

00361 35
71.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

VARIACION EN LOS PATRONES
ELECTROFORETICOS DE LAS PROTEINAS
LIGADORAS DE PENICILINA (PLPs) EN CEPAS
DE *Streptococcus pneumoniae* DE AISLAMIENTOS
CLINICOS

T E S I S
Que para Obtener el Grado Académico de
MAESTRA EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P r e s e n t a:
MARIA ELENA VELAZQUEZ MEZA

Directora de Tesis:
M. en B., IRMA GABRIELA ECHANIZ AVILES

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a la M. en C. Irma Gabriela Echániz Avilés, por la oportunidad y el apoyo brindado durante la realización del presente trabajo. Así como por su dirección y asesoramiento.

A mis amigas Araceli Soto y Noemi Carnalla, quiénes durante todo este tiempo han estado a mi lado, brindandome su amistad, compañerismo y apoyo.

Para Alejandro Camarena Alarcón, por la ayuda desinteresada que siempre me ha dado; quién con la calidad de su trabajo fotográfico realza los resultados del presente estudio.

A los Drs. Rene de Jesús Cardenas Vazquez, Carlos Jesús Conde González, Luis Felipe Jiménez García, Jesús Silva Sánchez, José Edgardo Escamilla Marvan y Luisa Alvarina Alba lois; por lo comentarios hechos al presente trabajo.

IN MEMORIA 1992
A mi Padre: Manuel Velazquez Vivas

Es difícil aceptar que no estas aqui conmigo para ver realizado nuestro sueño, el mio, hacer la maestría y el tuyo verme subir un peldaño más de esa escalera de la que siempre me hablabas. En el fondo tenía miedo de que llegara este momento y no estuvieras junto a mi, pero por otro lado, no podía faltar a la promesa que un día te hice. Porque te fuistes estando siempre muy orgulloso de mi, donde quiera que te encuentres quiero que lo sigas estando. Porque siempre viviras en mi mente y en mi corazón, este trabajo te lo dedico como muestra de mi eterno agradecimiento por el apoyo, esfuerzo y dedicación que siempre me distes.

A mi madre: Maximina Meza Martínez
Cuyo apoyo, comprensión y cariño,
me han alentado siempre para seguir adelante.

A mi sobrina Sammy, con amor.
Por que representas el pequeño gran motivo
que me impulsa cada día a lograr nuevas metas.

Con cariño y gratitud a mis hermanos
Miguel y Manuel.

**A Paty Trujillo: por su amistad de muchos años,
su ayuda incondicional en los momentos difíciles,
pero sobre todo, por los gratos momentos compartidos.**

**Con estimación profunda a mis amigos:
José Juan, Noe, Alejandro, Laura, Jorge,
Zita, Mario, Norma, Ruben y Don Pifas.**

**A mis compañeros y amigos de la maestría:
Paty, Isela, Martha, Daniel, Rolando, Aquiles,
Cesar y Fernando.**

**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN:
EL INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS
DIRECCION DE MICROBIOLOGIA MEDICA
DEPARTAMENTO DE DIAGNOSTICO EPIDEMIOLOGICO**

CONTENIDO

	Pág.
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCION	4
III. OBJETIVOS	12
IV. HIPOTESIS	13
V. METODOLOGIA	14
VI. RESULTADOS	16
VII. DISCUSION	40
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. LITERATURA CITADA	46
X. ANEXO I	53
XI. ANEXO II	63

RESUMEN

Streptococcus pneumoniae persiste como una de las principales causas de enfermedades infecciosas, cuyas manifestaciones clínicas requieren la hospitalización del paciente. Recientemente el tratamiento de estos padecimientos se ha visto obstaculizado debido al desarrollo de cepas resistentes y multiresistentes a diversos antimicrobianos. La resistencia en ***S. pneumoniae*** está mediada por cambios en la afinidad de enzimas conocidas como proteínas ligadoras de penicilina (PLPs), las cuales catalizan la síntesis de mureína en la pared celular.

