%)

<sup>a</sup> valores  $k_{360} \times 10^3$ , donde

$$k_{360} = \text{Ln}(A_0/A_{360}) \times \text{min}^{-1}$$

categorías. Cuando se consideran los aislados en función del valor de su CMI se obtiene que el 25% (6/24) de los aislados sensibles y el 55% (23/42) de los resistentes a penicilina (CMI > 1µg/ml) presentan un patrón de lisis negativa (-) similar al de la cepa control R6RUP25 deficiente en autolisina. Por otra parte, un 54% (13/24) de los aislados sensibles y un 83% (35/42) de los aislados resistentes analizados presentan un patrón de lisis disminuída (lisis negativa o positiva) con respecto a la cepa control R6.

#### **4.1.2. SUPERVIVENCIA DE LOS CULTIVOS DESPUES DE TRATAMIENTO CON PENICILINA**

Para estudiar el efecto de la penicilina en la viabilidad de los cultivos fué necesario analizar la supervivencia de estos después del tratamiento con el antibiótico. La Tabla IV recoge los valores obtenidos en el descenso del número de organismos viables en la muestra de 93 aislados clínicos. Como control se utilizó la cepa de laboratorio R6, en la cual la penicilina provoca un descenso de 5 órdenes de magnitud en el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias. La Figura 6 muestra la supervivencia después del tratamiento con penicilina de algunos aislados representativos de la muestra estudiada.

Se establecieron dos categorías en función del descenso de viabilidad producido por penicilina:

1. Descenso igual o superior a 5 órdenes de magnitud en el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias (UFC), y equivalente al producido en la cepa control R6.

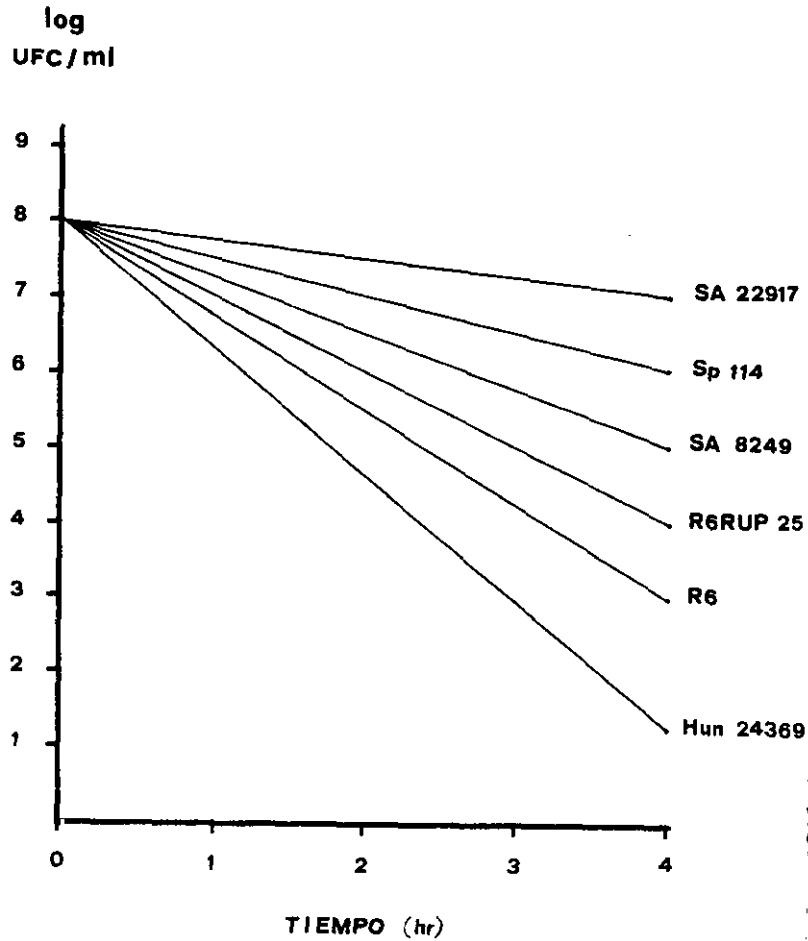
2. Descenso inferior a 5 órdenes de magnitud en el logaritmo de UFC después de 4 horas de tratamiento con penicilina.

La Tabla VIII refleja la supervivencia de los 93 aislados analizados, medida como el descenso producido en el número de UFC después de 4 hr de tratamiento con penicilina. Se puede observar que la mayoría de los aislados (71%) muestran una supervivencia superior que la cepa control. Al considerar los aislados en función de su valor de CMI se comprueba que en un 46% (11/24) de los aislados sensibles y en un 88% (37/42) de los resistentes (CMI > 1µg/ml) la penicilina no afecta a la viabilidad del cultivo de forma similar a la de la cepa control R6, produciéndose un descenso menor en el número de organismos viables.

Los resultados obtenidos indican que existe una asociación entre tolerancia (aumento de la supervivencia del cultivo) y resistencia al antibiotico, ya que una gran mayoría de los aislados resistentes (88%) muestran una mayor supervivencia; sin embargo, este fenómeno presenta también una gran incidencia entre los aislados sensibles (46%). La elevada supervivencia encontrada en los aislados analizados en respuesta al tratamiento con penicilina puede tener una gran importancia en el fenómeno de resistencia a los tratamientos clínicos.

#### 4.1.3. RELACION "LISIS-SUPERVIVENCIA" EN CULTIVOS DE *S. pneumoniae*

Al comparar conjuntamente los valores  $k_{360}$  con la pérdida de UFC durante el tratamiento con penicilina para cada aislado en particular (consultar Tabla IV), se observa que la mayoría de los aislados (79,3%) que presentan un patrón de lisis



**Figura 6**

Curvas de supervivencia después del tratamiento con penicilina. Cultivos (10 ml) en fase de crecimiento exponencial ( $10^8$  UFC/ml) se sometieron a penicilina en una concentración final de 10 x CMI. La penicilina se añadió a tiempo 0, la supervivencia de los cultivos se valoró después de 4 horas de tratamiento.

Tabla VIII

Supervivencia frente a penicilina (10 x CMI)

Penicilina CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Número aislados	Supervivencia: (pérdida $\log_{10}$ ) <sup>a</sup>	
		<4	>5
<0,1	24	11	13
0,1 - 1	27	18	9
>1	42	37	5
		(71%)	(29%)

<sup>a</sup> pérdida del  $\log_{10}$  de unidades formadoras de colonias (UFC) después de 4 horas de tratamiento

incluido en las categorías positiva (+) o muy positiva (++) y con un valor  $k_{360}$  menor de 4, muestran una disminución en el logaritmo de UFC equivalente o superior a 4 órdenes de magnitud. Sin embargo, 12 de los aislados (20,6%) aunque presentan un patrón de lisis positiva o muy positiva, sólo experimentan una disminución de la viabilidad similar o inferior a 3 órdenes de magnitud en el logaritmo de UFC; es de señalar que 8 de estos aislados proceden de Hungría.

De manera semejante, un 68,6% de los aislados que presentan un patrón de lisis negativo (-) se correlacionan con un descenso en la viabilidad del cultivo igual o menor a tres órdenes de magnitud en el logaritmo de UFC; un 22,8% de los aislados con lisis negativa presentan una disminución en la viabilidad de 4 órdenes. Los aislados Sp 2559, Sp 3072 y SA 44165 aunque presentan un patrón de lisis negativo muestran un elevado descenso en la viabilidad del cultivo (de 5 a 6 órdenes de magnitud).

De estos resultados se puede deducir que en la mayoría de los aislados existe una relación proporcional entre el grado de lisis y la pérdida de viabilidad del cultivo; aunque se han encontrado aislados en los que estos dos fenómenos no aparecen asociados.

#### **4.2. ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE BAJO NIVEL A PENICILINA ("BORDERLINE") EN AISLADOS CLINICOS DE *S. pneumoniae* EN ESPAÑA**

Durante los últimos años se ha observado en España un aumento gradual en el nivel de resistencia a penicilina de los neumococos (Fenoll *et al.*, 1991); habiéndose producido un cambio pequeño pero significativo en el valor de CMI de los neumococos sensibles, pasando de 0,006 a 0,06 $\mu$ g/ml; este cambio afecta a un gran número de aislados clínicos, de forma que actualmente resulta difícil encontrar neumococos completamente sensibles (CMI 0,006 $\mu$ g/ml) debido a que la mayoría presenta una resistencia de bajo nivel o "borderline" (CMI 0,015-0,06 $\mu$ g/ml).

##### **4.2.1. DISTRIBUCION DE SEROGRUPOS EN NEUMOCOCOS CON DISTINTO NIVEL DE RESISTENCIA A PENICILINA**

Los neumococos resistentes a penicilina pertenecen a unos pocos serogrupos que no corresponden con los serogrupos que provocan infección con mayor frecuencia. No existen datos sobre la distribución de serogrupos en los aislados que presentan un bajo nivel de resistencia a penicilina (CMI 0,015-0,06 $\mu$ g/ml) debido fundamentalmente a que estas cepas no originan problemas en el tratamiento de las infecciones; sin embargo, analizar los serogrupos de estos aislados presenta un considerable interés por si ello aporta datos para el estudio de la distribución particular observada entre los neumococos resistentes (CMI > 0,1 $\mu$ g/ml).

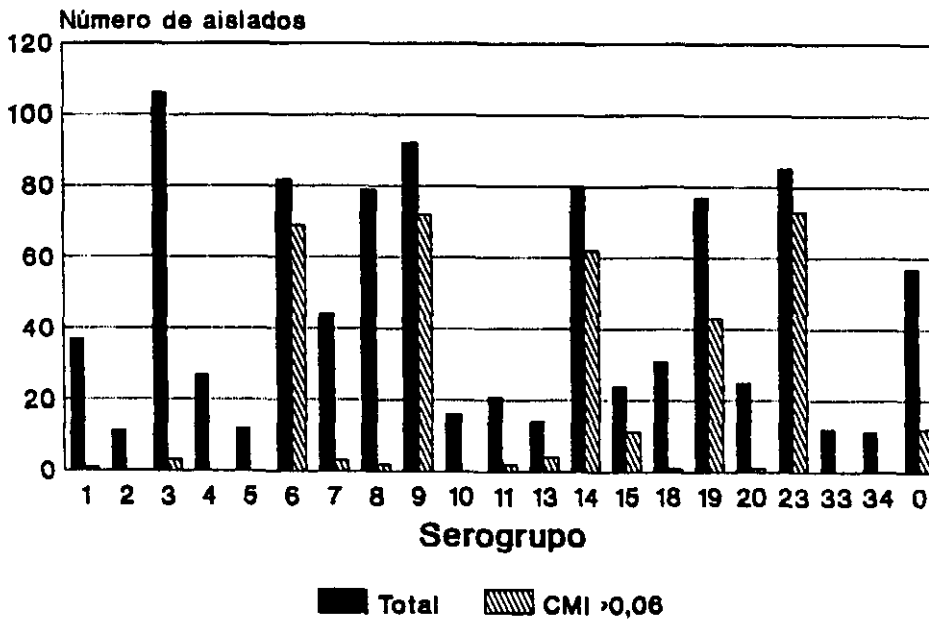
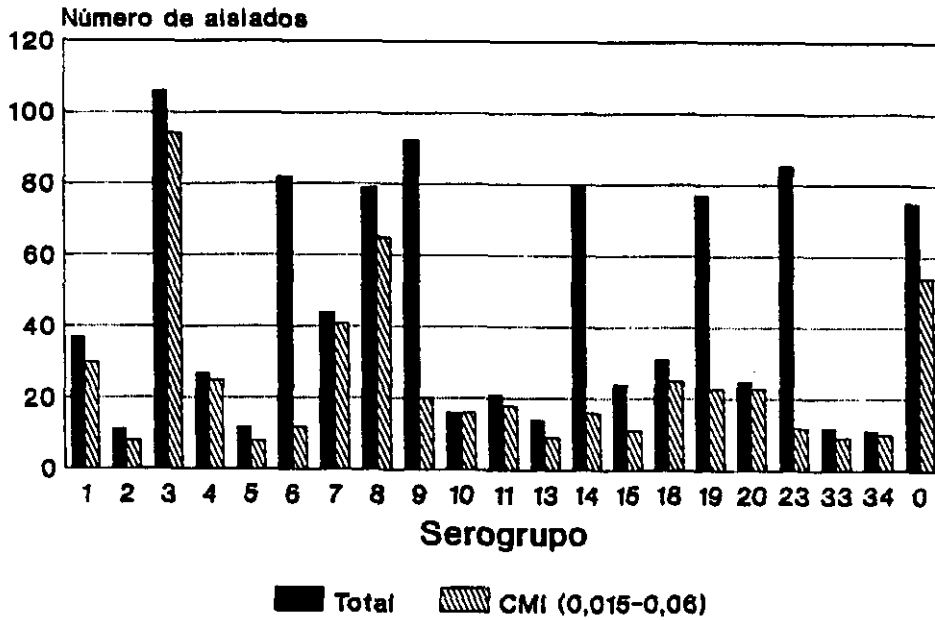
El Laboratorio de Neumococos del C.N.M.V.I.S. ejerce desde hace más de doce años una vigilancia de los niveles de resistencia a penicilina en los aislados clínicos de *S.*

*pneumoniae* detectados en España. A partir de una muestra de 961 neumococos recibidos en este laboratorio durante el periodo de tres años 1.988-1.990 y aislados a partir de sangre y líquido cefalorraquídeo, se analizó la distribución de serogrupos en función del valor de CMI a penicilina. El diagrama representado en la parte superior de la Figura 7 muestra la distribución de serogrupos entre neumococos que presentan un bajo nivel de resistencia (CMI 0,015-0,06) y la distribución total de neumococos durante ese periodo. Se puede observar que las dos distribuciones se superponen considerablemente. En la parte inferior de la Figura 7 se representa de forma similar la distribución de serogrupos entre neumococos resistentes a penicilina (CMI > 0,06µg/ml), en este caso se observa una notable pérdida de coincidencia entre las dos distribuciones ya que sólo un reducido número de serogrupos incluye la mayoría de los aislados resistentes.

El análisis de estas distribuciones indica que por encima de un nivel umbral de resistencia, próximo a 0,1µg/ml, se produce un cambio brusco en la distribución de serogrupos de los neumococos, de manera que sólo unos determinados serogrupos son capaces de alcanzar niveles superiores de resistencia (CMI > 0,06µg/ml).

#### **4.2.2. ESTUDIO DE LAS BASES GENÉTICAS DE LA RESISTENCIA DE BAJO NIVEL A PENICILINA**

Es importante comprobar si los aislados que presentan un bajo nivel de resistencia a penicilina ("borderline") poseen determinantes genéticos y bioquímicos de resistencia, debido a que en la actualidad los métodos microbiológicos utilizados en



**Figura 7**

Distribución de los serogrupos de 961 neumococos aislados en España durante el periodo 1988-1990 en función del valor CMI a penicilina: en la parte superior de la figura CMI 0,015-0.06µg/ml (resistencia de bajo nivel "borderline") y en la parte inferior CMI>0,06 (resistentes)

los laboratorios clínicos clasifican a estos aislados como sensibles.

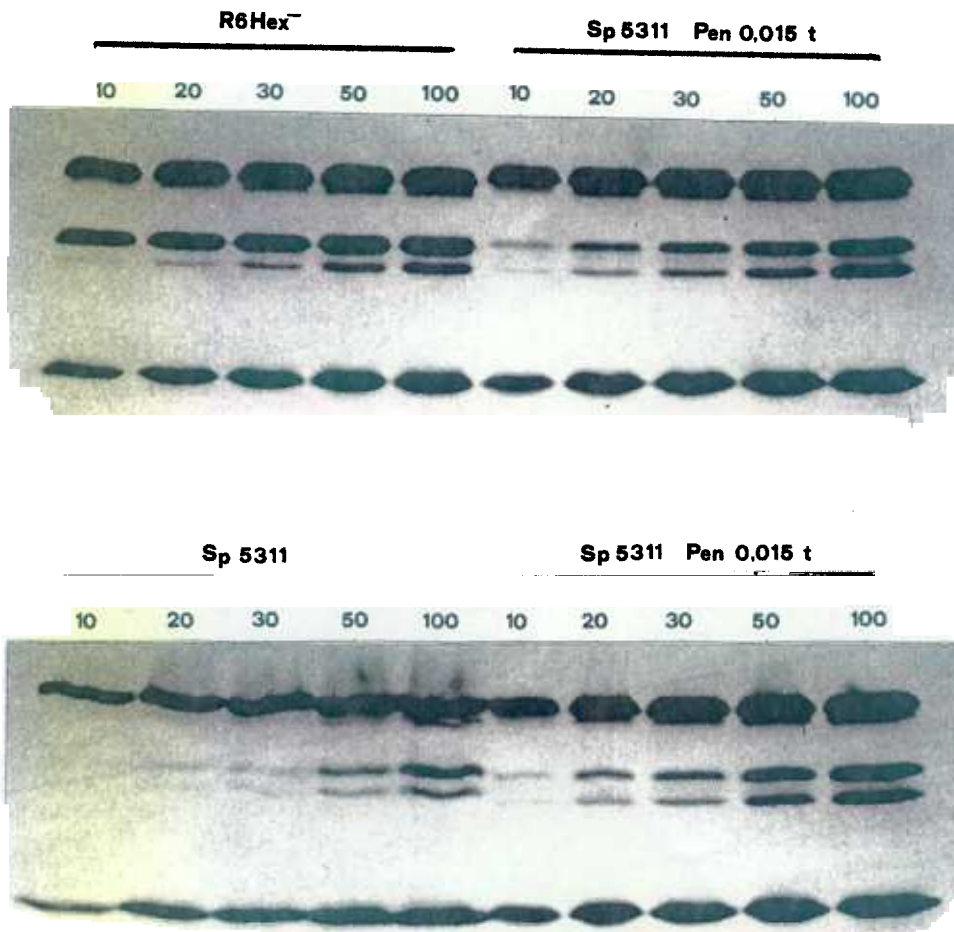
Para ello se seleccionaron tres aislados clínicos que presentaban un bajo nivel de resistencia ( $0,03-0,06\mu\text{g/ml}$ ) y que estaban incluidos en serogrupos que provocan infección muy frecuentemente pero que raras veces se han descrito como serogrupos que presentan neumococos resistentes a penicilina. Los aislados seleccionados fueron Sp 2057 (serogrupo 1, CMI  $0,06\mu\text{g/ml}$ ), Sp 5311 (serogrupo 3, CMI  $0,06\mu\text{g/ml}$ ) y Sp 7017 (serogrupo 8, CMI  $0,03\mu\text{g/ml}$ ).

A partir del DNA cromosómico de estos aislados se realizaron experimentos de transformación utilizando la cepa sensible a penicilina R6Hex<sup>-</sup> como receptora de DNA. Mediante un único ciclo de transformación y con una frecuencia variable ( $10^{-4}-10^{-6}$ ) se aislaron transformantes a partir de placas conteniendo  $0,015\mu\text{g/ml}$  de penicilina (transformantes "Pen 0,015t"); la frecuencia de transformación para los transformantes del siguiente nivel Pen 0,03t fué menor de  $10^{-8}$ .

Mediante un ensayo fluorográfico se determinó la afinidad hacia penicilina de las PBPs de la cepa sensible R6Hex<sup>-</sup>, del aislado Sp 5311 y del transformante Pen 0,015t (CMI  $<0,015\mu\text{g/ml}$ ) obtenido por la transformación de células competentes de R6Hex<sup>-</sup> con DNA de Sp 5311. La Figura 8 muestra los resultados obtenidos en el ensayo de afinidad; es necesario señalar que la elevada cantidad de polisacárido capsular presente en el aislado Sp 5311, serogrupo 3 mucoso, interfiere en la resolución obtenida en el gel de SDS-PAGE. Se puede observar que al utilizar una concentración de 100ng de penicilina radiactiva no aparecen diferencias en el patrón de PBPs de la cepa R6Hex<sup>-</sup> y del transformante; sin embargo, al utilizar una

concentración menor de antibiótico marcado se observa en el transformante una aparente disminución en la afinidad hacia penicilina de la PBP 2A en relación con la cepa receptora original.

De este experimento se puede concluir que el bajo nivel de resistencia a penicilina puede ser transmitido mediante transformación genética de un neumococo a otro e implica una alteración en la PBP 2A, uno de los sitios de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.



**Figura 8**

Afinidad hacia penicilina de las PBPs de un aislado con bajo nivel de resistencia ( $0,06 \mu\text{g/ml}$ ) y del transformante Pen  $0,015\text{t}$ .

El transformante Pen  $0,015\text{t}$  fué construido a partir de la cepa R6Hex<sup>-</sup> (CMI  $0,006 \mu\text{g/ml}$ ) utilizando DNA del aislado Sp 5311 (serogrupo 3, CMI  $0,06 \mu\text{g/ml}$ ). Pen  $0,015\text{t}$  se aisló de una placa conteniendo  $0,015 \mu\text{g/ml}$  de penicilina. Los cultivos de R6Hex<sup>-</sup>, Sp 5311 y Pen  $0,015\text{t}$  se expusieron a concentraciones de penicilina tritiada variando de 10 a 100 ng por ml.