En el presente trabajo se estudió un total de 17 cepas sensibles a penicilina, 22 resistentes y 13 con resistencia intermedia aisladas de procesos netamente invasivos ; así como un grupo de cepas aisladas de niños sanos. Los lisados bacterianos fueron marcados con penicilina tritiada y procesados por electroforesis en geles de poliacrilamida -SDS, seguido de la técnica de fluorografía con salicilato de sodio; utilizando como controles una cepa sensible (CMI 0.06 ug/ml) y una cepa control resistente (CMI 2.5-5 ug/ml).

Los resultados obtenidos demostraron que las cepas resistentes presentaron cambios electroforéticos en las proteínas 1a,2a y 2b, la afinidad de éstas PLPs a la penicilina se vió disminuida en las cepas resistentes a 2 ug/ml ; en las cepas con concentración mínima inhibitoria (CMI) de 4 ug/ml se observaron alteraciones en la movilidad electroforética de estas proteínas acompañadas con la disminución en la afinidad de unión PLP-penicilina. En las cepas resistentes a 8 ug/ml se detectaron alteraciones en las PLPs 2a y 2b.

Con respecto a los aislamientos intermedios se visualizaron tres patrones diferentes. Los resultados de las cepas de niños sanos mostraron perfiles más homogéneos tanto en movilidad electroforética, como en intensidad de las bandas cuando se compararon con los fluorogramas de cepas invasoras.

El estudio de los perfiles electroforéticos de estas proteínas permite agrupar a las cepas por familias, utilizándolas de esta forma como marcadores epidemiológicos, conocimiento indispensable para estudiar los factores que contribuyen a la selección, diseminación y prevalencia de las cepas resistentes de *S. pneumoniae*.

INTRODUCCION

Streptococcus pneumoniae (neumococo) es una bacteria Gram positiva de forma lanceolada que se encuentra agrupada en pares o cadenas cortas. No presenta movilidad y no forma esporas, son microorganismos anaerobios facultativos y en algunas ocasiones requieren para su desarrollo la presencia de bióxido de carbono (1). ***S. pneumoniae*** posee una estructura capsular constituida de polisacáridos, los cuales son antigénicos y son la base de un sistema de tipificación por medio del cual se han identificado 90 serotipos diferentes de acuerdo al sistema de clasificación danés, el cual combina las relaciones estrechas de polisacáridos capsulares en tipos y grupos (2,3).

En la actualidad ***S. pneumoniae*** persiste como una de las principales causas de morbi-mortalidad en niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años de edad. Es causante de severos cuadros clínicos como neumonía, septicemia y meningitis que en ocasiones , surgen como consecuencia de infecciones en el aparato respiratorio superior y cuyas manifestaciones clínicas requieren de la hospitalización del paciente (4,5).

Actualmente en países desarrollados, la incidencia anual de neumonías causadas por neumococos es de 5.9 millones de casos en menores de 5 años, 4.5 millones de casos en niños de 5-14 años, 9.3 millones de casos en el grupo de 15-59 años y 4.8 millones de casos en personas de más de 60 años (6).

En América Latina y el Caribe, la neumonía ocupa el séptimo lugar por morbilidad y el segundo lugar por mortalidad entre las enfermedades transmisibles. En México las defunciones por neumonía e influenza pasaron del sexto lugar en 1990, con una tasa de mortalidad (TM) de 27.3, al octavo lugar en 1995, con una TM de 21.5 por 100,000 habitantes. Por grupos de edad los más afectados son los menores de 1 año con una tasa media de mortalidad de 238.4. *S. pneumoniae* es causante del 30 al 45 % de los casos de neumonías en niños menores de 5 años y ancianos mayores de 60 años (7, 8). Recientemente el tratamiento de estos padecimientos se ha obstaculizado debido al desarrollo de cepas resistentes a diversos antimicrobianos.

La historia de la resistencia neumocócica a agentes antimicrobianos se inicia a principios del siglo XX con el uso de la optoquina como tratamiento de infecciones neumocócicas (9). La resistencia clínica de *S. pneumoniae* a penicilina fue reportada por primera vez en Boston, E.U. en 1965 (10). A partir de entonces cepas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) ≥ 2 ug/ml de penicilina, se han reportado en casi todo el mundo (11).

La susceptibilidad a penicilina de neumococo permaneció uniformemente constante durante las dos primeras décadas desde la introducción del antibiótico, (CMI 0.005-0.001 ug/ml). Sin embargo, después de este período de latencia y particularmente durante los 80's los aislamientos de neumococos con fenotipos resistentes a penicilina comenzaron a ser reportados con mayor frecuencia en muchas partes del mundo (12).

En Sudáfrica la resistencia a penicilina se observó en 4.9 % en 1979 y se elevó a 14.4 % en 1990 (13,14). Algunos cambios en la resistencia de *S. pneumoniae* fueron notados en Francia durante la década de los 80's (15). En otros continentes la incidencia de bacterias resistentes aisladas de muestras clínicas surge con niveles extremadamente altos (50-70 % en España y Hungría) (16). En nuestro país, uno de los primeros trabajos encaminados a la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de *S. pneumoniae* invasor fue realizado en el Instituto Nacional de Salud Pública, encontrándose que de un total de 220 cepas analizadas, 22.2% fueron resistentes a penicilina (CMI 2 ug/ml) (17).

Una de las observaciones más interesantes, es el hecho de que en todo el mundo tanto en adultos como en niños, los serotipos 6, 14, 19 y 23 son los serotipos dominantes en resistencia a penicilina (18).

Los resultados de un trabajo realizado en México para conocer la distribución de serotipos, demuestran que el tipo 23F es el más frecuente (24%), seguido por los tipos 6A+B, 14 y 19A; y estos cuatro serotipos constituyen el 55.8% de el total de los aislamientos (19).

El mecanismo responsable de la resistencia a la penicilina es la alteración de las proteínas ligadoras de penicilina (PLPs), las cuales están presentes en todas las bacterias, pero éstas varían de una especie a otra en número, tamaño, cantidad y afinidad por los antibióticos beta lactámicos (20). Estas proteínas están localizadas normalmente en la cara externa de la membrana citoplasmática y están ancladas a través de secuencias hidrofóbicas. Las principales actividades enzimáticas asociadas con las PLPs son la

peptidoglican transpeptidasa y la D-D carboxipeptidasa, cuya función es indispensable para la célula. La inhibición de estas proteínas puede causar lisis celular, muerte o retraso en el crecimiento (21,22).

Existen varios mecanismos de resistencia bacteriana para los antibióticos beta lactámicos, al menos tres mecanismos han sido identificados (23):

1. Inhibición enzimática. Las enzimas que confieren resistencia a los antibióticos beta lactámicos activos son llamadas a menudo beta lactamasas. Estas enzimas modifican la estructura del antibiótico de tal modo que pierden su actividad para unirse a los sitios blanco como las PLPs (24).

2. Alteración del sitio blanco. En la biosíntesis de la pared celular, las PLPs juegan una función importante en la síntesis del peptidoglicano, mediante reacciones de transpeptidación y transglicosilación. Mutaciones en estas proteínas hacen que disminuyan su afinidad por los B-lactámicos (25).

3. Cambios en la permeabilidad de la membrana. Sólo las bacterias Gram negativas presentan porinas en su membrana externa, las cuales se encuentran codificadas por el cromosoma. La permeabilidad por porinas es directamente afectada por el tamaño, carga, número y naturaleza hidrofóbica tanto del antibiótico como de las propias porinas (26).

En el caso particular de *S. pneumoniae* la resistencia a penicilina está mediada por cambios en la afinidad o en el porcentaje de acilación de las proteínas ligadoras de penicilina. Estas proteínas son enzimas que catalizan los estados terminales de la síntesis de mureína en la pared celular de la

bacteria (9). Estas proteínas son capaces de formar enlaces covalentes con la penicilina, la cual, una vez ligada a las PLPs neumocócicas, es degradada para producir ácido peniciloico (27). Las PLPs presentan dos regiones, la primera es el sitio activo donde se localiza el residuo de serina involucrado en la transpeptidación, mientras que el segundo dominio, es responsable de catalizar el crecimiento de las cadenas de glicano (transglicosilación) (28).