#### **4.3. ESTUDIO DE LOS PATRONES DE PBPs EN AISLADOS CLINICOS DE *S. pneumoniae***

El único mecanismo de resistencia a penicilina descrito en neumococos es la alteración de las PBPs. Por ello, se estudió el patrón de PBPs de 255 aislados clínicos procedentes de diversas localidades geográficas, representando un amplio rango de serogrupos y valores de CMI. Cada aislado de neumococo se creció hasta una fase logarítmica y fué expuesto a una dosis saturante y fija de penicilina marcada radiactivamente ( $1\mu\text{g}$  de [ $^3\text{H}$ ]-bencilpenicilina/ml durante 10 min); los patrones de PBPs se determinaron mediante técnicas fluorográficas. La Figura 4 (página 30) es una fluorografía que muestra el patrón y peso molecular de las PBPs de la cepa de laboratorio sensible R6 y del aislado SA 8249 (MIC  $6\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

##### **4.3.1. UNICO PATRON DE PBPs EN AISLADOS SENSIBLES**

Mediante la técnica fluorográfica se examinaron 82 aislados de neumococos sensibles a penicilina, observándose que los aislados analizados poseen un elevado grado de similitud en sus patrones de PBPs. La parte superior de la Figura 9 muestra el patrón de PBPs de algunos aislados sensibles (aislados 1 a 8); se pueden identificar las PBPs 1A, 1B, 2A, 2B y 3, las condiciones en las que se realizó la electroforesis no permiten diferenciar la PBP 2X de la PBP 2A. Las únicas variaciones encontradas en el patrón de PBPs de los aislados sensibles fueron la existencia de una PBP 1A de un tamaño ligeramente inferior al de la PBP 1A de R6 y la aparición en el aislado Hun 18619 (aislado 4 en la Figura 9) de una PBP 3 de tamaño molecular ligeramente inferior al de la cepa R6.

Del análisis de estos patrones se puede concluir que los neumococos sensibles a penicilina muestran un único y definido patrón de PBPs idéntico al de la cepa de laboratorio R6.

#### **4.3.2. MÚLTIPLES PATRONES DE PBPs EN AISLADOS RESISTENTES**

La uniformidad encontrada en el patrón de PBPs en los aislados de neumococos sensibles a penicilina indicaba la necesidad de ampliar este análisis a los neumococos resistentes.

Al estudiar el patrón de PBPs en 173 aislados resistentes a penicilina se encontraron casi un centenar de patrones diferentes, difíciles de estandarizar ya que implican la variabilidad -en mayor o menor grado- de 4 proteínas, apareciendo aislados que presentaban patrones muy diversos y con todas las variaciones posibles, dependiendo del valor de CMI, origen geográfico, etc.

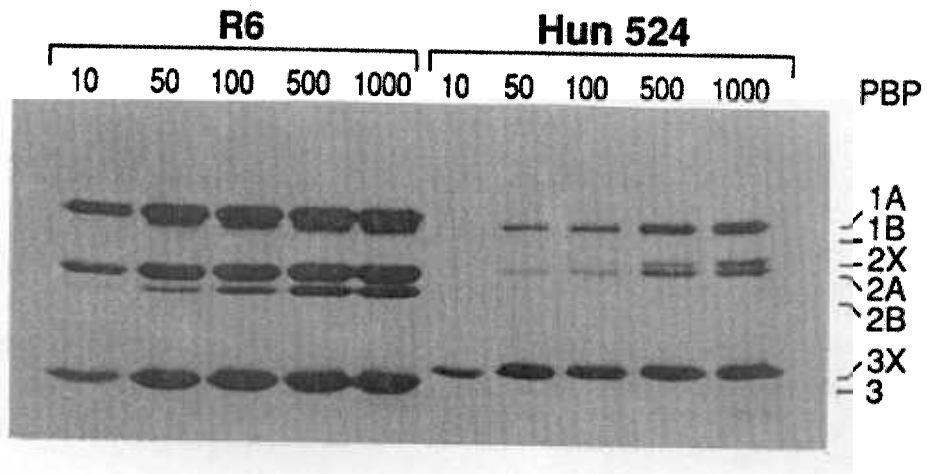
La Figura 9 (aislados 9 a 16) representa una muestra de aislados que poseen resistencia intermedia a penicilina (CMI 0,1-1 $\mu$ g/ml) en los que se observa la variabilidad existente en el patrón de PBPs; esta variabilidad implica la desaparición de PBPs (generalmente, PBPs 1A y 2B) y la aparición de PBPs con distinto peso molecular. Sin embargo, como características generales en los aislados resistentes a penicilina se pueden señalar la aparición de nuevos patrones de PBPs y una disminución muy acusada en la capacidad para unir penicilina radiactiva de las PBPs. La Figura 10 muestra el patrón y afinidad de las PBPs de un aislado resistente Hun 524 (CMI 2 $\mu$ g/ml) al ser comparados con los de la cepa sensible R6. Se puede observar una menor intensidad en la banda del fluorograma



**Figura 9**

Patrón de PBPs de una muestra de aislados procedentes de Hungría con diferente nivel de resistencia a penicilina.

Los cultivos fueron expuestos a dos concentraciones diferentes de penicilina radiactiva (1.000 y 20 ng/ml). La cepa sensible R6 está indicada como S; los aislados húngaros analizados fueron (1) Hun 18624, (2) Hun 18622, (3) Hun 18621, (4) Hun 18619, (5) Hun 21959, (6) Hun 21960, (7) Hun 415, (8) Hun 21966, (9) Hun 560, (10) Hun 24369, (11) Hun 164, (12) Hun 2888, (13) Hun 23995, (14) Hun 2842, (15) Hun 4530, (16) Hun 701, (17) Hun 24058, (18) Hun 2863, (19) Hun 14315, (20) Hun 524, (21) Hun 963, (22) Hun 663, (23) Hun 859 y (24) Hun 146.



**Figura 10**

Patrón de PBPs de un aislado resistente mostrando afinidad disminuida hacia penicilina.

Se comparó la afinidad hacia penicilina de las PBPs del aislado Hun 524 (CMI  $2\mu\text{g/ml}$ ) con respecto a las de la cepa sensible R6 (CMI  $0,006\mu\text{g/ml}$ ) mediante el marcaje con diferentes concentraciones de penicilina marcada radiactivamente (variando de 10 a 1000 ng/ml).

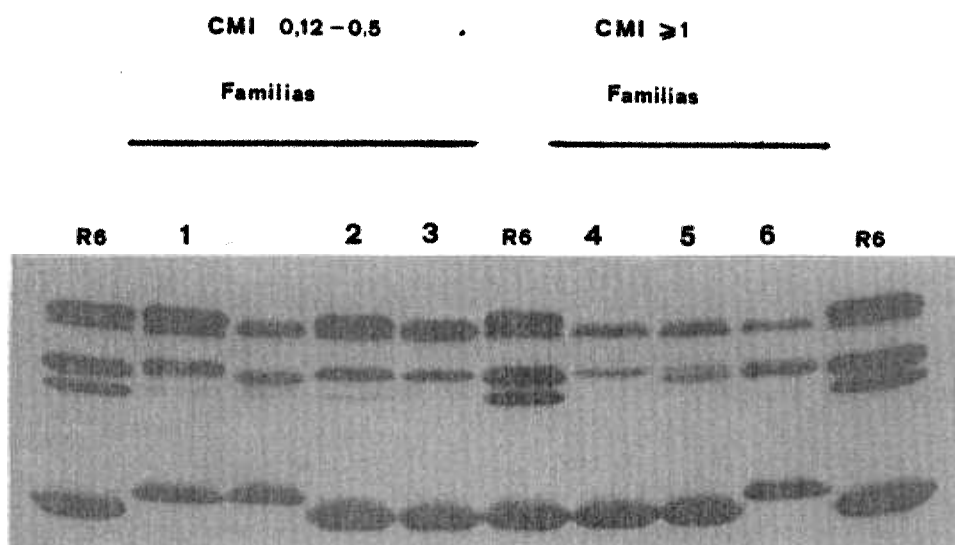
correspondiente a la PBP 2A, una acentuación en la presencia de la PBP 2X y una desaparición de las PBPs 1A y 2B; la afinidad de la PBP 3 no resulta alterada pero sí su tamaño molecular originando una nueva PBP 3, designada en la Figura 10 como PBP 3X.

El estudio realizado indica que existe una gran variabilidad en los patrones de PBPs encontrados en neumococos resistentes, en contraste con el patrón único que aparece en los aislados sensibles

#### **4.3.3. "FAMILIAS" DE PATRONES DE PBPs EN AISLADOS RESISTENTES**

A pesar de la diversidad de patrones de PBPs encontrados en la muestra de neumococos resistentes, se pueden identificar seis grupos mayoritarios de aislados que comparten patrones de PBPs ("familias" de patrones de PBPs); cada grupo o familia presenta un número variable de miembros (de 4 a 21) y en total, estos seis patrones incluyen a 66 aislados que representan el 38% de los neumococos estudiados. El resto de los aislados presentan patrones de PBPs únicos, no encontrándose otros aislados en la muestra analizada con el mismo patrón de PBPs.

Entre las seis familias de patrones de PBPs identificadas, las Familias 1 a 3 representan a aislados con un nivel intermedio de resistencia a penicilina (CMI 0,12-0,5µg/ml), mientras que las Familias 4 a 6 corresponden a aislados resistentes. La Figura 11 muestra el patrón de PBPs de un aislado representativo de cada una de las familias identificadas.



**Figura 11**

Familias de patrones de PBPs encontradas entre neumococos resistentes.

Los aislados representados son: Familia 1 (SA 17506), Familia 2 (A 2537), Familia 3 (SA 22915), Familia 4 (Sp 625), Familia 5 (Sp 622) y Familia 6 (Hun 663). El aislado Hun 23995 situado en la figura entre las Familias 1 y 2 no está incluido en ninguna de las familias, pero se ha colocado contiguo al aislado de la Familia 1 ya que ambos poseen idéntico serogrupo (19) y valor de CMI ( $0,25\mu\text{g/ml}$ ).

A continuación se relacionan los aislados incluidos en las seis familias descritas, señalándose además otras características comunes (la Tabla IX muestra de forma resumida estas características):

- Familia 1. Aislados procedentes de Suráfrica, serogrupo 19 y CMI 0,25µg/ml. Aislados en diferentes lugares de Suráfrica, durante los años 1.983 a 1.986. No presentan resistencia a otros antibióticos. El patrón de PBPs encontrado se caracteriza por la presencia de una PBP 2B con una afinidad muy reducida hacia penicilina, la presencia muy marcada de la PBP 2X y la posesión de una PBP 3X con una movilidad electroforética menor que la habitual. En esta familia se incluyen los aislados SA 17506, SA 22713, SA 27222, SA 30445, SA 61159, SA 61193 y SA 62332.

- Familia 2. Aislados procedentes de Alaska, serogrupo 6 y CMI 0,25-0,5µg/ml. Corresponden a neumococos aislados durante el periodo 1.982-1.990. El patrón de PBPs presentado por esta familia está caracterizado por la desaparición de las PBPs 2A y 2B. Compuesta por los aislados A 2513, A 2516, A 2527, A 2528, A 2537, A 2539, A 2543, A 2551, A 2554, A 2558, A 2562, A 2564 y A 2567.

- Familia 3. Aislados procedentes de Suráfrica, serogrupo 6 y CMI 0,12-0,25µg/ml. Aislados en diferentes lugares de Suráfrica, durante los años 1.983 a 1.986. Sólo presentan resistencia a penicilina. El patrón de PBPs se caracteriza por la desaparición en los fluorogramas de las PBPs 1A y 2B. Esta familia está compuesta por los aislados SA 22914, SA 22915, SA 22917 y SA 61192.

- Familia 4. Aislados procedentes de España, serogrupo 6 y CMI 1-2 $\mu$ g/ml. Corresponden a neumococos aislados durante los años 1.987-1.989 en diferentes hospitales, que además poseen resistencia a tetraciclina y cloranfenicol. El patrón de PBPs que presenta esta familia está caracterizado por la desaparición de las PBPs 1A, 2A y 2B. Los aislados incluidos en esta familia son Sp 114, Sp 625, Sp 656, Sp 873, Sp 961, Sp 970, Sp 1238, Sp 1249, Sp 1625, Sp 2067, Sp 2812, Sp 3875, Sp 4800, Sp 4864, Sp 5219, Sp 5224, Sp 8792, Sp 9890, Sp 10788, Sp 11125 y Sp 11128.

- Familia 5. Aislados procedentes de España, serogrupo 23 y CMI 1-2 $\mu$ g/ml. Neumococos aislados en diferentes lugares de España durante el periodo 1.987-1.989 que además son resistentes a tetraciclina y cloranfenicol. Los miembros de esta familia poseen un patrón de PBPs caracterizado por la desaparición de la PBP 2B y la aparición de una PBP 1A de menor tamaño molecular. En esta familia están incluidos los aislados Sp 257, Sp 496, Sp 499, Sp 622, Sp 949, Sp 962, Sp 1432, Sp 2066, Sp 2657, Sp 2990, Sp 3070, Sp 3409, Sp 4364, Sp 9300 y Sp 10199.

- Familia 6. Aislados procedentes de Hungría, serogrupo 19 y CMI 2-8 $\mu$ g/ml. Aislados durante los años 1.988 y 1.989. El patrón de PBPs característico de esta familia está determinado por la desaparición de las PBPs 1A y 2B y la presencia de una PBP 3X con un tamaño molecular mayor que el normal. Esta familia está compuesta por los siguientes aislados: Hun 146, Hun 524, Hun 663, Hun 859, Hun 2863 y Hun 14315.

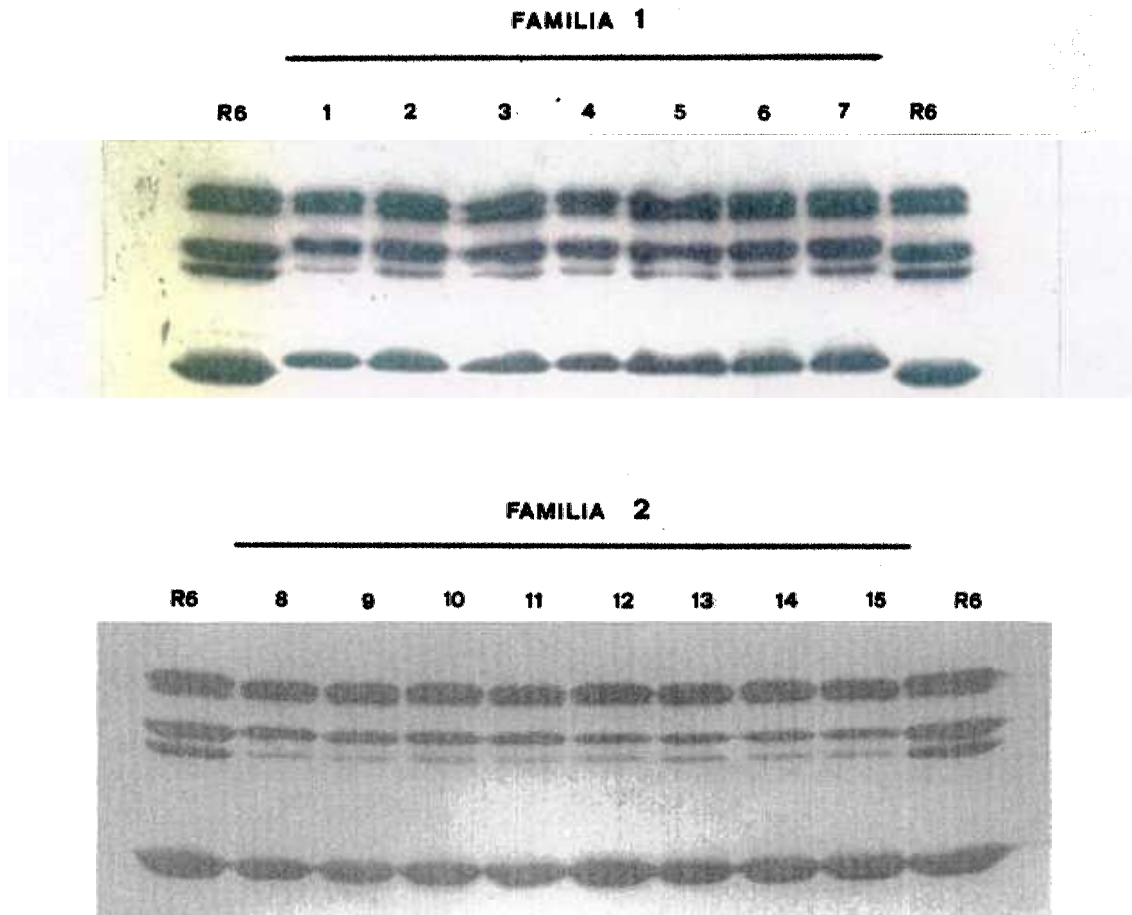
La Figura 12 muestra el patrón de PBPs de algunos de los aislados incluidos en las Familias 1 y 2, familias cuyos miembros presentan resistencia intermedia a penicilina. De forma similar, la Figura 13 refleja el patrón de PBPs de

**Tabla IX**

Características epidemiológicas de los aislados pertenecientes a la misma familia de patrón de PBPs

<b>Familia</b>	<b>Lugar</b>	<b>CMI</b>	<b>SG</b>	<b>Periodo</b>	<b>Resist</b>	<b>Número</b>
1	Suráfrica	0,25	19	1983-86	P	7
2	Alaska	0,25-0,5	6	1982-90	-	13
3	Suráfrica	0,12-0,25	6	1983-86	P	4
4	España	1-2	6	1987-89	PTC	21
5	España	1-2	23	1987-89	PTC	15
6	Hungria	>1	19	1988-89	-	6

**CMI** ( $\mu\text{g/ml}$ ), **SG** serogrupo, **Resist** resistencia a antibióticos, **P** penicilina, **T** tetraciclina, **C** cloranfenicol, **Número** número de aislados incluidos en cada familia



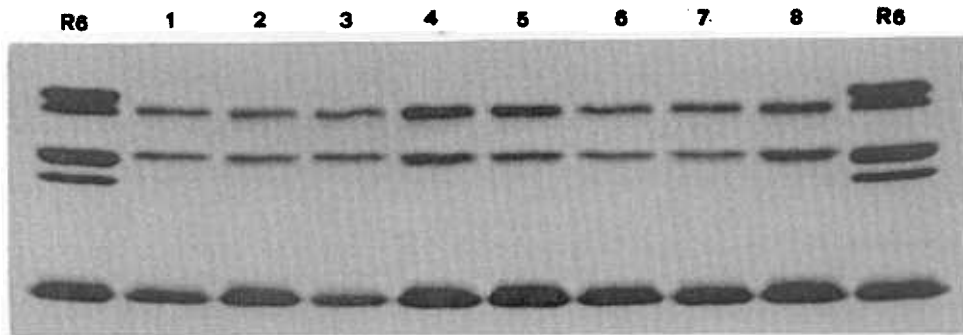
**Figura 12**

Patrones de PBPs de aislados incluidos en las Familias 1 y 2 (CMI 0,25-0,5 $\mu$ g/ml).

Los aislados representados pertenecientes a la Familia 1 son (1) SA 61193, (2) SA 61159, (3) SA 62332, (4) SA 27222, (5) SA 17506, (6) SA 22713 y (7) SA 30445. Los aislados incluidos en la Familia 2 están representados como (8) A 2516, (9) A 2537, (10) A 2543, (11) A 2564, (12) A 2539, (13) A 2551, (14) A 2554 y (15) A 2558. Las PBPs de todos los aislados se marcaron utilizando 1 $\mu$ g/ml de penicilina tritiada.