Debido a la capacidad enzimática de las PLPs para formar un complejo peniciloico covalente, las huellas de las PLPs pueden ser visualizadas fácilmente después de la incubación con penicilina radioactiva, en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio y fluorografía.

S. pneumoniae contiene seis PLPs, cinco de ellas con pesos moleculares altos: 1a, 92-100 kilodaltones (kDa); 1b, 89-95 kDa; 2a, 80-81 kDa; 2x, 85 kDa. 2b, 77-78 kDa, estas proteínas están involucradas en la resistencia a penicilina y otros antibióticos beta lactámicos. La PLP 3 de bajo peso molecular no participa en la resistencia a penicilina, sin embargo esta proteína tiene una actividad de D-D carboxipeptidasa "in vitro" y tiene un papel importante en la división de la célula, probablemente como consecuencia directa de su papel en el mantenimiento del peptidoglicano.

Se ha observado que los niveles reducidos de la PLP 3 disminuye la resistencia a cefotaxima. Se han propuesto algunas explicaciones para el papel de la PLP 3: 1) La cefotaxima puede ser secuestrada por la PLP3, para que el blanco mayor, la PLP 2x, pueda ser menos inhibida cuando la PLP 3 está presente en cantidades normales. 2) Puede haber una interacción entre la PLP 3 y la PLP 2x. Cuando la PLP 2x se modifica, la concentración de la PLP 3 disminuye. La reducción de la PLP 3 puede disminuir la resistencia a

cefotaxima. 3). La PLP 3 probablemente influya el grado de entrecruzamiento en la capa del peptidoglicano y esto puede modificar la arquitectura de la pared celular. Esto puede amplificar el efecto de las mutaciones de la PLP 2x porque la pared celular es la estructura donde las PLPs actúan, y una modificación de este ambiente puede modificar su actividad. (29).

El desarrollo de resistencia a penicilina se da como resultado de alteraciones en los genes que codifican para estas PLPs. En cepas neumocócicas que son susceptibles a penicilina, estas proteínas de la pared celular son altamente conservadas. En cepas con niveles altos de resistencia, la afinidad de cada una de las cinco PLPs por la penicilina es reducida (30). Las PLPs tienen afinidad por penicilina y en contraste, afinidad por sus sustratos peptídicos naturales usados en la biosíntesis de mureína. Mientras la afinidad de las PLPs por penicilina en cepas resistentes es reducida, su afinidad por el sustrato natural u otro sustrato no está alterada y permite la síntesis de mureína. Hay evidencias recientes que las PLPs de cepas resistentes cambian su afinidad por su sustrato peptídico endógeno (31).

En cepas neumocócicas que son altamente resistentes a penicilina, los genes que codifican para las PLPs 2b y 2x difieren ampliamente de las cepas susceptibles (32). Basados en los datos de secuenciación de estos genes se demostró que tienen una estructura de mosaico, constituida por regiones que son casi idénticas a las de las cepas sensibles a penicilina alternando con regiones que son altamente divergentes. Las estructuras de mosaico fueron primero demostradas en el gene que codifica para la PLP 2b y han sido subsecuentemente descritas en los genes 2X y 1A de diferentes aislamientos resistentes. Estos tres genes contribuyen a incrementar la resistencia a beta-

lactámicos iniciando con el gen 2X como responsable del primer nivel de resistencia (33) .

Se ha propuesto que estas regiones divergentes, pueden generarse por mutación o en muchas ocasiones pueden darse por eventos de recombinación entre especies. Los segmentos de las PLPs de los genes estructurales de neumococos susceptibles, pueden ser reemplazados con regiones correspondientes, derivadas de los genes de especies de estreptococos relacionados que cambian la estructura de las PLPs. Basados en la premisa de que las especies de estreptococos intercambian DNA "in vivo", el gen de la PLP 2b de dos cepas resistentes de *Streptococcus sanguis* fue encontrado idéntico en secuencia con el gen de la PLP 2b encontrado en cepas resistentes de *S. pneumoniae*. La presencia de resistencia a penicilina parece haber ocurrido en parte, por la transferencia horizontal de una alteración en el gen 2B de una cepa de *S. pneumoniae* resistente a penicilina hacia una cepa de *S. sanguis* susceptible a ella (34,35).