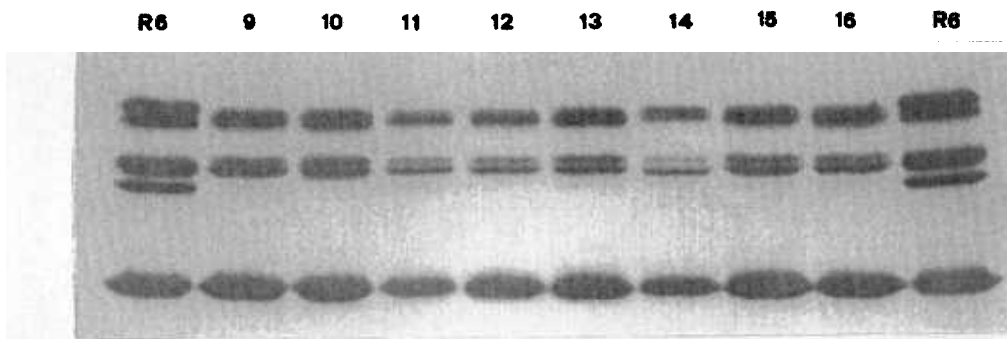
**FAMILIA 4**

---



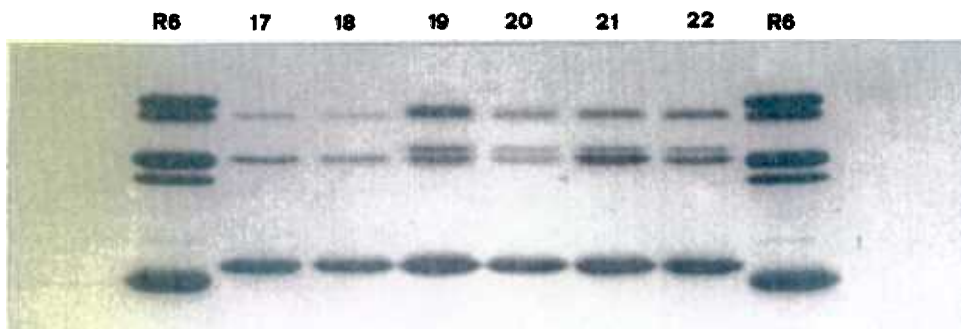
**FAMILIA 5**

---



**FAMILIA 6**

---



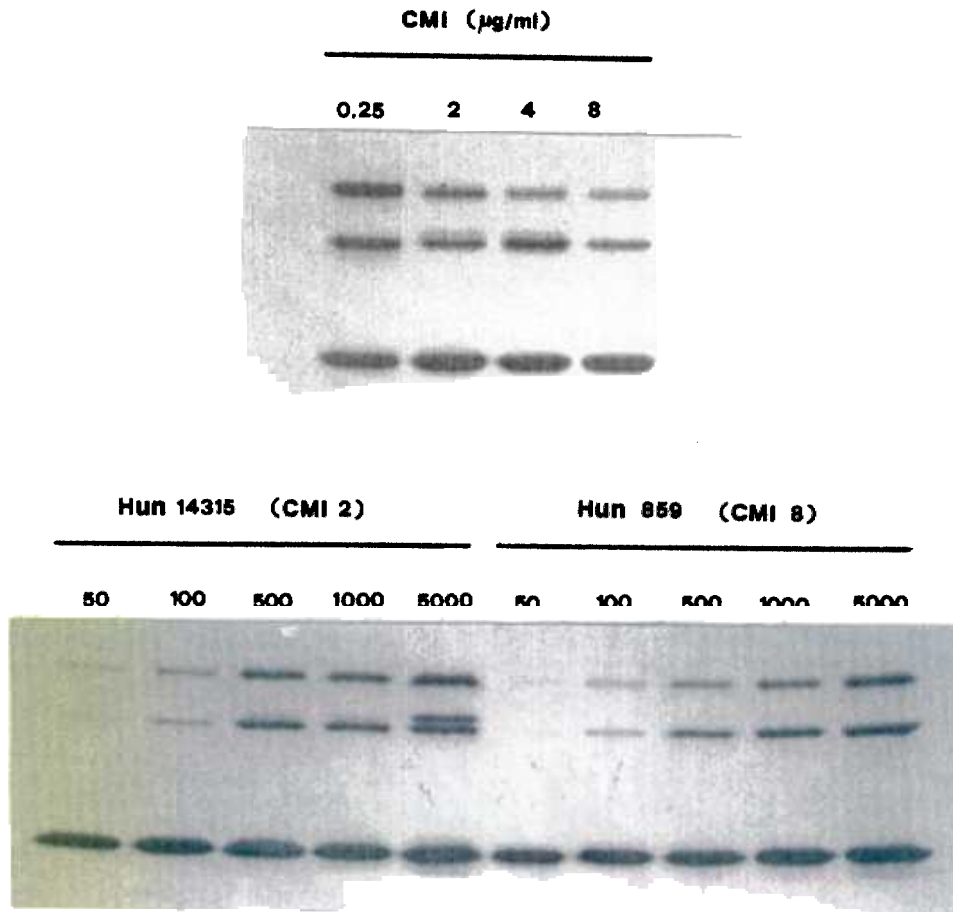
**Figura 13**

Patrones de PBPs de aislados incluidos en las Familias 4, 5 y 6 (CMI > 1 µg/ml)

Los aislados pertenecientes a la Familia 4 son (1) Sp 625, (2) Sp 656, (3) Sp 1249, (4) Sp 114, (5) Sp 873, (6) Sp 970, (7) Sp 1238 y (8) Sp 1625. De la Familia 5 están representados los aislados (9) Sp 257, (10) Sp 496, (11) Sp 499, (12) Sp 949, (13) Sp 962, (14) Sp 10199, (15) Sp 1432 y (16) Sp 2066. Los aislados (17) Hun 146, (18) Hun 859, (19) Hun 2863, (20) Hun 524, (21) Hun 663 y (22) Hun 14315 se encuentran incluidos en la Familia 6 de patrón de PBPs. Las PBPs han sido marcadas utilizando 1 µg/ml de penicilina tritiada.

algunos de los miembros de las Familias 4, 5 y 6 que presentan niveles de resistencia igual o superior a  $1\mu\text{g/ml}$ .

En la Figura 13 se observa que el grupo de aislados procedentes de Hungría, Familia 6, aparentemente no presentan todos el mismo patrón en sus PBPs; sin embargo, es necesario considerar que en esta familia se están comparando aislados que no poseen valores equivalentes en su CMI. Una característica común a todos los miembros de la Familia 6 es la existencia de una PBP 3 atípica (PBP 3X) de un tamaño molecular mayor que el habitual y que constituye un elemento clave para la identificación de los miembros de esta familia. Al analizar el patrón de PBPs en la muestra de 36 aislados clínicos procedentes de Hungría y considerando la PBP 3X como un marcador, se encontraron 11 aislados que presentaban esta PBP 3 atípica y que estaban incluidos en un amplio rango de valores de CMI (desde 0,25 hasta  $8\mu\text{g/ml}$ ). La Figura 14 muestra el patrón de PBPs obtenido al analizar algunos de los aislados representativos de distintos niveles de CMI, observándose que las características fundamentales del patrón de PBPs de la Familia 6 (no detección de la PBP 1A y 2B y presencia de la PBP 3X) se mantienen entre los aislados con estos valores de CMI. La Figura 14 también refleja los resultados obtenidos al realizar un ensayo de afinidad de las PBPs hacia penicilina en dos aislados de esta familia que presentan valores distintos de CMI, Hun 14315 ( $2\mu\text{g/ml}$ ) y Hun 859 ( $8\mu\text{g/ml}$ ); se puede observar que los patrones que parecían distintos al utilizar una concentración de  $1\mu\text{g/ml}$  de penicilina tritiada aparecen idénticos al realizar el marcaje con 500 ng/ml. Por ello, se puede considerar que el patrón de PBPs es el mismo, sin embargo presenta una disminución en la afinidad de las PBPs hacia penicilina según aumenta el valor de CMI. Los análisis realizados parecen indicar que los aislados húngaros que poseen



**Figura 14**

Confirmación de la existencia de la Familia 6 de patrón de PBPs.

En la parte superior de la figura se representa el patrón de PBPs de aislados procedentes de Hungría, serogrupo 19 poseyendo distintos valores de CMI: Hun 23995 ( $0,25\mu\text{g/ml}$ ), Hun 14315 ( $2\mu\text{g/ml}$ ), Hun 663 ( $4\mu\text{g/ml}$ ) y Hun 859 ( $8\mu\text{g/ml}$ ). En la parte inferior se representa un ensayo de afinidad de las PBPs hacia distintas concentraciones de penicilina tritiada en dos aislados incluidos en la Familia 6, Hun 14315 (CMI  $2\mu\text{g/ml}$ ) y Hun 859 (CMI  $8\mu\text{g/ml}$ ). La concentración de penicilina marcada utilizada aparece indicada en la parte superior del gel (ng/ml).

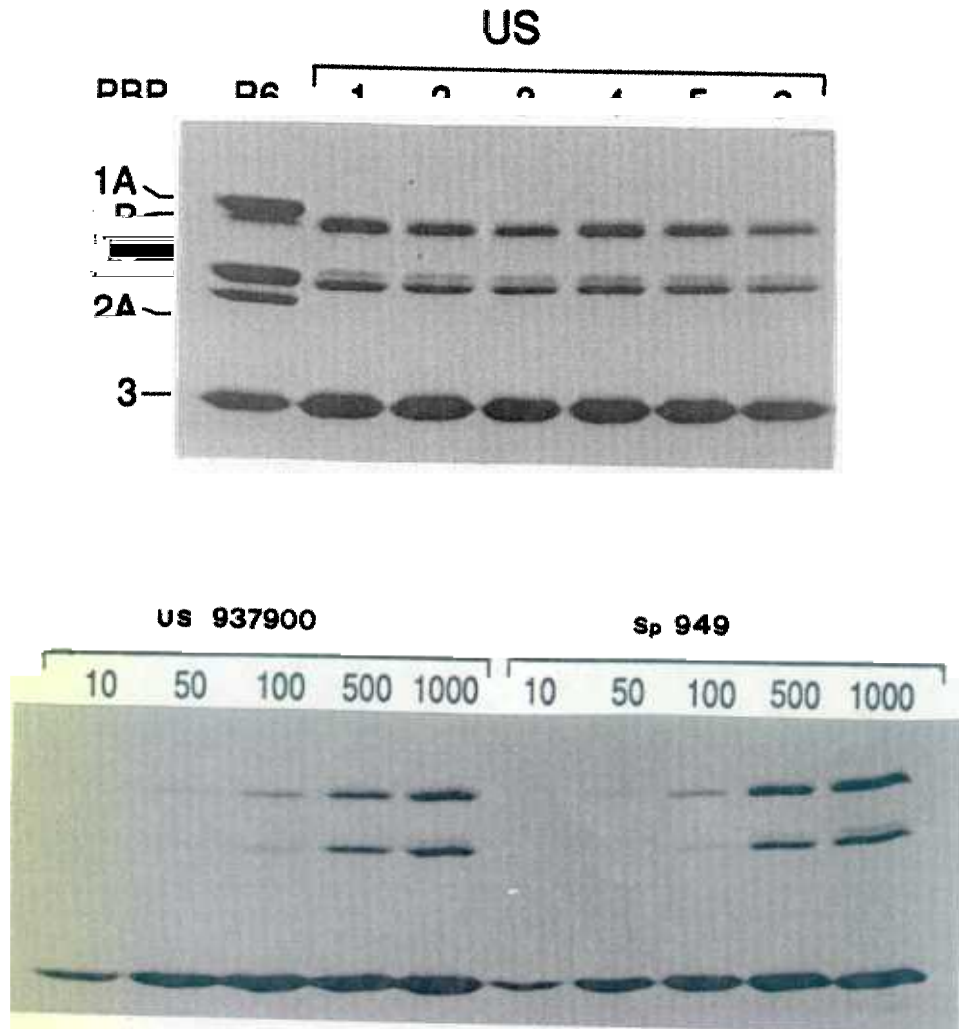
una PBP 3 atípica constituyen una misma familia de patrón de PBPs descrita como Familia 6.

En 1.989 Allphin et al. describieron en Ohio (EE.UU.) neumococos resistentes a penicilina que presentaban las mismas características que los aislados incluidos en la Familia 5 procedentes de España. Al realizar el examen electroforético del patrón de PBPs de estos aislados se confirmó su pertenencia a la Familia 5 de patrón de PBPs debido a que estos aislados mostraron un patrón en sus PBPs idéntico al que presentaban los aislados de la Familia 5. La Figura 15 refleja el patrón de PBPs de 6 aislados de Ohio y el descenso en la afinidad de las PBPs de un representante de la Familia 5 (Sp 949) y de un aislado de Ohio (US 937900); en ambos aislados se puede observar que la variación en la afinidad de las PBPs es idéntica, produciéndose la desaparición de la PBP 2B, un descenso en la afinidad de la PBP 2A y 1A (que además aumenta su movilidad electroforética), y se hace aparente la presencia de la PBP 2X. No se detecta ninguna alteración en la afinidad de la PBP 3 hacia penicilina.

Los ejemplos descritos confirman la existencia de Familias de Patrones de PBPs entre neumococos resistentes a penicilina.

#### **4.3.4. REPRODUCIBILIDAD Y ESTABILIDAD DEL PATRON DE PBPs**

Los resultados obtenidos al examinar el patrón de PBPs en la muestra de 255 aislados parecían indicar que el patrón de PBPs era un caracter específico estable en neumococos; para comprobarlo fué necesario observar la estabilidad y reproducibilidad del patrón de PBPs cuando se sometían los aislados a diferentes tratamientos.



**Figura 15**

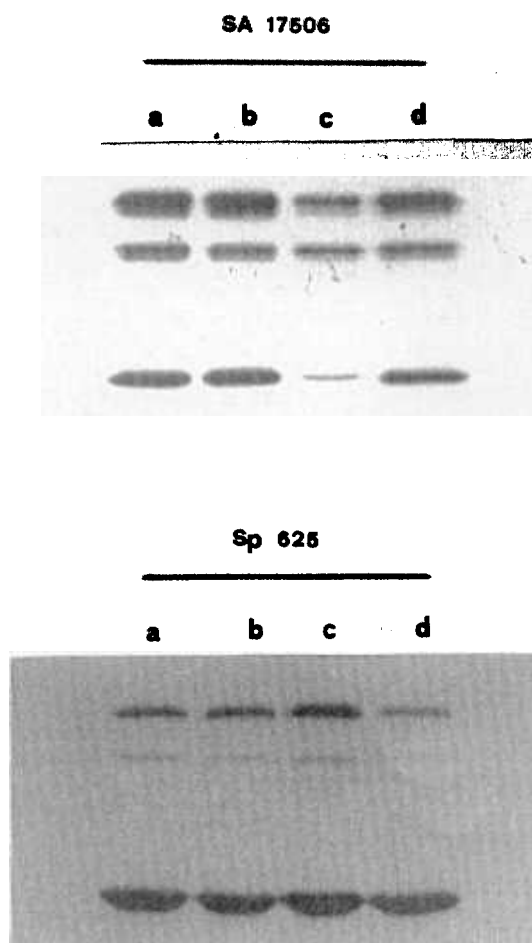
Identidad en el patrón de PBPs (Familia 5) de aislados procedentes de España y Estados Unidos.

En la parte superior de la figura se representa el patrón de PBPs de los aislados serogrupo 23 procedentes de Estados Unidos: (1) US 937900, (2) US 1071562, (3) US 1969, (4) US 1683, (5) US 1961 y (6) US 1977. En la parte inferior se representa un ensayo de afinidad de las PBPs hacia penicilina radiactiva (ng/ml) en un aislado procedente de Estados Unidos (US 937900) y un aislado procedente de España e incluido en la Familia 5 (Sp 949).

#### 4.3.4.1. ESTABILIDAD DURANTE PASES SUCESIVOS *IN VIVO*, *IN VITRO* Y EN PRESENCIA DE ANTIBIOTICO

Para comprobar la estabilidad y reproducibilidad del patrón de PBPs se seleccionaron aislados representativos de cada una de las familias descritas que fueron sometidos a diferentes tratamientos: cinco ciclos consecutivos de inoculación intraperitoneal en ratones, crecimiento durante 150-200 generaciones en un medio semisintético y 10 ciclos de crecimiento en un medio conteniendo altas concentraciones de penicilina (5 x CMI) para facilitar la selección de mutantes tolerantes. Después de someter los cultivos a estos tratamientos se realizó un ensayo de PBPs para observar si su patrón había sido alterado.

Los aislados seleccionados fueron SA 17506 (Familia 1), A 2537 (Familia 2), SA 22915 (Familia 3), Sp 625 (Familia 4), Sp 622 (Familia 5) y Hun 663 (Familia 6). La Figura 16 muestra el patrón de PBPs obtenido después de someter los aislados a los diferentes tratamientos; se puede observar que, aparentemente, las PBPs no han sido modificadas manteniendo constante su movilidad electroforética y afinidad hacia el antibiótico marcado. En el fluorograma correspondiente al aislado SA 17506 después de haber sido sometido a varios ciclos de tratamiento con penicilina se observa una menor afinidad de las PBPs hacia penicilina, debido a una menor concentración en las proteínas totales de la muestra observada al examinar el correspondiente gel teñido con azul de Coomassie.



**Figura 16**

Estabilidad y reproducibilidad del patrón de PBPs. Se muestra el patrón de PBPs obtenido en los aislados SA 17506 (Familia 1) y Sp 625 (Familia 4) después de haber sido sometidos a diferentes tratamientos: (a) representa el cultivo original, (b) después del crecimiento durante 150-200 generaciones en medio líquido semisintético, (c) después del crecimiento durante 10 ciclos en medio conteniendo penicilina en una concentración final de 5 x CMI y (d) después de la inoculación intraperitoneal en ratones durante 5 ciclos.

#### 4.3.4.2. ESTABILIDAD DURANTE TRANSFORMACION GENETICA

Después de haber comprobado la estabilidad del patrón de PBPs durante tratamientos que no implicaban la transferencia de información genética, era necesario comprobarlo al someter los aislados a transformación. Para ello se realizaron experimentos utilizando como donantes de DNA aislados representativos de algunas de las familias de PBPs descritas; se seleccionaron los aislados SA 17506 (Familia 1), Sp 625 (Familia 4), Sp 622 (Familia 5), Hun 663 (Familia 6) y Hun 963. El aislado Hun 963 no estaba incluido en ninguna de las familias descritas, sin embargo compartía muchas características epidemiológicas idénticas al aislado Hun 663 representante de la Familia 6, ya que ambos aislados eran procedentes de Hungría, con serogrupo capsular 19 y un valor CMI de 4µg/ml.

Con objeto de determinar la cepa más adecuada para ser utilizada como receptora de DNA en las transformaciones se realizó un experimento con las cepas R6, R6Hex<sup>-</sup> y R6RUP25. Se observó que la utilización de la cepa R6Hex<sup>-</sup> aumentaba notablemente (10-10<sup>2</sup> veces) el número de transformantes obtenidos en relación con la cepa R6; sin embargo, se obtuvieron frecuencias similares de transformación al utilizar las cepas R6Hex<sup>-</sup> y R6RUP25. La Tabla X muestra los resultados obtenidos en este experimento. En base a estos datos, las transformaciones posteriores se realizaron utilizando la cepa R6Hex<sup>-</sup> como receptora de DNA ya que mostraba una alta eficiencia en la integración de marcadores durante la transformación genética. Estos resultados parecen indicar que la mutación "hex" en el sistema reparador de errores aumenta la eficacia de la transformación, en cambio no parece alterarse por la presencia de una autolisina activa o inactiva.

**Tabla X**

Frecuencias de transformación al utilizar distintas cepas receptoras de DNA

Frecuencia de transformación:	R6 (Hex <sup>+</sup> Lyt <sup>+</sup> )	R6Hex <sup>-</sup> (Hex <sup>-</sup> Lyt <sup>+</sup> )	R6RUP25 (Hex <sup>-</sup> Lyt <sup>-</sup> )
<b>Strep<sup>r</sup></b>	7 x 10 <sup>-4</sup>	2 x 10 <sup>-3</sup>	1 x 10 <sup>-3</sup>
<b>Pen<sup>r</sup> (Pen 0,01t)</b>	8 x 10 <sup>-7</sup>	>10 <sup>-5</sup>	>10 <sup>-5</sup>

Caracter transformado: resistencia a estreptomycin (Strep<sup>r</sup>) o resistencia a penicilina (Pen<sup>r</sup>)

El experimento fué diseñado para observar el patrón de PBPs que mostraban los transformantes obtenidos a partir de diferentes DNAs y con un nivel de resistencia (valor CMI) similar al del aislado donante de DNA; para alcanzar este nivel de resistencia se necesitaron dos ciclos de transformación sucesivos, de forma que en el segundo ciclo se utilizaron como cepas receptoras de DNA los transformantes obtenidos en el primer ciclo. Las frecuencias de transformación obtenidas en ambos ciclos están reflejadas en la Tabla XI. Al realizar el primer ciclo de transformación se obtuvieron en todos los cruces transformantes capaces de crecer en placas conteniendo  $0,05\mu\text{g}$  de penicilina por ml ("Pen 0,05t"). Se purificaron colonias representativas de este nivel y utilizaron como receptoras de DNA para el segundo experimento de transformación. Los tranformantes obtenidos en el segundo ciclo de transformación a partir de placas conteniendo  $1\mu\text{g/ml}$  de penicilina fueron designados "Pen 1t". En los experimentos control (sólo células competentes, sin DNA exógeno) no se obtuvo ninguna colonia resistente. Como indicador de la frecuencia de transformación se utilizó un DNA que codificaba para resistencia a estreptomycin, obteniéndose una frecuencia de  $10^{-4}$  en el primer ciclo de transformación y  $10^{-3}$  en el segundo.

Al observar la Tabla XI se puede deducir que la adquisición de resistencia a  $\beta$ -lactámicos se consiguió de una forma gradual, necesiándose dos ciclos de transformación para alcanzar el nivel de resistencia del aislado donante de DNA. En el primer ciclo de transformación se obtuvo en todos los casos un incremento 50 veces superior al valor de CMI de la cepa receptora, en el segundo ciclo el incremento alcanzado fué 20 veces superior. En el caso del aislado SA 17506 (CMI  $0,25\mu\text{g/ml}$ )

Tabla XI

Frecuencias obtenidas en los experimentos de transformación

**FRECUENCIAS DE TRANSFORMACION  
EN EL PRIMER CICLO**

DNA DONANTE	Nivel de resistencia ( $\mu\text{g/ml}$ ):			
	0,0125	0,025	0,05	0,1
SA 17506	$>10^{-4}$	$3 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$
Sp 625	$>10^{-5}$	$6 \times 10^{-5}$	$3 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-8}$
Sp 622	$>10^{-5}$	$4 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$
Hun 663	$>10^{-5}$	$2 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$
Hun 963	$7 \times 10^{-5}$	$7 \times 10^{-6}$	$2 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$

**FRECUENCIAS DE TRANSFORMACION  
EN EL SEGUNDO CICLO**

DNA DONANTE	Nivel de resistencia ( $\mu\text{g/ml}$ ):				
	0,1	0,4	0,7	1	2
SA 17506	$>10^{-4}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$	$<10^{-8}$
Sp 625	$>10^{-4}$	$>10^{-4}$	$3 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$
Sp 622	$>10^{-4}$	$4 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-6}$	$6 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$
Hun 663	$>10^{-4}$	$6 \times 10^{-5}$	$2 \times 10^{-7}$	$1 \times 10^{-8}$	$<10^{-8}$
Hun 963	$>10^{-4}$	$2 \times 10^{-5}$	$4 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-7}$	$<10^{-8}$

no se obtuvieron transformantes con un valor de CMI superior al del aislado original.

De forma complementaria, en los transformantes obtenidos se analizó el nivel de resistencia a varios antibióticos (Tabla XII); algunos de los antibióticos probados poseen un mecanismo de acción similar al de penicilina (piperacilina y cefotaxima), sin embargo eritromicina, cloranfenicol y tetraciclina actúan mediante diferentes mecanismos de acción. Por ello y según refleja la Tabla XII, en relación con la cepa receptora R6Hex<sup>-</sup>, los transformantes seleccionados por el incremento en su resistencia a penicilina también poseen un aumento en el nivel de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos piperacilina (una penicilina) y cefotaxima (una cefalosporina de tercera generación), aunque no presentan alteración en el valor de CMI para los restantes antibióticos probados.

Posteriormente se realizó una comparación del patrón de PBPs mostrado por la cepa receptora (R6Hex<sup>-</sup>), los aislados donantes de DNA y los respectivos transformantes obtenidos en los niveles Pen 0,05t y Pen 1t. Los fluorogramas realizados indicaron que todos los transformantes obtenidos en el mismo nivel de resistencia mostraban un patrón de PBPs muy similar, por lo tanto independiente del patrón dictado por el DNA donante. De forma similar, al analizar 8-10 colonias transformantes independientes, obtenidas en el mismo experimento de transformación y presentando el mismo nivel de resistencia, se obtuvo en todos los casos un modelo de PBPs muy similar. El patrón de PBPs característico de los Pen 0,05t es un modelo de PBPs en el que han desaparecido las PBPs 2A y 2B; los transformantes Pen 1t muestran la desaparición de las PBPs 1A, 2A y 2B.

Tabla XII

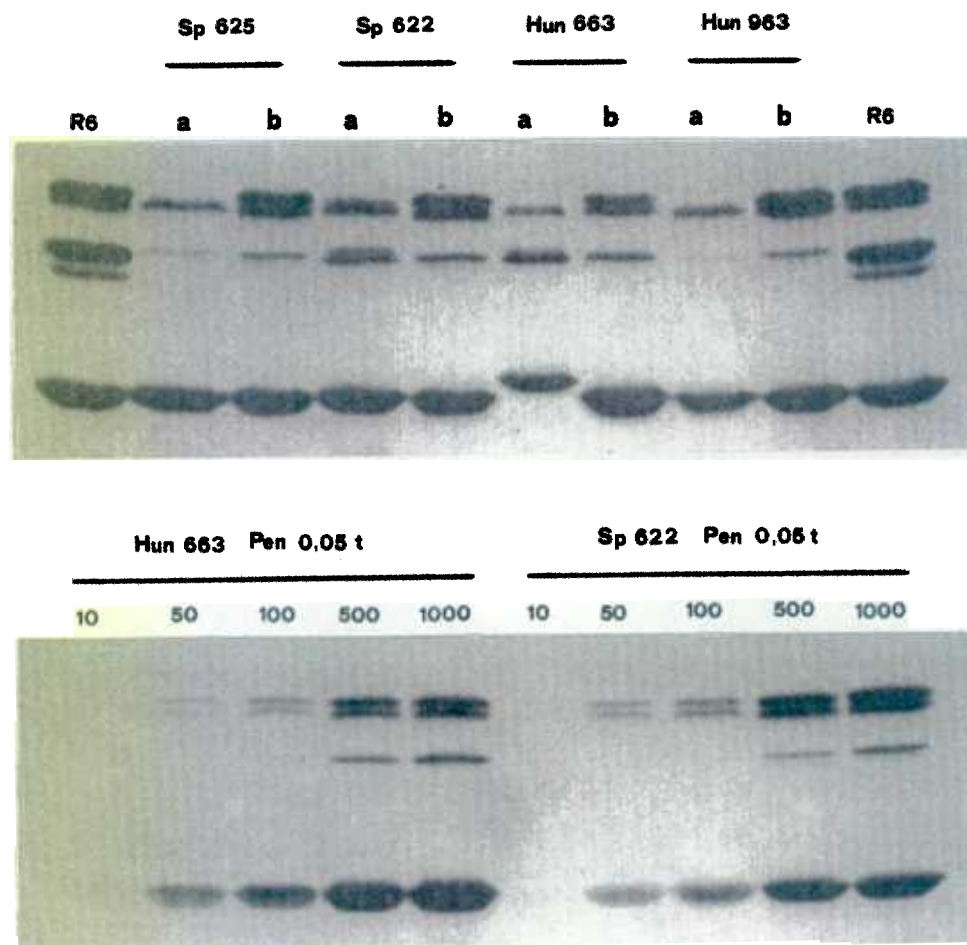
Resistencia hacia distintos antibióticos mostrada por los transformantes (valores de CMI)

Cepa	Pen	Ppr	Cft	Erm	Cam	Tet
R6Hex-	0,007	<0,015	0,015	0,015	4	4
SA 17506	0,25	0,25	0,12	0,015	4	8
Pen 0,05t	0,15	0,25	0,12	0,015	4	4
Sp 625	2	2	0,5	0,015	8	64
Pen 0,05t	0,50	1	0,25	0,015	4	4
Pen 1t	2	2	0,5	0,015	4	4
Sp 622	2	2	1	0,015	16	64
Pen 0,05t	0,10	1	0,25	0,015	4	4
Pen 1t	2	2	1	0,015	4	4
Hun 663	4	4	0,5	0,015	16	64
Pen 0,05t	0,3	2	0,25	0,015	4	4
Pen 1t	2	4	0,5	0,015	4	4
Hun 963	4	4	2	0,015	4	64
Pen 0,05t	0,15	1	0,25	0,015	4	4
Pen 1t	4	4	1	0,015	4	4

Valores de CMI en  $\mu\text{g/ml}$ , **Pen** penicilina, **Ppr** piperacilina, **Cft** cefotaxima, **Erm** eritromicina, **Cam** cloranfenicol, **Tet** tetraciclina

Para confirmar el elevado grado de homología existente entre el patrón de PBPs de los distintos transformantes se realizó un estudio de la afinidad de las PBPs hacia penicilina en los transformantes que presentaban el mismo nivel de resistencia pero que habían sido obtenidos a partir de cruces distintos, es decir, a partir de cruces en los que se utilizaron diferentes aislados como donantes de DNA. De esta forma se obtuvieron resultados más evidentes, pudiéndose observar que no sólo el patrón de PBPs es muy similar, sino que incluso la afinidad hacia penicilina de cada PBP en particular se modificó en el mismo grado para todos los transformantes Pen 0,05t y de forma similar, para todos los transformantes Pen 1t. Las Figuras 17 y 18 muestran el patrón y afinidad hacia penicilina de las PBPs de los transformantes Pen 0,05t (Figura 17) y de los transformantes Pen 1t (Figura 18) obtenidos a partir de aislados incluidos en varias familias de patrones de PBPs.

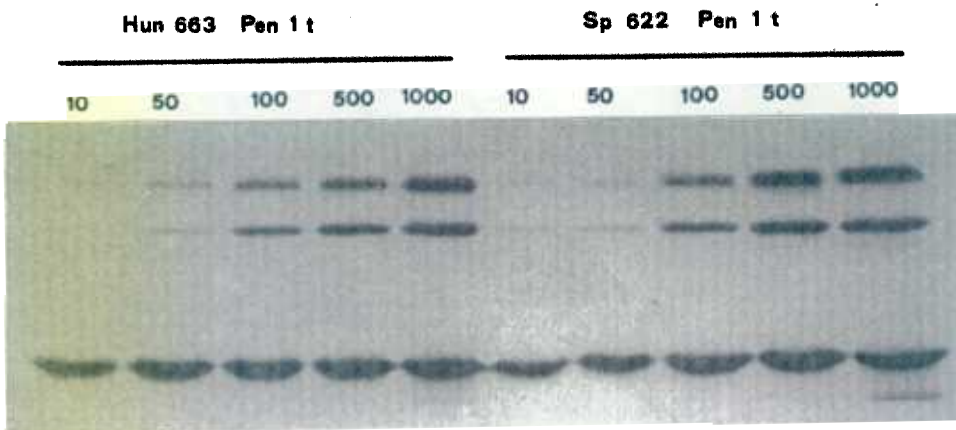
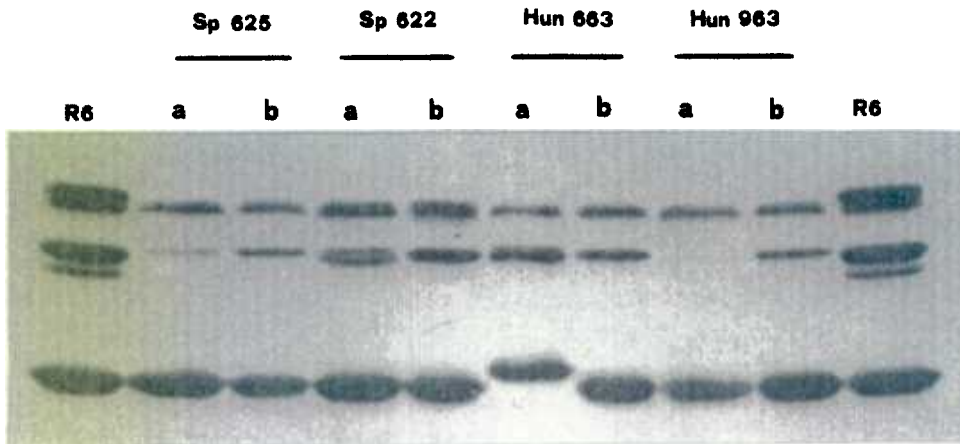
Los resultados obtenidos parecen indicar que el patrón de PBPs está determinado por el fondo genético de la bacteria y es una característica estable para un determinado aislado bacteriano; ello permitiría la utilización del patrón de PBPs con fines epidemiológicos pudiendo representar un marcador adecuado para aislados de neumococos resistentes a penicilina.



**Figura 17**

Patrón y afinidad hacia penicilina de las PBPs de los transformantes Pen 0,05t.

En la parte superior de la figura se representa (a) el patrón de PBPs de los aislados utilizados como donantes de DNA y (b) el de un transformante obtenido en el primer ciclo de transformación (Pen 0,05t) de cada cruce. En la parte inferior se representa la afinidad hacia penicilina (ng/ml) de las PBPs de dos transformantes Pen 0,05t. Los aislados utilizados como donantes de DNA son miembros de las familias de patrones de PBPs: Sp 625 (Familia 4), Sp 622 (Familia 5) y Hun 663 (Familia 6).



**Figura 18**

Patrón y afinidad hacia penicilina de las PBPs de los transformantes Pen 1t. En la parte superior de la figura se representa (a) el patrón de PBPs de los aislados utilizados como donantes de DNA y (b) el de un transformante obtenido en el segundo ciclo de transformación (Pen 1t) en cada cruce. En la parte inferior se representa la afinidad hacia penicilina (ng/ml) de las PBPs de dos transformantes Pen 1t. Los aislados utilizados como donantes de DNA son miembros de las familias de patrones de PBPs: Sp 625 (Familia 4), Sp 622 (Familia 5) y Hun 663 (Familia 6).

#### **4.4. CARACTERIZACION DE LOS AISLADOS QUE COMPARTEN UN PATRON DE PBPs**

Los resultados obtenidos previamente indican que los neumococos resistentes a penicilina agrupados en la misma familia de PBPs comparten además muchas características epidemiológicas y fisiológicas. Por ello, resulta necesario realizar una caracterización más detallada de estos aislados mediante la aplicación de distintas metodologías para el análisis de múltiples rasgos, tanto fenotípicos como genéticos.

##### **4.4.1. SEROTIPADO DE LOS AISLADOS**

Los neumococos resistentes a penicilina pertenecen a unos serotipos concretos dentro de determinados serogrupos, por ello era necesario realizar el serotipado de los aislados incluidos dentro de las familias de patrones de PBPs descritas. La Tabla IV refleja el serotipo obtenido para 96 de los neumococos estudiados. El análisis de los resultados obtenidos indicó que todos los aislados incluidos en una familia de patrón de PBPs, no sólo comparten el mismo serogrupo, sino que además pertenecen al mismo serotipo capsular. De esta forma, los aislados incluidos en las familias con valores de CMI superiores a  $1\mu\text{g/ml}$  pertenecen a los serotipos 6B (Familia 4), 23F (Familia 5) y 19A (Familia 6).

Como dato curioso se puede señalar el caso de los aislados Hun 663 (Familia 6) y Hun 963. Estos dos aislados procedían de Hungría, poseían un valor de CMI para penicilina de  $4\mu\text{g/ml}$  y pertenecían al serogrupo 19 pero, sin embargo, presentaban un patrón de PBPs diferente; cuando se realizó el serotipado se

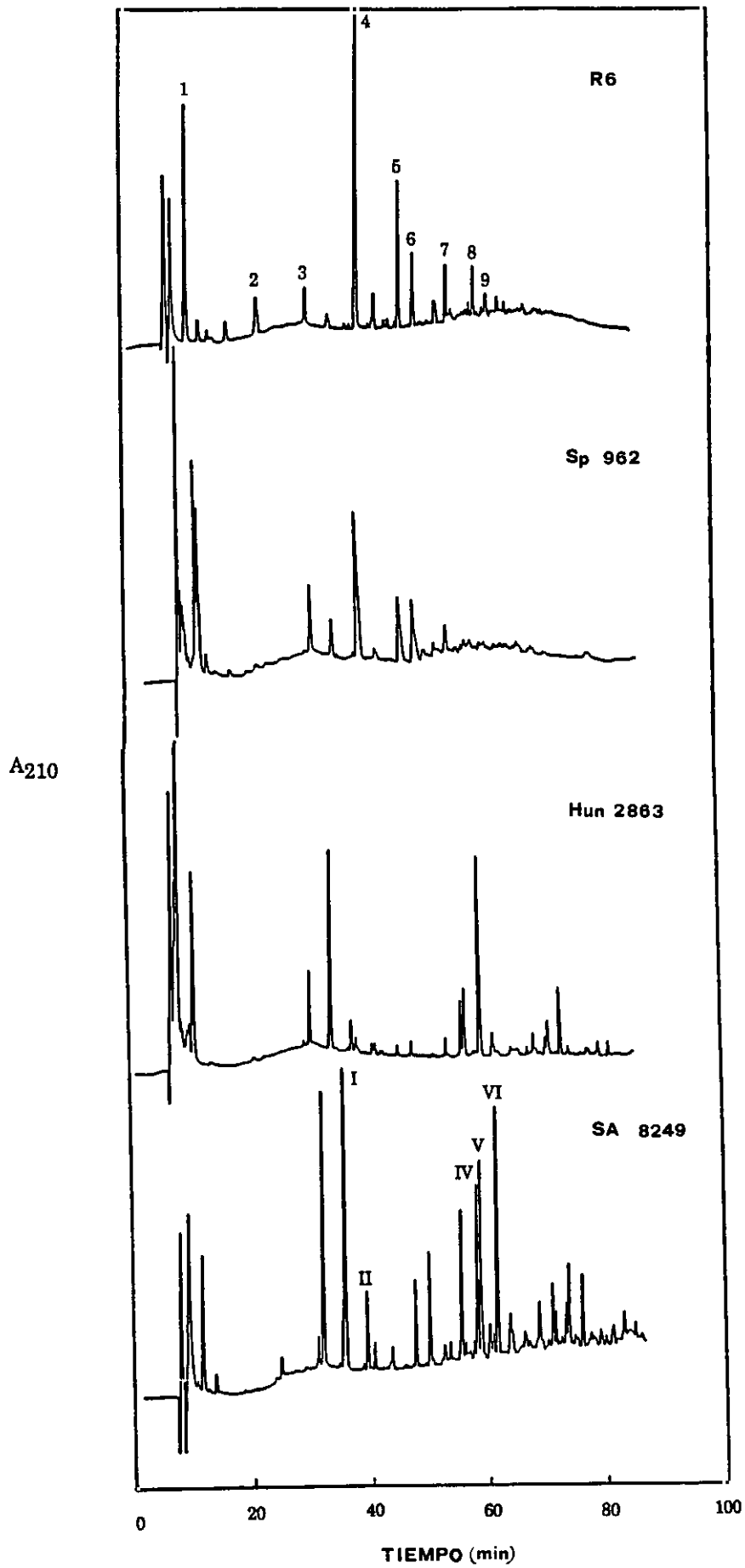
pudo comprobar que el aislado Hun 663 pertenecía al serotipo 19A mientras que el aislado Hun 963 era serotipo 19F.

Con la realización del serotipado de los aislados se confirma la discriminación observada al estudiar el patrón de PBPs.

#### **4.4.2. ANALISIS DE LOS PEPTIDOS DE PARED CELULAR**

Debido a que existe una variación en la composición peptídica de las paredes celulares de los neumococos resistentes con respecto a los sensibles (García-Bustos y Tomasz, 1990), el análisis de los péptidos de pared de los neumococos incluidos en las familias de patrones de PBPs descritas podría añadir una información interesante para una mejor caracterización de estos aislados. Por ello, se analizaron mediante cromatografía líquida de alta densidad (HPLC) los péptidos de pared obtenidos al digerir con autolisina la pared celular de neumococos incluidos en la Familia 5 (5 aislados) y en la Familia 6 (6 aislados).

La Figura 19 muestra los cromatogramas obtenidos al analizar el material peptídico de la pared celular de la cepa sensible R6, del aislado resistente control SA 8249 y de aislados representantes de la Familia 5 (Sp 962) y Familia 6 (Hun 2863). Los picos que aparecen numerados en la Figura corresponden a material peptídico con estructura conocida, de manera que los picos 1-3 y I-III son monoméricos (constituidos por péptidos con un sólo eje), los picos 4-7 y IV-VI son diméricos, y los picos 8 y 9 corresponden a trímeros. Los péptidos que aparecen designados con números romanos están constituidos exclusivamente por péptidos con ejes ramificados.



**Figura 19**

Cromatogramas obtenidos mediante HPLC de los péptidos de la pared celular de neumococos.

Se aplicaron y eluyeron en la columna 20 nmoles de material peptídico de cada uno de los aislados. Los picos numerados corresponden a péptidos descritos estructuralmente (García-Bustos y Tomasz, 1990) cuya estructura aparece reflejada en la Figura 3 (sección 1.1.2.2). Los aislados Sp 962 y Hun 2863 son miembros de las Familia 5 y 6 de PBPs, respectivamente.

En la Figura 3 (página 10) aparece reflejada la estructura de estos péptidos; los números árabes designan péptidos encontrados típicamente en los aislados sensibles a penicilina, mientras que los números romanos representan péptidos frecuentes en las paredes de los aislados resistentes.

Los cromatogramas obtenidos reflejaron una diferente distribución peptídica entre los aislados incluidos en la Familia 5 y los de la Familia 6 de patrón de PBPs. Como se observa en la Figura 19, el aislado Sp 962 (Familia 5) presentó un perfil donde los picos mayoritarios fueron 1, 4, 3, 5 y 6, similar al mostrado por R6, siendo la diferencia más notable un aumento en los péptidos correspondientes a los picos 3 y I; por el contrario, Hun 2863 presentó un perfil peptídico similar al de SA 8249 en el cual los picos mayoritarios correspondieron a los picos I, IV, V y VI. Es importante destacar que aunque Sp 962 presentó un perfil semejante al de la cepa sensible, posee un valor de CMI equivalente al de Hun 2863 ( $2\mu\text{g/ml}$ ).

Se analizaron los cromatogramas obtenidos identificándose los péptidos y posteriormente, se calculó el porcentaje de monómeros (1+2+3+I+II+III), dímeros (4+5+6+7+IV+V+VI) y trímeros (8+9). También se calculó el porcentaje, en base a péptidos totales, de péptidos lineales o péptidos con ramificaciones "Ala-Ala" o "Ala-Ser" en el residuo de lisina, de la forma (García-Bustos y Tomasz, 1990):

lineales  $[1+2+4+(0,5)5+(0,5)6+(0,6)8+(0,3)9]$

ramificados  $[3+7+I+II+III+IV+V+VI+(0,5)5+(0,5)6+(0,4)8+(0,7)9]$

La Tabla XIII muestra los valores obtenidos para la cepa sensible control R6, el aislado SA 8249, 5 aislados incluidos en la Familia 5 y para 6 miembros de la Familia 6 de patrón de PBPs. Se confirmó lo observado previamente al analizar los

Tabla XIII

Composición peptídica de las paredes celulares de neumococos

Aislado	CMI	SG	% M	% D	% T	% L	% R
R6	0,006	-	41	55	4	87	13
SA 8249	6	19	60	30	10	29	71
Hun 2863	2	19	81	16	3	46	54
Hun 14315	2	19	88	12	-	57	43
Hun 524	2	19	86	14	-	57	43
Hun 663	4	19	86	12	2	55	45
Hun 146	8	19	86	12	2	49	51
Hun 859	8	19	79	18	3	41	59
Sp 962	2	23	50	50	-	78	22
Sp 257	2	23	40	60	-	85	15
Sp 3409	1	23	50	48	2	85	15
Sp 3070	2	23	49	49	2	86	14
Sp 9300	2	23	43	52	5	85	15

**CMI** Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g/ml}$ ), **SG** serogrupo capsular, **M** monómeros, **D** dímeros, **T** trímeros, **L** péptidos lineales, **R** péptidos ramificados

cromatogramas; de manera que los miembros de la Familia 5 presentaron una composición peptídica semejante a la de la cepa sensible, con un porcentaje similar de monómeros y de dímeros, una mayoría de péptidos lineales con sólo un 15% de péptidos ramificados. En cambio, los aislados de la Familia 6 mostraron importantes alteraciones en su pared celular con respecto a la cepa sensible, presentando un aumento en la proporción de monómeros y de péptidos ramificados, alcanzando estos últimos la misma proporción que los péptidos lineales.

Los datos obtenidos al analizar mediante HPLC los péptidos de pared celular confirman la identidad en las características que presentan los aislados incluidos en una misma familia de patrón de PBPs y que los diferencia de los aislados que no comparten ese patrón de PBPs.

#### **4.4.3. ANALISIS DE ISOENZIMAS**

Se comparó la movilidad electroforética de 11 enzimas con objeto de continuar caracterizando los aislados incluidos en las familias de patrones de PBPs mediante la aplicación de diversos métodos. Para cada enzima analizada, los distintos electromorfos obtenidos se numeraron en orden decreciente a su migración anodal, de manera que cada aislado se caracterizó por una combinación de electromorfos, tantos como el número de enzimas analizadas, que constituyó su "perfil alélico".

Se analizaron 51 aislados de neumococos resistentes incluidos en tres de las familias de patrones de PBPs descritas, repartidos de la siguiente manera Familia 4 (21 aislados), Familia 5 (15 aislados) y Familia 6 (6 aislados), también se analizaron la cepa control R6, el aislado resistente

SA 8249 y los 7 aislados procedentes de Ohio (EE.UU.) que comparten un patrón de PBPs idéntico al de los aislados incluidos en la Familia 5. La mayoría de los aislados pertenecientes a una familia de PBPs presentaron un perfil alélico homogéneo (reflejado en la Tabla XIV); sin embargo, se encontraron algunas excepciones de forma que tres aislados incluidos en la Familia 4 (Sp 1625, Sp 10788 y Sp 11125) presentaron el alelomorfo 8 para la esterasa, el aislado Sp 2657 de la Familia 5 mostró el alelo 2 para la esterasa y dos aislados de la Familia 6 (Hun 146 y Hun 859) presentaron el alelomorfo 5 para la 6-fosfogluconato deshidrogenasa. No se conoce el significado de estos cambios alélicos, pero en el caso de los aislados de la Familia 6 podría estar relacionado con el mayor nivel de resistencia a penicilina presentado por estos dos aislados (CMI 8µg/ml). Aunque no aparece reflejado en la tabla, los aislados procedentes de Ohio mostraron un perfil alélico idéntico al presentado por la mayoría de los aislados incluidos en la Familia 5 de patrón de PBPs. Entre las enzimas estudiadas se encontraron 4 enzimas que aparecieron monolócicas para todos los aislados analizados, estas enzimas fueron leucina aminopeptidasa, fosfoglucona isomerasa, lactato deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa.

El análisis electroforético de las enzimas multilócicas reveló que una amplia mayoría de los aislados incluidos en una familia de patrón de PBPs posee un perfil alélico idéntico, y diferente del encontrado en otros aislados resistentes y sensibles.

Después de la aplicación de varios métodos de caracterización se acentúa la tendencia que sugiere que la discriminación establecida según el patrón de PBPs coincide con la discriminación obtenida al aplicar otros marcadores.

Tabla XIV

Tipos electroforéticos de 11 isoenzimas en neumococos resistentes a penicilina incluidos en familias de patrones de PBPs

Enzima	R6	SA 8249	Familia de PBPs		
			4	5	6
NSP	3	3	3	5	5
LAP	5	5	5	5	5
ADK	5	5	5	5	3
PGI	5	5	5	5	5
EST	6	8	5	5	8
PGM	3	3	5	3	5
LDH	5	5	5	5	5
GP1	8	8	5	5	5
GP2	5	5	3	5	3
6PG	5	5	5	5	8
ADH	5	5	5	5	5

NSP nucleósido fosforilasa, LAP leucina aminopeptidasa, ADK adenilato quinasa, PGI fosfoglucona isomerasa, EST  $\alpha$ -,  $\beta$ -naftilpropionato esterasa, PGM fosfoglucomutada, LDH L-lactato deshidrogenasa, GP1 glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*locus* 1), GP2 glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (*locus* 2), 6PG 6-fosfogluconato deshidrogenasa, GLD glutamato deshidrogenasa, ADH alcohol deshidrogenasa

#### 4.4.4. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS AL DIGERIR ENZIMATICAMENTE DNA CROMOSOMICO

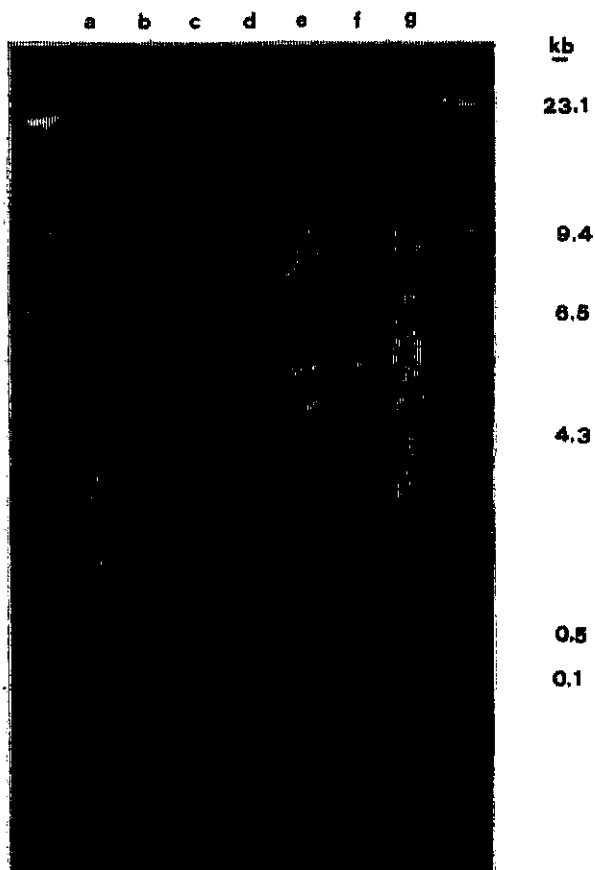
El desarrollo de diversas técnicas moleculares permite determinar con un elevado grado de certeza si varios organismos pertenecen a un mismo grupo o clon; por ello, los aislados incluidos en familias de patrones de PBPs fueron sometidos a un análisis de los fragmentos obtenidos después de digerir su DNA con endonucleasas de restricción.

Se analizaron los patrones de fragmentos obtenidos al digerir el DNA cromosómico de 21 aislados incluidos en la Familia 4, 15 aislados incluidos en la Familia 5 y 6 aislados pertenecientes a la Familia 6 de patrón de PBPs; también se estudiaron otros aislados entre los que se incluían las cepas control y los aislados de Ohio. El DNA cromosómico de estos aislados fué sometido a digestión con las enzimas de restricción *Hind*III y *Eco*RI. Se puede estimar en  $4,5 \times 10^2$  el número de fragmentos obtenido para el DNA de *S.pneumoniae* cortado con *Hind*III o *Eco*RI, deducido a partir del tamaño total del cromosoma  $2,27 \times 10^3$ Kb (Gasc et al., 3rd ASM Streptococcal Genetics Conference, resumen A/33, 1990) y del tamaño medio de los fragmentos de restricción generados por estas enzimas (5Kb) que reconocen secuencias de 6pb. La inspección visual de los patrones de restricción permitió diferenciar sólo entre 50-60 bandas que presentaban un tamaño molecular comprendido entre 23Kbp y 100bp, como se observó al comparar con el tamaño de los fragmentos obtenidos al digerir DNA del bacteriófago lambda. Aunque las dos enzimas reconocen secuencias de seis nucleótidos, la utilización de *Hind*III originó unos patrones de restricción que presentaban una mayor resolución visual.

La utilización de un densitómetro hubiera permitido una mayor resolución de los patrones obtenidos; sin embargo, la inspección visual de los geles fué suficiente para producir una información significativa de los patrones de restricción. La Figura 20 muestra un gel de agarosa obtenido al digerir DNA cromosómico de varios aislados miembros de la Familia 4 de patrón de PBPs; se puede observar la existencia de una gran homología entre los patrones de los aislados incluidos en la Familia 4, al igual que la existencia de diferencias significativas entre los patrones mostrados por los aislados no pertenecientes a esta familia (Sp 2809 y Sp 2559) que aparecen en posición contigua al marcador de tamaño molecular. Al analizar los aislados pertenecientes a las Familias 5 y 6 mediante las dos enzimas de restricción utilizadas también fué posible comprobar la elevada homología existente entre los fragmentos de restricción de los aislados incluidos en una misma familia de PBPs.

La Figura 21 refleja el patrón de los fragmentos obtenidos al digerir DNA cromosómico de los aislados incluidos en la Familia 5 y los aislados de Ohio que comparten un patrón común de PBPs; se pudo observar una homología general en los fragmentos obtenidos en estos aislados, a excepción de la existencia de una pequeña variación en las bandas correspondientes a DNA de elevado tamaño molecular presente en dos aislados de la Familia 5 (Sp 257 y Sp 949).

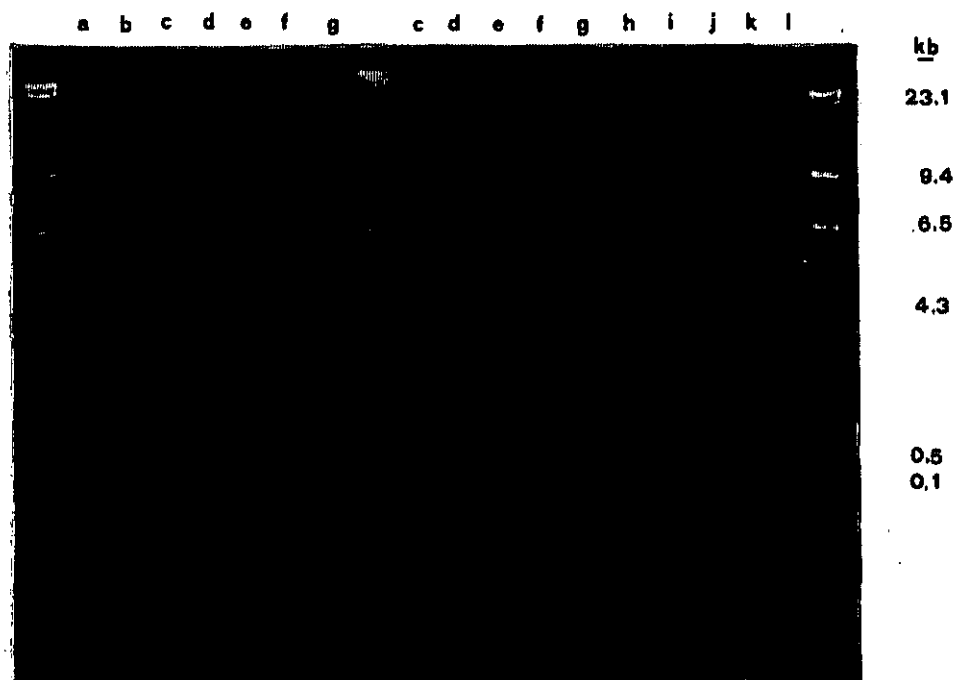
Las comparaciones de los fragmentos de restricción parece apoyar los resultados obtenidos mediante la comparación de los patrones de PBPs y mediante la utilización de los métodos de caracterización realizados previamente.



**Figura 20**

Patrones de restricción con *Hind*III del DNA cromosómico de aislados incluidos en la Familia 4 de PBPs.

Los aislados representados son (a) Sp 2809, (b) Sp 625, (c) Sp 656, (d) Sp 1249, (e) Sp 1238, (f) Sp 114 y (g) Sp 2559. Los aislados representados en b-f están incluidos en la Familia 4 según su patrón de PBPs; a y g corresponden a aislados serogrupo 6 no pertenecientes a esta familia. Como marcador del tamaño de los fragmentos obtenidos se utilizó DNA del bacteriófago lambda cortado con *Hind*III.



**Figura 21**

Patrones de restricción con *Hind*III del DNA cromosómico de aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs.

Los aislados representados son (a) Sp 11848, (b) Sp 257, (c) Sp 949, (d) Sp 962, (e) Sp 2066, (f) Sp 622, (g) US 937900, (h) US 1071562, (i) US 1969, (j) US 1983, (k) US 1961 y (l) US 1977. Los aislados b-f están incluidos en la Familia 5 según su patrón de PBPs; Sp 11848 es un aislado serogrupo 23 no perteneciente a esta familia. Los aislados g-l corresponden a los aislados procedentes de Estados Unidos que poseen un patrón de PBPs idéntico al de los miembros de la Familia 5. El marcador de peso molecular corresponde a DNA del bacteriófago lambda cortado con *Hind*III.

#### 4.4.5. ANALISIS DE LOS FRAGMENTOS OBTENIDOS AL DIGERIR ENZIMATICAMENTE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA PBP 2B y 2X

Se puede realizar una caracterización más profunda de estos aislados al estudiar las alteraciones en los genes de las PBPs; por ello, y basado en el hecho que los genes que poseen una secuencia distinta presentan un mapa de restricción distinto, se utilizó la técnica de digestión de genes para comparar los genes de la PBP 2B y 2X de los aislados incluidos en familias de patrones de PBPs.

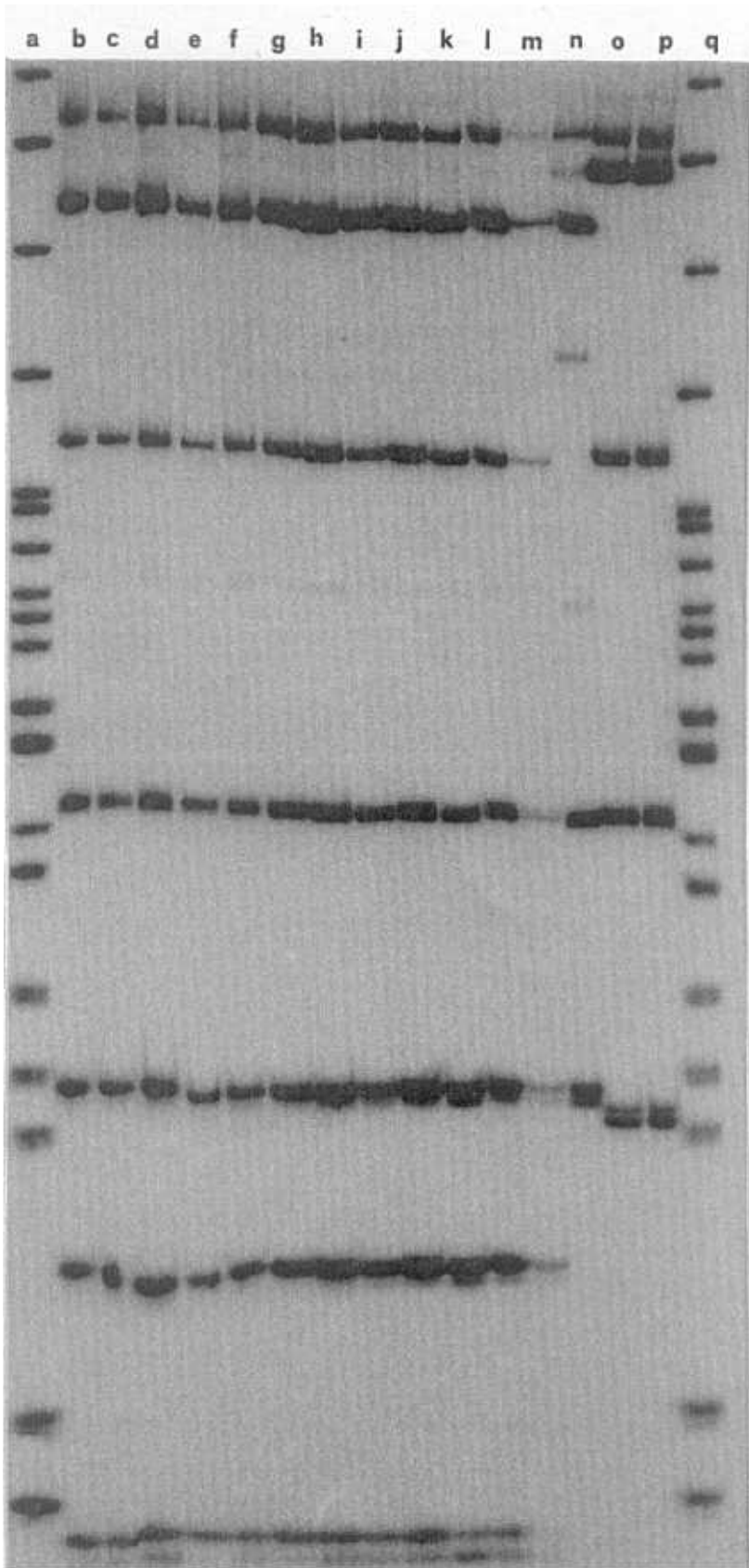
Se estudió el patrón de restricción obtenido en los aislados incluidos en la Familia 5, en los aislados procedentes de Ohio, y en algunos aislados resistentes a penicilina no incluidos en esta familia. La Figura 22 muestra el patrón de fragmentación originado en los genes de la PBP 2B de estos aislados como consecuencia de la digestión con *StyI*. Se observó que los aislados pertenecientes a la Familia 5 y los aislados de Ohio, produjeron un modelo de fragmentos idéntico, en el que se podían diferenciar 7 fragmentos mayoritarios de un tamaño comprendido entre 622 y 34pb; este patrón de fragmentos fué marcadamente diferente del obtenido en la cepa sensible R6 y en los otros neumococos resistentes analizados. Los fragmentos encontrados en los aislados de la Familia 5 que permiten diferenciarlos del resto de los aislados son unos fragmentos de aproximadamente 450, 50 y 20pb, además de la desaparición de un fragmento de 500pb. La digestión del gen de la PBP 2B con *HinfI* también originó un modelo de fragmentos característico en los aislados incluidos en la Familia 5 de patrón de PBPs.

Al someter a digestión el gen de la PBP 2X de los aislados anteriores con una combinación de las enzimas *DdeI* y *MseI* se

originó un modelo de fragmentación más complejo, en el que se podían diferenciar 13 fragmentos mayoritarios de un tamaño comprendido entre 300 y 20 pb aproximadamente; estos fragmentos fueron idénticos en todos los aislados incluidos en la Familia 5 y en los aislados de Ohio, a excepción del aislado Sp 2657 que presentó dos fragmentos adicionales. Los aislados no incluidos en esta familia mostraron diferentes patrones de restricción tal como refleja la Figura 23.

La digestión enzimática de los genes de la PBP 2B y 2X de los aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs parece indicar que la secuencia de estos genes es idéntica en todos los aislados; estos resultados confirmarían los obtenidos en experimentos previos indicando que los aislados incluidos en una misma familia de patrón de PBPs comparten además múltiples y diversas características fisiológicas.

Todos los análisis realizados estuvieron encaminados a conseguir una caracterización precisa de los aislados de neumococos resistentes a penicilina incluidos en familias de patrones de PBPs. En general, todos ellos resultaron de utilidad, aunque se observaron pequeñas diferencias en sensibilidad por lo que es recomendable utilizar más de un método para conseguir una mayor exactitud en la caracterización y clasificación de estos aislados.



622 pb

309

147

76

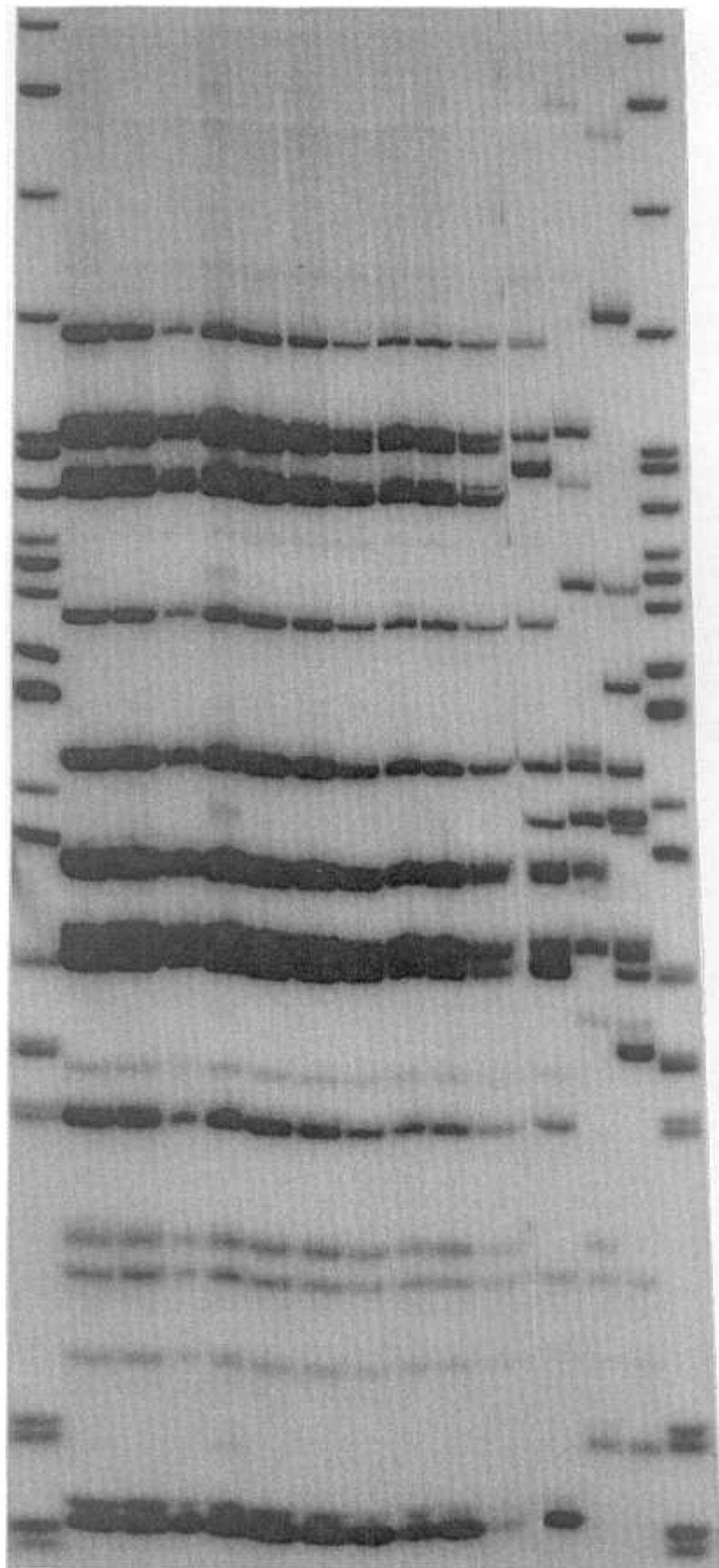
34

**Figura 22**

Patrón de los fragmentos originados después de la digestión con *StyI* del gen de la PBP 2B de aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs.

Los fragmentos originados después de la digestión del gen de la PBP 2B con *StyI* se marcaron con  $^{32}\text{P}$ , se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 6% y se sometieron a autorradiografía. Las líneas b-f corresponden a aislados incluidos en la Familia 5 de PBPs y las líneas g-k muestran los aislados procedentes de Estados Unidos con un patrón de PBPs idéntico al de la Familia 5. Las líneas muestran los aislados (b) Sp 257, (c) Sp 496, (d) Sp 499, (e) Sp 2657, (f) Sp 622, (g) US 937000, (h) US 1071562, (i) US 1969, (j) US 1683 y (k) US 1961. Las líneas l, m, n, y p corresponden a aislados incluidos en otras familias de PBPs, y las líneas a y q son los marcadores de peso molecular (pBR322 digerido con *HpaII*).

c d e f g h i j k l m n o



522 pb

309

47

16

14

**Figura 23**

Patrón de los fragmentos originados después de la digestión doble con *DdeI* y *MseI* del gen de la PBP 2X de aislados incluídos en la Familia 5 de PBPs.

Las líneas b-f corresponden a los aislados incluídos en la Familia 5 de PBPs y las líneas g-k muestran los aislados procedentes de Estados Unidos con un patrón de PBPs idéntico al de los miembros de la Familia 5. Las líneas representan los aislados (b) Sp 257, (c) Sp 496, (d) Sp 499, (e) Sp 2657, (f) Sp 622, (g) US 937900, (h) US 1071562, (i) US 1969, (j) US 1683 y (k) US 1961. Los patrones obtenidos con neumococos incluídos en otras familias de patrones de PBPs se muestran en las líneas l, m y n. Las líneas a y o son los marcadores de peso molecular (pBR322 digerido con *HpaII*).

## **DISCUSSION**

## 5. DISCUSION

### 5.1. DISTRIBUCION DE SEROGRUPOS EN NEUMOCOCOS RESISTENTES A PENICILINA

Uno de los logros más importantes de este siglo ha sido la capacidad del hombre para controlar la actividad bacteriana mediante el uso de agentes antimicrobianos, consiguiéndose así un elevado descenso en la incidencia de numerosas infecciones que amenazaban la vida.

Al comienzo de la era antibiótica, los aislados clínicos de *S.pneumoniae* mostraban un alto y uniforme grado de sensibilidad hacia los antibióticos, con unos valores de CMI para penicilina extremadamente bajos (5 a 10 ng/ml); por ello la penicilina se recomendó como el antibiótico de elección en las infecciones neumocócicas. En la actualidad, la mayoría de los trabajos publicados todavía describen una incidencia de resistencia a penicilina inferior al 3% (Klugman, 1990), sin embargo en algunos países durante las dos últimas décadas se ha observado un cambio en el patrón de sensibilidad de *S.pneumoniae*. En España se ha descrito una incidencia de neumococos resistentes a penicilina del 28% durante el período 1.979-1.989 (Fenoll et al., 1991), valor extremadamente alto si se compara con los obtenidos en estudios similares realizados en Francia en el período 1.980-1.986 (Buu-Hoï et al., 1988) donde sólo encontraron un 0,3% o en Bélgica durante 1.980-1.988 con un 0,9% (Verhaegen et al., 1990), y sólo sobrepasados por el 47% descrito en Hungría en el período 1.985-1.988 (Marton et al., 1991).

A nivel mundial se ha descrito que sólo se alcanza un alto nivel de resistencia a penicilina en un pequeño número de serogrupos neumocócicos determinados (Klugman, 1990), de manera que los serogrupos 6, 14, 19 y 23 son los serogrupos predominantes que manifiestan resistencia a penicilina. Estos serogrupos representan dos tercios de los neumococos aislados durante los dos primeros años de vida (Gray *et al.*, 1980), además presentan un estado de portador prolongado y una readquisición rápida después de una terapia antibiótica. Las características señaladas aumentan las posibilidades de exposición de estos neumococos a antibióticos lo que puede constituir un factor selectivo para predisponer estos serogrupos a la resistencia. La estabilidad de la resistencia adquirida en estos aislados y su ventaja selectiva en el caso de presión antibiótica produce una expansión y prevalencia de estos neumococos en las comunidades que se administran antibióticos.

Las revisiones epidemiológicas de neumococos resistentes a penicilina muestran un cambio pequeño pero continuo hacia unos valores superiores de CMI. El incremento relativamente pequeño desde valores de 0,006 hasta 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , no se refleja en la literatura microbiológica clínica pues estos aislados se incluyen en la definición clínica de "sensibilidad" (Jones, 1988). Sin embargo, estudios iniciales mostraron que este pequeño incremento en el valor CMI representa la adquisición de marcadores de resistencia que pueden ser transmitidos mediante transformación genética (Shockley y Hotchkiss, 1970) y que está relacionado con cambios en la afinidad de las PBPs hacia el antibiótico (Handwerger y Tomasz, 1986a).

Los resultados obtenidos en este estudio indican que el pequeño cambio en el valor CMI ha afectado a un gran número de aislados clínicos, de manera que entre los aislados actuales

son muy escasos los neumococos completamente sensibles a penicilina (MIC 0,006 $\mu$ g/ml). También se observa un cambio en la distribución de serogrupos en función del nivel de resistencia a penicilina (Figura 7). Los aislados con valores de CMI 0,015-0,06 $\mu$ g/ml aparecen en todos los serogrupos neumocócicos con una frecuencia paralela a la frecuencia de la incidencia de serogrupos de los neumococos estudiados, de esta manera los aislados que muestran un bajo nivel de resistencia "borderline" son más frecuentes entre los serogrupos 3, 8, 7 y 1. Los resultados obtenidos también demuestran que el aumento en el valor de CMI en estos aislados de bajo nivel de resistencia (0,015-0,06 $\mu$ g/ml) es una resistencia "real" que implica cambios genéticos y alteración bioquímica de las PBPs. El pequeño pero significativo incremento en el valor de CMI de la mayoría de las cepas examinadas indica un cambio ocurrido durante las últimas décadas, probablemente debido a una excesiva utilización de antibióticos en la clínica.

Se observa un contraste acusado en la distribución de serogrupos de los aislados analizados con un valor de CMI superior a 0,1 $\mu$ g/ml, ya que sólo pertenecen a un limitado número de serogrupos, fundamentalmente 6, 9, 14, 19 y 23; esta distribución es la misma que la descrita para los primeros aislados clínicos resistentes (Hansman et al., 1971). Los resultados obtenidos indican que la eliminación de la mayoría de los serogrupos se produce en un valor de CMI marcadamente definido y próximo a 0,1 $\mu$ g/ml. La estrecha distribución de serogrupos entre los neumococos resistentes es una de las incógnitas del estudio de la resistencia a penicilina en este organismo.

En base a los resultados obtenidos se puede especular sobre el origen de la resistencia a penicilina. El mecanismo

bioquímico de la resistencia parece el mismo por debajo y por encima del valor umbral de CMI  $0,1\mu\text{g/ml}$ , implicando alteraciones en la capacidad de las PBPs para unir el antibiótico. La homología entre incidencia y frecuencia de la resistencia de bajo nivel en un determinado serogrupo sugiere que el mecanismo de adquisición de este bajo nivel de resistencia ("borderline") puede implicar mutaciones puntuales en los determinantes estructurales de las PBPs, concretamente en la PBP 2A. Este proceso se ha demostrado en el laboratorio al someter los neumococos sensibles a una presión antibiótica (McKee y Houck, 1943) de manera que la selección de estos mutantes ocurre con una frecuencia considerable hasta unos valores de CMI cercanos a  $0,05-0,1\mu\text{g/ml}$ , siendo extremadamente difícil la selección de mutantes con niveles superiores de resistencia .

Estos resultados sugieren que cuando la resistencia aumenta por encima de  $0,1\mu\text{g/ml}$  debe actuar un nuevo proceso que sólo se consigue en el ambiente clínico "in vivo". El análisis de la secuencia de bases del gen de la PBP 2B de neumococos resistentes sugiere que estos aislados pueden haber adquirido secuencias de DNA de otras especies (Dowson et al., 1989c) (Dowson et al., 1990), obteniéndose unas conclusiones similares con el análisis de aislados clínicos de gonococos (Spratt, 1988) y meningococos (Spratt et al., 1989) resistentes a penicilina. Por lo tanto, la adquisición de secuencias de DNA puede ser el mecanismo dominante y crítico en la evolución hacia un alto nivel de resistencia a penicilina en neumococos.

Sin embargo, este mecanismo no explica el proceso por el cual a nivel mundial sólo se alcanza un alto grado de resistencia en unos pocos serogrupos determinados. Se pueden considerar dos mecanismos alternativos o una combinación de

ambos. El primer mecanismo estaría basado en el hecho que los serogrupos 6, 14, 19 y 23 son los más frecuentes entre los neumococos aislados a partir de población infantil y que la infección neumocócica en pediatría implica frecuentemente la utilización terapéutica de penicilina; esta situación proporcionaría a los aislados pertenecientes a estos serogrupos una ventaja selectiva que podría aumentar su prevalencia en las comunidades en las que se administran antibióticos.

El mecanismo alternativo, para explicar la particular distribución de serogrupos encontrada entre los aislados resistentes, está basado en los estudios realizados recientemente (García-Bustos y Tomasz, 1990) demostrando que los neumococos resistentes poseen una pared celular con un componente péptidico del peptidoglicano alterado, observándose además que este cambio estructural puede cotransformar con resistencia a penicilina (García-Bustos et al., 1988). Por ello, se puede suponer que el peptidoglicano alterado de las células resistentes sólo es capaz de retener un número limitado de tipos capsulares en una forma activa inmunológicamente. Según este modelo inicialmente se podría desarrollar un alto nivel de resistencia a penicilina con igual oportunidad en neumococos de todos los serogrupos; sin embargo, la mayoría de las cápsulas no serían retenidas por el peptidoglicano alterado resultando así fagocitadas por las defensas del huésped. Estos serogrupos serían entonces eliminados de entre los que presentan neumococos resistentes; por ello, los serogrupos resistentes quedarían restringidos a aquellos que posean una cápsula compatible con la estructura alterada del peptidoglicano y capaz de proteger a los neumococos frente a la fagocitosis.

## 5.2. INCIDENCIA DE AISLADOS CLINICOS DE NEUMOCOCOS TOLERANTES A PENICILINA

De forma similar al incremento en los niveles de CMI frente a penicilina, se ha producido un aumento paralelo en la tolerancia hacia este antibiótico. Inicialmente los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, a concentraciones superiores al valor de CMI, lisaban y destruían rápidamente a los neumococos. Sin embargo en 1.985 (Liu y Tomasz, 1985) se describieron por primera vez aislados clínicos de *S.pneumoniae* multirresistentes que mostraban tolerancia a penicilina; en estos neumococos tolerantes el tratamiento con penicilina sobre el valor de CMI no inducía degradación de la pared celular o lisis y en ellos se reducía la pérdida de viabilidad en comparación con los aislados no tolerantes. En un estudio realizado posteriormente (Moreillon y Tomasz, 1.988) en una muestra de aislados clínicos de neumococo se encontró que un 64% de los aislados que presentaban un valor de CMI  $>0,1\mu\text{g/ml}$  y un 32% de los sensibles mostraban una lisis deficiente cuando eran tratados con penicilina. Los resultados obtenidos en este estudio muestran valores ligeramente superiores, obteniéndose que un 83% de los aislados resistentes y un 54% de los sensibles muestran una disminución en el grado de lisis en comparación con la cepa control con una autolisina funcional.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio apoyan los datos iniciales (Liu y Tomasz, 1985) que indicaban que en neumococos la resistencia a penicilina y la disminución en el grado de lisis son mecanismos distintos que pueden ser separados fácilmente mediante cruces genéticos. Sin embargo, en los aislados clínicos de neumococos existe una frecuente asociación entre estos dos caracteres. Se han realizado experimentos (Moreillon y Tomasz, 1988) que sugieren que la

elevada asociación entre resistencia y disminución en la lisis puede ser el resultado de una determinada presión antibiótica *in vivo*. En la clínica las bacterias patógenas están expuestas a una combinación de dos clases de presión antibiótica: ciclos breves y repetidos con altas concentraciones de antibiótico y períodos prolongados de eliminación del antibiótico en los que la concentración de este es cercana o inferior al valor de CMI. La reconstrucción en el laboratorio de la primera clase de presión origina mutantes deficientes en lisis con un valor CMI inalterado; sin embargo, la segunda clase de presión antibiótica origina mutantes resistentes, con valores CMI aumentados, que no presentan una alteración en el grado de lisis. Una combinación de las dos clases de presión origina cepas resistentes y deficientes en lisis. Estos autores proponen un posible mecanismo para explicar la elevada asociación entre estos dos caracteres, resistencia y lisis deficiente frente a penicilina; de forma que se produciría una selección inicial de los aislados que presentan una lisis deficiente (y tolerantes) los cuales podrían constituir unos receptores adecuados en la transmisión de un carácter de resistencia existente previamente, o bien podrían constituir un material idóneo a partir del cual se produciría la selección de mutantes resistentes que aparecerían con una elevada probabilidad.

En 1.990 Moreillon et al. realizaron un estudio en neumococos para investigar la relación existente entre la lisis y la supervivencia inducidas por penicilina. Observaron que los mutantes con un gen de la autolisina inactivo ( $Lyt^-$ ) mostraban una respuesta lítica a penicilina reducida; sin embargo su supervivencia era muy elevada en comparación con el valor obtenido en las cepas  $Lyt^+$ , ya que presentaban sólo una reducción inferior a un orden de magnitud en el logaritmo del

número de viables para cada hora de tratamiento. La transformación de una cepa que presentaba una supervivencia mínima al tratamiento con penicilina (descenso de 4 a 5 log) con una que mostraba una alta supervivencia (descenso 1 log) llevó al descubrimiento de un gen presente en la cepa de elevada supervivencia que llamaron "cid" (de "bactericida") y que estaba ausente en las cepas que sobrevivían al tratamiento (Cid<sup>-</sup>); el mecanismo y función de este gen permanece todavía especulativo. Moreillon et al. (1990) concluyeron que la penicilina ocasiona la muerte en neumococos mediante dos mecanismos distintos, uno que implica la desregulación de la autolisina y origina aproximadamente un descenso de 1 log en el número de viables en 6 horas, y otro mecanismo independiente de autolisina y responsable de un descenso de 3 a 4 unidades en el log.

Los resultados descritos en este estudio apoyan la hipótesis de la existencia de ambos genes en la regulación de la "lisis-muerte" inducidas por penicilina. Al analizar en cada aislado los valores obtenidos en la lisis y supervivencia, se encuentra que un 49% de los aislados analizados podrían corresponder a un fenotipo Lit<sup>+</sup>Cid<sup>-</sup>, un 13% al fenotipo Lyt<sup>+</sup>Cid<sup>-</sup>, 26% al Lyt<sup>-</sup>Cid<sup>-</sup>, y un 3% corresponderían al fenotipo Lit<sup>-</sup>Cid<sup>+</sup>; el fenotipo Lit<sup>-</sup>Cid<sup>+</sup> indica un mecanismo de muerte independiente de autólisis. De forma similar, en aislados clínicos y cepas de laboratorio de estreptococos del grupo A se han descrito (McDowell y Reed, 1989) dos tipos de fenotipos "no líticos": cepas tolerantes en las que la penicilina inhibe el crecimiento pero pierden viabilidad muy lentamente y cepas de "muerte no lítica" que son destruidas rápidamente después del tratamiento con penicilina en dosis bajas; este fenómeno está relacionado con una hidrólisis total de RNA y no aparece acompañado de solubilización de la pared celular.

Los resultados obtenidos en esta tesis indican una alta proporción de mutantes Cid<sup>-</sup> entre los aislados clínicos estudiados; en estos mutantes la penicilina tiene una actuación muy limitada, por ello constituyen el foco de atención en los problemas que presentan estos neumococos en la quimioterapia. El fenómeno de tolerancia a antibióticos asociado a unos niveles elevados de resistencia a estos compuestos aumenta notablemente las posibilidades de un aislado de sobrevivir al tratamiento terapéutico. En la actualidad, existe una preocupación por la búsqueda de tratamientos alternativos para los casos de aislados resistentes a  $\beta$ -lactámicos, sin embargo no existe una preocupación similar por los patógenos tolerantes a estos compuestos.

En 1.988 la Organización Mundial de la Salud organizó un simposio para considerar el uso y abuso de antibióticos (Kunin *et al.*, 1990), en el que los participantes de varios países desarrollados estimaron el uso de antibióticos y los problemas de resistencia en sus respectivos países, y concluyeron que es necesario establecer una red coordinada a nivel mundial para poder obtener unos datos representativos y organizar unos seguimientos clínicos con objeto de definir el agente antimicrobiano más idóneo, así como la dosis y la duración del tratamiento en condiciones específicas. En el caso concreto de neumococo, determinaron que es necesario un seguimiento de las resistencias a antibióticos y de la distribución de serotipos a nivel mundial.

### 5.3. PATRON DE PBPs EN LOS TRANSFORMANTES RESISTENTES A PENICILINA

Los estudios realizados inicialmente (Zighelboim y Tomasz, 1980) indicaban que la resistencia a penicilina podía ser introducida en una cepa sensible de laboratorio mediante transformación genética; asimismo describían la dificultad encontrada para alcanzar el nivel de resistencia del aislado donante, necesitándose al menos tres ciclos consecutivos de transformación. La serie de transformantes obtenidos en estos estudios exhibían un gradual cambio en el patrón de PBPs, variando desde el característico de la cepa sensible receptora hasta el patrón típico del aislado donante. Experimentos posteriores realizados de forma similar (Chalkley y Koornhof, 1988) describieron unos resultados que no coincidían con los publicados previamente. En este estudio, para obtener unos transformantes altamente resistentes a penicilina necesitaron sólo dos ciclos de transformación; además, describieron que el patrón de PBPs de diferentes aislados no se parece necesariamente uno a otro ni a los de los transformantes de laboratorio. Estudios semejantes realizados en cepas de *N.gonorrhoeae* que presentaban resistencia cromosómica a penicilina (Dougherty, 1986) indicaron que el patrón de PBPs de los transformantes obtenidos mostraba una alta heterogeneidad y que no se alcanzaba un patrón de PBPs como el del aislado donante, de forma que en el 70% de los transformantes se obtuvo una PBP 1 que presentaba una afinidad intermedia entre la del donante y la de la cepa receptora.

Todos estos resultados se habían obtenido al utilizar un único DNA donante que procedía de un aislado clínico resistente a penicilina. Por ello, uno de los propósitos de este estudio fué observar el patrón de PBPs obtenido en los transformantes

procedentes de diferentes cruces, al utilizar DNAs de aislados que poseían diferentes patrones de PBPs.

En los experimentos descritos en este trabajo sólo se necesitaron dos ciclos de transformación para obtener transformantes con un nivel de resistencia similar al del aislado donante de DNA. Además se observó que la frecuencia con la que se obtienen transformantes resistentes a penicilina disminuye durante los ciclos de transformación confirmando así algunos resultados previos (Tomasz, 1982) pero en oposición a los obtenidos por Chalkey y Koornhof (1988). El patrón de PBPs mostrado por los transformantes obtenidos en este estudio y aislados en el primer ciclo de transformación había sido ya descrito en unos transformantes con un nivel de resistencia equivalente (Chalkey y Koornhof, 1988). De forma similar, el patrón de los transformantes obtenidos en el segundo ciclo fué muy similar al descrito en experimentos previos (Chalkey y Koornhof, 1988) (Dowson et al., 1989b).

Tanto en los trabajos anteriores como en este estudio se utilizó la cepa de laboratorio R6 o una cepa derivada de ella, como cepa receptora de DNA en los experimentos de transformación; ello podría ser la explicación para la homología observada en los patrones de PBPs de los transformantes obtenidos al utilizar diferentes DNAs donantes. Estos resultados parecen indicar que el patrón de PBPs obtenido en los transformantes es independiente del patrón de PBPs presentado por el aislado donante de DNA, estando determinado por el fondo genético de la bacteria receptora.

Se desconoce el mecanismo por el cual la bacteria receptora competente acepta diferentes DNAs, se recombina y al final del proceso adquiere resistencia mostrando,

aparentemente, un único patrón de PBPs. La secuenciación de los genes que codifican para las PBPs en estos transformantes permitiría obtener una información muy útil para la explicación del mecanismo implicado en este proceso. Además añadiría nuevos datos a las pruebas existentes de que la resistencia a penicilina en algunos organismos ha ocurrido por la transmisión horizontal de zonas de genes cromosómicos, y por su incorporación en el cromosoma receptor mediante un proceso de recombinación homóloga originando unos genes con estructura "en mosaico" (Dowson et al., 1989c) (Dowson et al., 1990) (Maynard Smith et al., 1991)

#### **5.4. PATRON DE PBPs COMO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO EN NEUMOCOCOS RESISTENTES A PENICILINA**

En 1.982, Tomasz sugirió que el patrón de PBPs podía ser utilizado para realizar una clasificación taxonómica de una especie bacteriana. Sin embargo, resultados obtenidos posteriormente (Gutmann *et al.*, 1982) (Farber *et al.*, 1983) indicaban que las PBPs suponían un método para clasificar los organismos menos fiable de lo esperado inicialmente. Fué en 1.986 cuando Williamson *et al.* utilizaron con éxito el patrón de PBPs para identificar aislados de enterococos difícilmente identificables mediante la utilización de las pruebas bioquímicas convencionales; estos resultados y la descripción de la existencia de "familias" de aislados que compartían patrones de PBPs (Jabes *et al.*, 1989) ofrecía nuevas posibilidades a la utilización de las PBPs como marcador epidemiológico.

Los estudios iniciales realizados en el aislado SA 8249 indicaron que el mecanismo de resistencia a penicilina en neumococos implicaba alteraciones en la estructura de las PBPs, en su tamaño molecular y en una menor afinidad hacia el antibiótico (Zigheboim y Tomasz, 1980). Posteriormente para comprobar si el patrón observado en el aislado SA 8249 representaba el único patrón de PBPs existente en los neumococos sensibles, se realizaron estudios analizando las PBPs de otros aislados, encontrándose un sorprendente grado de variabilidad (Chalkley y Koornhof, 1988) (Markiewicz y Tomasz, 1989).

En 1.989, Jabes *et al.* al analizar una muestra de 160 aislados clínicos consiguieron identificar 11 patrones de PBPs en los que se agrupaban 39 neumococos resistentes y que fueron descritos como "familias" de patrones de PBPs. Mediante el

presente estudio se ha conseguido aumentar la información existente sobre dos de las familias de patrones de PBPs descritas previamente (Familias 4 y 5), describir una nueva familia de aislados resistentes (Familia 6) y, por primera vez, describir la existencia de grupos de aislados que comparten patrones de PBPs y que muestran niveles intermedios de resistencia a penicilina (Familias 1, 2 y 3). La descripción de nuevas familias de patrones de PBPs que agrupaban a un elevado número de miembros apoyaba la posible utilización del patrón de PBPs como un marcador epidemiológico adecuado para los neumococos resistentes a penicilina.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el patrón de PBPs cumple todas características fundamentales necesarias en un marcador epidemiológico. Todos los aislados analizados presentaron un patrón característico en sus PBPs, de manera que todos los aislados fueron reconocidos, fueron "tipables" (tipabilidad). Entre los neumococos resistentes se encontraron seis patrones principales y casi un centenar de patrones distintos minoritarios, por lo cual el patrón de PBPs como marcador reconoce un gran número de tipos (discriminación). Fue necesario probar la reproducibilidad y estabilidad del patrón de PBPs; aunque un estudio realizado previamente (Georgopapadokou y Liu, 1980) parecía indicar que el número de PBPs dependía de las condiciones experimentales en las que se realizaba el experimento, los resultados descritos en este estudio indican que en neumococos el patrón de PBPs de un aislado particular es una propiedad genéticamente estable que no resulta alterada cuando se someten los cultivos a diversos tratamientos.

En este estudio se han encontrado dos pruebas fundamentales que apoyan la utilización de patrón de PBPs como

marcador epidemiológico. En primer lugar, la descripción de una PBP 3 que presenta una movilidad electroforética menor que la habitual y designada como PBP 3X. Esta PBP 3 atípica sólo había sido descrita en un aislado procedente de Papua Nueva Guinea (Hakenbeck et al. 1986) (Jabes et al., 1989), en dos aislados de Alaska (Markiewicz y Tomasz, 1989) y en tres aislados procedentes de Suráfrica (Chalkley y Koornhof, 1989), en este trabajo se han descrito dos familias de aislados (Familias 1 y 6) que presentan la PBP 3X. La PBP 3X de la Familia 6 es la que permite diferenciar a los aislados incluidos en esta familia aunque presenten niveles de resistencia a penicilina muy distintos, variando desde 0,25 a 8 $\mu$ g/ml.

Por otro lado, en 1.989 (Allphin et al., 1989) se describió un neumococo de serogrupo 23 resistente a penicilina y aislado a partir de un niño con otitis media en un ambulatorio de Cleveland, Ohio (EE.UU.). Posteriormente, en el mismo ambulatorio se aislaron neumococos resistentes del mismo serogrupo a partir de 6 portadores sanos. El examen electroforético del patrón de PBPs de estos aislados reveló un patrón idéntico al mostrado por los aislados de la Familia 6 procedentes de España. Mediante la aplicación de varias técnicas para caracterizar estos aislados se confirmó su identidad en múltiples aspectos epidemiológicos y fisiológicos. Estos resultados apoyan la posible utilización del patrón de PBPs como marcador epidemiológico en neumococos resistentes a penicilina.

Después de la aplicación de distintos métodos de caracterización en estos aislados, se puede considerar que el patrón de PBPs es un marcador adecuado para estudios epidemiológicos pues ha demostrado una alta correlación entre los resultados obtenidos por este procedimiento y los derivados

del análisis de isoenzimas, péptidos de pared celular, fragmentos de restricción de DNA cromosómico, etc.

Por otro lado, parece razonable asumir que los patrones de PBPs conservados en los aislados resistentes reflejan distintas vías mutacionales que conducen a la remodelación de las PBPs bajo determinadas condiciones selectivas. La asociación de patrón de PBPs con serogrupo, resistencia a antibióticos y lugar de aislamiento en los miembros de estas familias sugiere que puedan representar distintos clones. Sin embargo, es necesario señalar que un patrón de PBPs determinado no es específico de un serogrupo concreto, ya que aislados pertenecientes al mismo serogrupo pueden exhibir distintos patrones de PBPs, estando muy influido por el lugar de aislamiento del neumococo. Todo ello podría indicar que los neumococos resistentes a penicilina son poblaciones bacterianas consistentes en una serie de clones que han evolucionado independientemente.

### 5.5. ASOCIACION CLONAL ENTRE AISLADOS QUE COMPARTEN UN PATRON DE PBPs

El concepto de "clon" se formuló basado en la asociación existente entre algunos serotipos de *E.coli* y aislados enterotoxigénicos procedentes de diferentes lugares geográficos; posteriormente se han publicado muchos trabajos que acentúan la importancia del concepto de clon en conexión con distintas bacterias patógenas, la mayoría capsuladas. La asociación clonal entre aislados bacterianos se demuestra convincentemente cuando se dispone de una gran variedad de marcadores; sin embargo, todos los organismos, incluso en ausencia de presión selectiva, son en cierto grado inestables genéticamente ya que en cada generación acumulan gradualmente mutaciones, deleciones y adquisición de material genético nuevo. Por ello la clonalidad no puede ser nunca absolutamente segura y el grado de clonalidad exhibido por un grupo de organismos relacionados está asociado a la variable tiempo.

La variedad de caracteres, tanto fenotípicos como genéticos, utilizados para la caracterización de distintos aislados bacterianos, se ha visto favorecida por el desarrollo de diversas técnicas moleculares dotadas de un elevado grado de sensibilidad y especificidad, que pueden contribuir a determinar con mayor exactitud si varios organismos de diversa procedencia pertenecen a una misma población clonal.

La electroforesis de isoenzimas constituye una técnica muy útil para establecer relaciones cromosómicas entre aislados bacterianos. La aplicación de esta técnica a aislados de *E.coli* demostró que esta especie es muy variable; sin embargo sólo algunos de estos tipos electroforéticos se encuentran repetidamente en diferentes continentes y durante muchos años,

estimándose que el número actual de clones varía de 100 a 1.000 (Selander et al., 1.987). Una estructura de población clonal similar se ha descrito en otras especies bacterianas, entre las que se incluyen especies que poseen mecanismos naturales de transformación como *Haemophilus influenzae* (Musser et al., 1988) y *Neisseria meningitidis* (Caugant et al., 1988). Es de señalar la estabilidad de los clones individuales, de forma que sólo 7 clones han originado la mayoría de las epidemias de infección meningocócica de serogrupo A durante los últimos 70 años, y un 88% de los casos de *S. aureus* productores de síndrome tóxico han sido provocados por un único clon (Musser et al., 1990). Al realizar el análisis de isoenzimas en 16 aislados de *N.meningitidis* resistentes a penicilina procedentes de España y que presentaban un patrón común de PBPs, se demostró que representaban una población heterogénea con una gran diversidad genética, no habiéndose originado por tanto a partir de un único clon (Mendelman et al., 1989).

El estudio descrito en esta tesis representa la aplicación, por primera vez, de esta técnica a aislados clínicos de neumococos. Los resultados encontrados indican que los aislados incluidos en una familia de patrón de PBPs poseen un alto grado de identidad alélica, pudiendo ser considerados como miembros de un mismo clon. Sin embargo, es necesario señalar que el análisis de neumococos con características epidemiológicas variadas revela que esta especie es altamente variable, pudiéndose distinguir un elevado número de genotipos distintos (Musser, J.M., comunicación personal); por lo que el análisis de isoenzimas se puede considerar un marcador idóneo para neumococos ya que presenta una elevada discriminación.

Por otra parte se puede conseguir una mayor aproximación en la caracterización de un aislado determinado mediante el

análisis de DNA cromosómico con el empleo de endonucleasas de restricción (Owen, 1989). No obstante se debe señalar que aunque los patrones diferentes obtenidos después de una digestión reflejan diferencias a nivel molecular, no siempre puede asegurarse que aquellos otros que mediante una observación visual parecen idénticos respondan realmente a una identidad genética, debido a que existen pequeñas diferencias a nivel genético que no pueden ser detectadas mediante esta técnica; por lo que es necesario recurrir a procedimientos cuantitativos mediante la utilización de densitómetros. Esta técnica fué aplicada previamente a *S. pneumoniae* (Viering et al., 1989) y mediante la utilización de un densitómetro se encontraron diferencias significativas entre distintos serogrupos (sólo un 54% de similitud) y una identidad significativamente mayor entre los aislados incluidos en un serogrupo determinado (similitud del 75-98%). Aunque en el estudio descrito en esta tesis no se utilizó un densitómetro de gráficos, se obtuvieron unos patrones de restricción que indicaban la existencia de una alta identidad entre todos los aislados incluidos en la misma familia de patrón de PBPs; pudiéndose comprobar también la gran divergencia existente entre los aislados pertenecientes a distintos serogrupos.

Para el análisis de la diversidad genética de un loci determinado se ha descrito un método de alta resolución que ha sido aplicado con éxito a *N. meningitidis* (Zhang et al., 1990) y consiste en el análisis de los fragmentos obtenidos después de la digestión enzimática de una secuencia de DNA amplificado. El gen *penA* de un grupo de aislados resistentes a penicilina fué muy diverso, encontrándose 14 patrones distintos en 15 aislados estudiados; estos resultados eran concordantes con la diversidad genética encontrada en esta especie mediante el análisis de isoenzimas (Mendelman et al., 1989). Los resultados

descritos en esta tesis muestran la identidad de patrones de restricción en los genes de la PBP 2B y 2X de los aislados pertenecientes a la Familia 5 de PBPs, lo que indicaría que en todos ellos existe la misma alteración en los determinantes de resistencia a penicilina. Para obtener unos resultados más concluyentes sería necesario ampliar estos estudios a todos los miembros de las restantes familias de patrones de PBPs.

Por tanto, los neumococos examinados en este estudio y agrupados en "familias" en base a un perfil idéntico de PBPs, comparten además otros caracteres ya que pertenecen al mismo serotipo capsular, poseen un mismo genotipo de isoenzimas, una idéntica fragmentación del DNA cromosómico y de dos genes cromosómicos que contribuyen a la resistencia a penicilina (analizados en los aislados incluidos en la Familia 5). Todos estos datos parecen indicar que los neumococos resistentes a penicilina que poseen un patrón común de PBPs son miembros de un mismo clon debido a que comparten múltiples características epidemiológicas y fisiológicas.

El patrón uniforme de PBPs en estos clones sugeriría que las distintas variantes genéticas para PBPs pueden haber sido transmitidas "verticalmente" a través de los aislados diferentes de *S. pneumoniae* dando lugar a la relación "un clon-un patrón de PBPs"; por otro lado, se han encontrado evidencias de una transmisión "horizontal" de los genes de las PBPs en este organismo (Dowson et al., 1989). Por todo ello se puede suponer que la adquisición de genes para las PBPs puede haber ocurrido a través de una transmisión horizontal entre grupos de aislados genéticamente distintos o bien, a través de una transmisión lineal o vertical dentro de una línea clonal. Se ha descrito un fenómeno similar para la transmisión de fimbrias en *E. coli* (Johnson, 1991).

## **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1.- Entre los aislados clínicos estudiados existe una elevada incidencia de neumococos que presentan una reducción en la lisis provocada por penicilina (tolerancia), como se concluye de los resultados obtenidos ya que este fenómeno afecta a un 25% de los aislados sensibles y a un 55% de los aislados resistentes estudiados. De forma similar, se obtiene que un 46% de los aislados sensibles y un 88% de los aislados resistentes presentan una mayor supervivencia cuando son sometidos a penicilina. En la mayoría de los aislados existe una relación directa entre grado de lisis y pérdida de viabilidad.

Los resultados obtenidos también demuestran que tolerancia y resistencia a penicilina son caracteres separados, aunque la incidencia de ambos aparece asociada en un número elevado de aislados.

2.- Mediante el análisis de los serogrupos de neumococos que presentan distinto nivel de resistencia a penicilina se concluye que los aislados con un bajo nivel de resistencia a penicilina ("borderline") (CMI 0,015-0,06 $\mu$ g/ml) presentan una distribución de serogrupos similar a la del total de neumococos estudiados. Existe un nivel umbral de resistencia, próximo a 0,1 $\mu$ g/ml, por encima del cual la distribución de serogrupos experimenta un cambio brusco de manera que sólo un número muy limitado de serogrupos es capaz de alcanzar niveles superiores de resistencia.

De los experimentos realizados se concluye que el bajo nivel de resistencia a penicilina es una resistencia "real" que puede ser transmitida mediante transformación genética de un neumococo a otro e implica la alteración en la PBP 2A, uno de los sitios de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

3.- De los experimentos de transformación genética se concluye que la resistencia a penicilina se consigue de forma gradual. En el experimento descrito, se necesitaron dos ciclos de transformación para alcanzar el nivel de resistencia determinado por el donante de DNA. En el primer ciclo se consiguió un incremento 50 veces superior en el valor CMI de la cepa receptora; en el segundo ciclo el incremento alcanzado fué 20 veces superior. También se puede concluir que no se pueden obtener transformantes con un nivel de resistencia superior al determinado por el aislado donante de DNA.

Los resultados obtenidos demuestran que la mutación "hex" (sistema reparador de errores) en la cepa receptora aumenta la eficacia de la transformación; por el contrario, la presencia o ausencia de una autolisina activa no altera esta frecuencia.

4.- Mediante la observación del patrón de PBPs de los aislados estudiados se concluye que los neumococos sensibles a penicilina poseen un similar, casi idéntico, patrón de PBPs. Los neumococos resistentes a penicilina poseen patrones de PBPs distintos de los mostrados por los aislados sensibles, estando caracterizados por una disminución muy acusada en la capacidad de las PBPs para unir penicilina radiactiva.

En contraste con la uniformidad mostrada por los aislados sensibles, los patrones de PBPs exhibidos por los neumococos resistentes pueden diferir unos a otros, de forma que el 62% de los aislados resistentes a penicilina presentaron una gran diversidad de patrones.

5.- Los neumococos resistentes pueden ser agrupados en "familias" de aislados en función de su patrón común de PBPs. En este estudio se describe la existencia de seis familias de patrones de PBPs que agrupan al 38% de los aislados resistentes. Por primera vez se identifican grupos de aislados que comparten patrones de PBPs y muestran niveles intermedios de resistencia a penicilina.

Las características fundamentales de cada una de las familias descritas son:

- Familia 1, neumococos procedentes de Suráfrica, serogrupo 6, CMI 0,25 $\mu$ g/ml.
- Familia 2, neumococos procedentes de Alaska, serogrupo 6, CMI 0,25-0,5 $\mu$ g/ml
- Familia 3, neumococos procedentes de Suráfrica, serogrupo 6, CMI 0,12-0,25 $\mu$ g/ml
- Familia 4, neumococos procedentes de España, serogrupo 6, CMI 1-2 $\mu$ g/ml
- Familia 5, neumococos procedentes de España, serogrupo 23, CMI 1-2 $\mu$ g/ml
- Familia 6, neumococos procedentes de Hungría, serogrupo 19, CMI >1 $\mu$ g/ml

6.- En neumococos el patrón de PBPs es una característica estable y reproducible, como se deduce de los experimentos realizados al someter los aislados a distintos tratamientos.

El análisis del patrón común de PBPs observado en los distintos transformantes, permite concluir que este patrón está determinado por el fondo genético de la bacteria, siendo independiente del modelo de PBPs del aislado donante de DNA.

El patrón de PBPs, único y estable, reúne las características necesarias para su utilización con fines epidemiológicos, constituyendo un posible marcador adicional para neumococos resistentes a penicilina.

7.- Los neumococos resistentes a penicilina agrupados en una misma familia de patrón de PBPs comparten muchas características epidemiológicas y fisiológicas como se concluye de la aplicación de distintos métodos fenotípicos y genotípicos (análisis de los péptidos de pared celular, isoenzimas, DNA cromosómico, gen de la PBP 2B y 2X, etc.). También se demuestra que la discriminación obtenida mediante la aplicación de distintos métodos de caracterización coincide mayoritariamente con la descrita en base al patrón de PBPs.

8.- Los resultados obtenidos mediante los métodos de caracterización descritos permiten asegurar con un elevado grado de certeza que existe una relación clonal entre los miembros de las familias descritas según su patrón de PBPs.

Como conclusión final, todos los resultados obtenidos parecen indicar que el patrón de PBPs es un marcador epidemiológico adecuado para el estudio de aislados de neumococos resistentes a penicilina, por lo que su aplicación en el análisis de la evolución de los neumococos en el tiempo y en el espacio podría aportar una información de gran interés epidemiológico y con indudable valor para el clínico y el microbiólogo.

## **BIBLIOGRAFIA**

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Allphin, A.L., Schreiber, J.R., Arnold, J.E., Boxerbaum, B., Senders, S.D. y Jacobs, M. 1.990. Multiply-resistant *Streptococcus pneumoniae* causing chronic otitis media in a Cleveland day care center. *Ped. Res.*, 27 (Program Issue APS-SPR)
- Amanuma, H. y Strominger, J.L. 1.980. Purification and properties of penicillin-binding proteins 5 and 6 from *Escherichia coli* membranes. *J. Biol. Chem.*, 255: 11173-11180
- Appelbaum, P.C., Bhamjee, A., Scragg, J.N., Hallet, A.F., Bowen, A.J. y Cooper, R.C. 1.977. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet*, ii: 995-99
- Appelbaum, P.C. 1.987. World-wide development of antibiotic resistance in pneumococci. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 6: 367-377
- Armstrong, R.R. 1.931. A swift and simple method for deciding pneumococcal "type". *Br. Med. J.*, 1: 214-215
- Avery, O.T., McLeod, C.M. y McCarthy, M. 1.949. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.*, 79: 137-159
- Baddiley, J. 1.970. Structure, biosynthesis and function of teichoic acids. *Accounts Chem. Res.*, 3: 98-105
- Blumberg, P.M. y Strominger, J.L. 1.974. Interaction of penicillin with bacterial cells: penicillin binding proteins and penicillin sensitive enzymes. *Bact. Rev.*, 38: 291-335

- Bonner, W.M. y Laskey, R.A. 1.974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.*, 46: 83-88
- Bowers, E.F. y Jeffries, L.R. 1.955. Optochin for the identification of pneumococci. *J. Clin. Pathol.*, 8: 58-60
- Broome-Smith, J.K. y Spratt, B.G. 1.982. Deletion of the penicillin-binding protein 6 gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 152: 904-906
- Buu-Hoï, A.Y., Goldstein, F.W. y Acar, J.F. 1.988. A seventeen-year epidemiological survey of antimicrobial resistance in pneumococci in two hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22 (B): 41-52
- Casal, J. 1.982. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. Serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22: 222-225
- Casal, J. y Fenoll, A. 1.988. Neumococos. Resistencia y tolerancia en España. *Enf. Infec. Microbiol. Clin.*, 6: 333-336
- Caugant, D.A., Kristiansen, B.E., Froholm, L.O., Bovre, K. y Selander, R.K. 1.988. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect. Immun.*, 56: 2060-2068
- Cruz, M, Jimenez, M.T. y Mauri, E. 1.981. Resistencia a la penicilina del *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Pediat.*, 32: 15-18

- Chalkley, L.J. y Koornhof, H.J. 1.988. Penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae*. J. Antimicrob. Chemother., 22: 791-800
- Chalkley, L.J., Van den Berg, I.S. y Koornhof, H.J. 1.989. Penicillin-binding proteins of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from South Africa. S. Afri. Med. J., 85: 265-266
- Chandler, M.S. y Morrison, D.A. 1.987. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: molecular cloning of *com*, a competence control locus. J. Bacteriol., 169: 2005-2011
- Chien, A., Edgar, D.B. y Trela, J.M. 1.976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. J. Bacteriol., 127: 1550-1557
- Davie, J.M. y Brock, T.D. 1.966. Effect of teichoic acid on resistance to the membrane-lytic agent of *Streptococcus zymogenes*. J. Bacteriol., 92: 1623-1631
- Dhingra, R.K., Williams, R.C.Jr y Reed, W. P. 1.977. Effects of pneumococcal mucopeptide and capsular polysaccharide on phagocytosis. Infect. Immun., 15: 169
- Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J.-P., Dehottay, P, Dusart, J., Erpicum, T., Frère, J.M. y Ghuysen, J.-M. 1.987. The crystal structure of the  $\beta$ -lactamase of *Streptomyces albus* G at 0.3 nm resolution. Biochem. J., 245: 911-913
- Dougherty, T.J. 1.986. Genetic analysis and penicillin-binding protein alterations in *Neisseria gonorrhoeae* with chromosomally mediated resistance. Antimicrob. Agents Chemother., 30: 649-652

- Dowson, C.G., Hutchinson, A. y Spratt, B.G. 1.989a. Nucleotide sequence of the penicillin-binding protein 2B gene of *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Nucleic Acids Res.*, 17: 7518
- Dowson, C.G., Hutchinson, A. y Spratt, B.G. 1.989b. Extensive re-modelling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a penicillin-resistant South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 3: 95-102
- Dowson, C.G., Hutchinson, A., Brannigan, J.A., George, R.C., Hansman, D., Linares, J., Tomasz, A., Maynard Smith, J. y Spratt, B.G. 1.989c. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 8842-8846
- Dowson, C.G., Hutchinson, A., Woodford, N., Johnson, A.P., George, R.C. y Spratt, B.G. 1.990. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5858-5862
- Dubos, R.J. 1.976. Bacterial variability. En: *The Professor, The Institute and DNA*, pp. 125-138. Dubos, R.J. (Ed.), The Rockefeller University Press, New York
- Eisenstein, B.I. 1.990. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. *J. Infect. Dis.*, 161: 595-602

- Eriksen, K.R. 1.945. Studies on induced resistance to penicillin in a pneumococcus type I. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 22: 398-401
- Facklam, R.R. y Carey, R.B. 1.985. Streptococci and Aerococci. En: Manual of Clinical Microbiology, 4 Ed, pp. 154-175. Lennette, E.H. (Ed.), American Society for Microbiology, Washington
- Fairbanks, G., Steck, T.L. y Wallach, D.H.F. 1.971. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochem., 10: 2606-2617
- Farber, B.F., Eliopoulos, G.M., Ward, J.I., Ruoff, K.L., Syriopoulou, V. y Moellering, R.C., Jr. 1.983. Multiply resistant viridans streptococci: susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics and comparison of penicillin-binding protein patterns. Antimicrob. Agents Chemother., 24: 702-705
- Fenoll, A, Martín-Bourgon, C., Muñoz, R., Vicioso, D. y Casal, J. 1.991. Serotype distribution and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates producing systemic infections in Spain 1979-1989. Rev. Infect. Dis., 13: 56-60
- García-Bustos, J.F., Chait, B.T. y Tomasz, A. 1.987. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. J. Biol. Chem., 32: 15400-15405
- García-Bustos, J.F., Chait, B.T. y Tomasz, A. 1.988. Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. J. Bacteriol, 170: 2143-2147

- García-Bustos, J.F. y Tomasz, A. 1.990. A biological price of antibiotic resistance: major changes in the peptidoglycan structure of penicillin-resistant pneumococci. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 5415-5419
- Georgopapadakou, N.H. y Liu, F.Y. 1.980. Binding of  $\beta$ -lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. Antimicrob. Agents Chemother., 18: 834-836
- Ghuysen, J.-M. 1.988. Bacterial active-site serine penicillin-interactive proteins and domains: mechanism, structure and evolution. Rev. Infect. Dis., 10: 726-732
- Gray, B.M., Converse, G.M. y Dillon, H.C., Jr. 1.980. Epidemiologic studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 months of life. J. Infect. Dis., 142: 923-933
- Gunnison, J.B., Fraher, M.A., Pelcher, E.A. y Jawetz, E. 1.968. Penicillin-resistant variants of pneumococci. Appl. Microbiol., 16: 311-314
- Gutmann, L., Bouvet, A. y Acar, J.F. 1.982. Penicillin-binding proteins of nutritionally variant streptococci. FEMS Microbiol. Lett., 14: 11-14
- Hager, H.L., Wooley, T.W. y Berk, S.L. 1.990. Review of recent pneumococcal infections with attention to vaccine and nonvaccine serotypes. Rev. Infect. Dis., 12: 267-272
- Hakenbeck, R., Tarpay, M. y Tomasz, A. 1.980. Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother., 17: 364-371

- Hakenbeck, R. y Kohiyama, M. 1.982. Purification of penicillin-binding protein 3 from *Streptococcus pneumoniae*. Eur. J. Biochem., 127: 231-236
- Hakenbeck, R., Ellerbrok, H., Briese, T., Handwerger, S. y Tomasz, A. 1.986. Penicillin-binding proteins of penicillin susceptible and -resistant pneumococci: immunological relatedness of altered proteins and changes in peptides carrying the  $\beta$ -lactam binding site. Antimicrob. Agents Chemother., 30: 553-558
- Hakenbeck, R., Tornette, S. y Adkinson, N.F. 1.987. Interaction of non-lytic  $\beta$ -lactams with penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae*. J. Gen. Microbiol., 133: 755-760
- Hancock, W.S. y Sparrow, J.T. 1.986. HPLC Analysis of Biological Compounds. A Laboratory guide. Marcel Dekker, New York
- Handwerger, S. y Tomasz, A. 1.986a. Alterations in penicillin-binding proteins of clinical and laboratory isolates of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* with low levels of penicillin resistance. J. Infect. Dis., 153: 83-89
- Handwerger, S y Tomasz, A. 1.986b. Alterations in kinetic properties of penicillin-binding proteins of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother., 30: 57-63
- Hansman, D. y Bullen, M.M. 1.967. A resistant pneumococcus. Lancet, ii: 264-265
- Hansman, D., Glasgow, H., Sturt, J., Devitt, L y Douglas, R. 1.971. Increased resistance to penicillin of pneumococci isolated from man. New England J. Med., 284: 175-177

- Hedge, P.J. y Spratt, B.G. 1.985. Aminoacid substitutions that reduce the affinity of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* for cephalixin. *Eur. J. Biochem.*, 151: 111-121
- Herzberg, O. y Moulton, J. 1.987. Bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics crystal structure of  $\beta$ -lactamase from *Staphylococcus aureus* PC1 at 2.5A resolution. *Science*, 236: 694-701
- Jabes, D., Nachman, S. y Tomasz, A. 1.989. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J. Infect. Dis.*, 159: 16-25
- Jennings, H.J. 1.990. Capsular polysaccharides as vaccine candidates. En: *Bacterial capsules. Current topics in Microbiology and Immunology*, vol 150, pp. 97-127. Jann, K. y Jann, B. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin
- Johnson, J.R. 1.991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.*, 4: 80-128
- Jones, N.R. 1.988. Standards and advisory activities: NCCLS Supplement (M7-A-S2). *Antimicrob. Newsletter*, 5: 14-15
- Jones, W.F y Finland, M. 1.957. Susceptibility of pneumococci to eleven antibiotics in vitro. *Am. J. Med. Sci.*, 233: 312-319
- Joris, B., Ghuysen, J.-M., Dive, G., Renard, A., Dideberg, O., Charlier, P., Frère, J.-M., Kelly, J.A., Boyington, J.C., Moews, P. y Knox, B.J. 1.988. The active-site-serine penicillin-recognizing enzymes as members of the *Streptomyces* R61 DD-peptidase family. *Biochem. J.*, 250: 313-324

- Kauffmann, F y Lund, E. 1.954. Memorandum on the nomenclature of the pneumococcus group. Int. Bull. Bact. Nomencl., 4: 125-128
- Kelly, J.A., Knox, J.R., Zhao, H., Frère, J.-M. y Ghuysen, J.-M. 1.988. Crystallographic mapping of  $\beta$ -lactams bound to a D-alanyl-D-alanine peptidase target enzyme. J. Mol. Biol., 209: 281-295
- Kent, J.L., Roger, M. y Hotchkiss, R.D. 1.963. On the role of integrity of DNA particles in genetic recombination during pneumococcal transformation. Proc. Natl. Acad. Sci., 50: 717-725
- Kislak, J.M., Razabi, L.H.B. y Daly, A. K. 1.965. Susceptibility of pneumococci to nine antibiotics. Am. J. Med. Sci., 250: 261-268
- Klugman, K.P. 1.990. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin. Microbiol. Rev., 3: 171-196
- Krstulovic, A.M. y Brown, P.R. 1.982. Reversed-phase high performance liquid chromatography. John Wiley & Sons, New York
- Kunin, C.M., Johansen, K.S., Worning, A.M. y Daschner, F.D. 1.990. Report of a Symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. Rev. Infect. Dis., 12: 12-19
- Lacks, S. y Hotchkiss, R.D. 1.960. A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococci. Biochem. Biophys. Acta, 39: 508-517
- Lacks, S. 1.970. Mutants of *Diplococcus pneumoniae* that lack deoxyribonucleases and other activities pertinent to genetic transformation. J. Bacteriol., 101: 373-383

- Laeemli, U.K. y Favre, M. 1.973. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA-packing events. *J. Mol. Biol.*, 80: 575-599
- Laible, G. y Hakenbeck, R. 1.987. Penicillin-binding proteins in  $\beta$ -lactam-resistant laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 1: 355-363
- Laible, G., Hakenbeck, R., Sicard, M.A., Joris, B. y Ghuysen, J.-H. 1.989. Nucleotide sequences of the pbp X genes encoding the penicillin-binding proteins 2X from *Streptococcus pneumoniae* R6 and a cefotaxime-resistant mutant, C 506. *Mol. Microbiol.*, 3: 1337-1348
- Laskey, R.A. y Mills, A.D. 1.975. Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.*, 56: 335-341
- Latorre, C., Juncosa, T. y Sanfeliú, I. 1.985. Antibiotic resistance and serotypes of 100 *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in a Children's Hospital in Barcelona, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 28: 357-359
- Latorre, C., Juncosa, T. y Sanfeliú, I. 1.988. Antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates from paediatric patients. *J. Antimicrob. Chemother.*, 22: 659-665
- Liñares, J., Garau, J., Dominguez, C y Pérez, J.L. 1.983. Antibiotic resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from patients with community-acquired pneumococcal disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23: 545-547
- Liu, H.H. y Tomasz, A. 1.985. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.*, 152: 365-372

- Markiewicz, Z. y Tomasz, A. 1.989. Variation in penicillin-binding protein pattern of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 405-410
- Marton, A., Gulyas, M., Muñoz, R. y Tomasz, A. 1.991. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary. *J. Infect. Dis.*, 163: 542-548
- Matsushashi, M., Nakagawa, J., Tomioka, S., Ishino, F. y Tamaki, S. 1.982. Mechanism of peptidoglycan synthesis by penicillin-binding proteins in bacteria and effects of antibiotics. En: *Drug resistance in Bacteria. Genetics, Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 297-310. Mitsushashi, S. (Ed.), Japan Scientific Societies Press, Tokio
- Maynard Smith, J., Dowson, C. y Spratt, B.G. 1.991. Localized sex in bacteria. *Nature*, 349: 29-31
- McDowell, T.D. y Reed, K.E. 1.989. Mechanism of penicillin killing in the absence of bacterial lysis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 33: 1680-1685
- McKee, C.M. y Houck, C.L. 1.943. Induced resistance to penicillin of cultures of staphylococci, pneumococci and streptococci. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 53: 33-34
- McLeod, C.M. y Krauss, M.R. 1.947. Stepwise intratype transformation of pneumococcus from R to S by way of a variant intermediate in capsular polysaccharide production. *J. Exp. Med.*, 86: 439-453

- Mendelman, P.M., Caugant, D.A., Kalaitzoglou, G., Wedege, E., Chaffin, D.O., Campos, J., Sáez-Nieto, J.A., Viñas, M. y Selander, R.K. 1.989. Genetic diversity of penicillin G-resistant *Neisseria meningitidis* from Spain. *Infect. Immun.*, 57: 1025-1029
- Moreillon, P. y Tomasz, A. 1.988. Penicillin resistance and defective lysis in clinical isolates of pneumococci: evidence for two kinds of antibiotic pressure operating in the clinical environment. *J. Infect. Dis.*, 157: 1150-1157
- Moreillon, P., Markiewicz, Z., Nachman, S. y Tomasz, A. 1.990. Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis-independent killing mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 33-39
- Morrison, D.A., Lacks, S.A., Guild, W.R. y Hageman, J.M. 1.983. Isolation and characterization of three new classes of transformation-deficient mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are defective in DNA transport and genetic recombination. *J. Bacteriol.*, 156: 281-290
- Morrison, D.A. 1.990. Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: molecular analysis. En: *Genetic transformation and Expression*, pp. 3-11. Butler, L.O., Harwood, C. y Moseley, B.E.B. (Eds.), Intercept/VCH, Andover
- Mosser, J.L. y Tomasz, A. 1.975. Choline-containing teichoic acid as a structural component of pneumococcal cell wall and its role in sensitivity to lysis by an autolytic enzyme. *J. Biol. Chem.*, 245: 287-298

- Muñoz, R., Martín-Bourgon, C. y Casal, J. 1.988. Analysis of protein antigens as a potential marker for *Streptococcus pneumoniae*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 7: 297-300
- Muñoz, R., Fenoll, A., Vicioso, D. y Casal, J. 1.990. Optochin-resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 13: 63-66
- Musser, J.M., Kroll, J.S., Moxon, E.R. y Selander, R.K. 1.988. Clonal population structure of encapsulated *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun., 56: 1837-1845
- Musser, J.M., Schlievert, P.M., Chow, A.W., Ewan, P., Kreiswirth, B.N., Rosdahl, V.T., Satynarayan, A., Witte, W. y Selander, R.K. 1.990. A single clone of *Staphylococcus aureus* causes the majority of cases of toxic shock syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 225-229
- Ørskov, F y Ørskov, I. 1.983. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the *Enterobacteriaceae* and other bacteria. J. Infect. Dis., 148: 346-357
- Owen, R.J. 1.989. Chromosomal DNA fingerprinting -a new method of species and strain identification applicable to microbial pathogens. J. Med. Microbiol., 30: 89-99
- Pease, A.A., Douglas, C.W.I. y Spencer, R.C. 1.986. Identifying non-capsule strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from eyes. J. Clin. Pathol., 39: 871-875
- Percherson, P.B. y Bryan, L.E. 1.980. Penicillin-binding components of penicillin-susceptible and -resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 18: 390-396

- Pérez, J.L., Liñares, J., Bosch, J., López de Goicoechea, P y Martín, R. 1.987. Antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* in childhood carriers. *J. Antimicrob. Chemother.*, 19: 278-280
- Reeves, R.E. y Goebel, W.F. 1.941. Chemoimmunological studies on the soluble specific substrate of pneumococcus. V. The structure of the type III polysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 139: 511-519
- Ripley-Petzoldt, M.L., Giebink, G.S., Juhn, S.K., Aeppli, D., Tomasz, A. y Tuomanen, E. 1.988. The contribution of pneumococcal cell wall to the pathogenesis of experimental otitis media. I. *Infect. Dis.*, 157: 245-255
- Ronda, C., López, R., Tapia, A. y Tomasz, A. 1.977. Role of the pneumococcal autolysin (murein hydrolase) in the release of progeny bacteriophage and in the bacteriophage-induced lysis of the host cells. *J. Virol.*, 21: 366-374
- Rotta, J. 1.986. Pyogenic Hemolytic Streptococci. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9 Ed. Vol. 2, pp. 1047-1054. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. (Eds.), Williams & Wilkins, Baltimore
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1.989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 Ed. Nolan, C. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Schuster, C., Dobrinsk, B. y Hakenbeck, R. 1.990. Unusual septum formation in *Streptococcus pneumoniae* mutants with an alteration in the D,D-carboxypeptidase penicillin-binding protein 3. *J. Bacteriol.*, 172: 6499-6505

- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N. y Whittam, T.S. 1.986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *App. Envirom. Microbiol.*, 51: 873-884
- Selander, R.K., Caugant, D.A. y Whittam, T.S. 1.987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, pp. 1625-1648. Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington
- Shockley, T.E. y Hotchkiss, R.D. 1.970. Stepwise introduction of transformable penicillin resistance in pneumococcus. *Genetics*, 64: 397-408
- Spratt, B.G. 1.975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation and shape of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72: 2999-3003
- Spratt, B.G. 1.977. Properties of the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* k12. *Eur. J. Biochem.*, 72: 341-352
- Spratt, B.G. 1.980a. Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Phil. Trans. Royal Soc.*, B289: 273-283
- Spratt, B.G. 1.980b. Deletion of the penicillin-binding protein 5 gene of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.*, 14: 1190-1192
- Spratt, B.G. 1.988. Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Nature*, 332: 173-176

- Spratt, B.G. 1.989. Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. En: Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 91 Microbial resistance to Drugs, pp. 77-100. Bryan, L.E. (Ed.), Springer-Verlag, Berlin
- Spratt, B.G. y Strominger, J.L. 1.976. Identification of the major penicillin binding proteins of *Escherichia coli* as D-Alanine carboxypeptidase. J. Bacteriol., 127: 660-663
- Spratt, B.G., Zhang, Q.-Y., Jones, D.M., Hutchinson, A., Brannigan, J.A. y Dowson, C.G. 1.989. Recruitment of a penicillin-binding protein gene from *Neisseria flavescens* during the emergence of penicillin resistance in *Neisseria meningitidis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 8988-8992
- Tipper, D.J. y Strominger, J.L. 1.965. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to Acyl-D-Alanyl-D-Alanine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54: 75-81
- Tipper, D.J. y Wright, A. 1.979. The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. En: The bacteria -a treasure on structure and function, Vol 7. Mechanisms of adaptation. pp 291-496. Sokatch, G.R. y Ornston, L.N. (Eds.), Academic Press, London
- Tiraby, J.-G. y Fox, M.S. 1.974. Marker discrimination and mutagen-induced alterations in pneumococcal transformation. Genetics, 77: 449-458
- Tomasz, A y Hotchkiss, R.D. 1.964. Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 51: 480-487

- Tomasz, A. 1.966. Model for the mechanism controlling the expression of competent state in pneumococcus cultures. *J. Bacteriol.*, 91: 1050-1061
- Tomasz, A. 1.967. Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in pneumococcus. *Science*, 157: 694-697
- Tomasz, A. 1.968. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 59: 86-93
- Tomasz, A. 1.971. Cell physiological aspects of DNA uptake during genetic transformation in bacteria. En: *Informative molecules in biological systems*. pp. 4-18. Ledoux, L. (Ed.), North-Holland Publishing, Amsterdam
- Tomasz, A. 1.981. Surface components of *Streptococcus pneumoniae*. *Rew. Infect. Dis.*, 3: 190-211
- Tomasz, A. 1.982. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Ann. Inter. Med.*, 96: 502-504
- Tomasz, A y Holtje, J.V. 1.977. Murein hydrolases and the lytic action of penicillin. En: *Microbiolgy*. pp. 209-215. Schlessinger, D. (Ed.), American Society for Microbiology, Washington
- Tomasz, A., Moreillon, P. y Pozzi, G. 1.988. Insertional Inactivation of the major autolysin gene of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, 170: 5931-5934
- Tomasz, A. y Saukkonen, K. 1.989. The nature of cell wall-derived inflammatory components of pneumococci. *Ped. Infect. Dis. J.*, 8: 902-903

- Verhaegen, J., Glupczynski, Y., Verbist, L., Blogie, M., Vandeven, J., Yourassowsky, E. and Vandepitte, J. 1.990. Capsular types and antibiotic sensitivity of pneumococcus isolated from patients with serious infections in Belgium 1980 to 1988. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9: 390-395
- Viering, T.P. y Fine, D.P. 1.989. Genetic analysis of *Streptococcus pneumoniae* serotypes with the use of DNA fingerprinting. *J. Infect. Dis.*, 160: 76-82
- Waltman, W.D., McDaniel, L.S., Andersson, B., Bland, L., Gray, B.M., Suanborg, C. y Briles, D.E. 1.988. Protein serotyping of *Streptococcus pneumoniae* based on reactivity to six monoclonal antibodies. *Microb. Path.*, 5: 159-167
- Waltman, W.D., McDaniel, L.S., Gray, B.M. y Briles, D.E. 1.990. Variation in the molecular weight of Psp A (pneumococcal surface protein A) among *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Path.*, 8: 61-69
- White, T.J., Arnheim, N. y Erlich, H.A. 1.989. The polymerase chain reaction. *Trends Genet.*, 5: 185-189
- Williamson, R., Hakenbeck, R. y Tomasz, A. 1.980. The penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* grown under lysis-permissive and lysis-protective (tolerant) conditions. *FEMS Microbiol. Lett.*, 7: 127-131
- Williamson, R y Tomasz, A. 1.985. Inhibition of cell wall synthesis and acylation of the penicillin binding proteins during prolonged exposure of growing *Streptococcus pneumoniae* to benzylpenicillin. *Eur. J. Biochem.*, 151: 475-483

- Williamson, R., Gutmann, L., Horaud, T., Delbos, F. y Acar, J.F. 1.986. Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. *J. Gen. Microbiol.*, 132: 1929-1937
- Winkelstein, J.A. y Tomasz, A. 1.978. Activation of the alternative pathway of complement by pneumococcal cell wall teichoic acid. *J. Immun.*, 120: 174-178
- Zhang, Q.-Y., Jones, D.M., Sáez-Nieto, J.A., Pérez Trallero, E. y Spratt, B.G. 1.990. Genetic diversity of penicillin-binding protein 2 genes of penicillin resistant strains of *Neisseria meningitidis* revealed by fingerprinting of amplified DNA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34: 1523-1528
- Zighelboim, S y Tomasz, A. 1.980. Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic-resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17: 434-442.