Para *S. pneumoniae*, la transformación del gen 2B ha ocurrido por lo menos en dos ocasiones involucrando dos orígenes diferentes y produciendo dos clases de genes alterados, la clase A y B. Clasificados así en base a las diferencias entre la secuencia alterada, la cual es característica para cada una de estas clases (36). La clase A de PLP se presenta en diferentes serotipos en todo el mundo; ésta apareció muy probablemente en Papua, Nueva Guinea, en los 50's, cuando la penicilina fue usada extensamente para el tratamiento de infecciones respiratorias que fueron comunes en esta región. Las cepas conteniendo la clase B en el gen 2B aparecieron en una misma clona, su aparición puede provenir de España con el serotipo 23F (37,38).

Los procesos que han contribuido notablemente al incremento en la resistencia neumocócica son los siguientes:

1. Cepas de ***S. pneumoniae*** resistentes a penicilina han surgido al mismo tiempo e independientemente una de otra en diversas localidades geográficas; muchas probablemente a través de la adquisición de secuencias de DNA extraño, probablemente de estreptococos del grupo viridans relacionados taxonómicamente y por la transferencia horizontal de los genes de las PLPs alteradas de un neumococo resistente a penicilina a uno genéticamente distinto, susceptible a penicilina.
2. El incremento en la incidencia de neumococos resistentes, puede involucrar la multiplicación y extensión de la progenie de una o más clonas neumocócicas resistentes (39).

Reportes recientes de cepas de ***S. pneumoniae*** resistentes a cefalosporinas de tercera generación son de interés particular, porque éstas han sido las drogas de elección para el tratamiento de enfermedades invasivas cuando las cepas son resistentes a penicilina. El análisis de una de estas cepas resistentes a ceftriaxona reveló un número de diferencias en las PLPs cuando la cepa fue comparada con todas las familias de las PLPs caracterizadas de cepas resistentes a penicilina. Estos neumococos resistentes a cefalosporinas pueden tener cambios en la afinidad de las PLPs diferentes a los de la penicilina y únicos a cefalosporinas (40).

OBJETIVOS

1. Determinar la variabilidad en los patrones electroforéticos de las proteínas ligadoras de penicilina (PLPs) en cepas invasoras y no invasoras de ***Streptococcus pneumoniae***.
2. Comparar los patrones electroforéticos de las PLPs entre variantes resistentes y sensibles de cepas invasoras de ***Streptococcus pneumoniae***.
3. Determinar la posible relación entre la afinidad de unión PLP-penicilina con los serotipos de ***Streptococcus pneumoniae*** identificados.

HIPOTESIS

A medida que la resistencia a penicilina de *Streptococcus pneumoniae* se incrementa, se presentará una disminución en la capacidad de unión PLP-penicilina, la cual se verá reflejada en la variación del perfil electroforético (ausencia o disminución de la intensidad de las bandas), en comparación con la cepa sensible.

METODOLOGIA

En el presente trabajo se analizaron un total de 52 cepas de *S. pneumoniae* de aislamientos clínicos (líquido cefalorraquídeo, sangre, oído medio y líquido peritoneal) de niños entre 0-5 años de edad provenientes de dos hospitales de la ciudad de México, el Hospital Infantil de México (HIM) y el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional (CMN). Al mismo tiempo se estudiaron 13 cepas aisladas de niños sanos (9 del CMN y 4 de un estudio en niños tlaxcaltecas). Las cepas se identificaron con las técnicas de optoquina y solubilidad en bilis descritas en el anexo I (41,42,43).

La sensibilidad antimicrobiana para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) se hizo por el método de microdilución en placa, basados en los lineamientos del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (44), posteriormente se tipificaron con sueros específicos provenientes del Statens Seruminstitut en Dinamarca, por medio de la reacción de Quellung (45).

Las cepas se clasificaron en cinco grupos, el primero comprendió 22 cepas invasoras resistentes a penicilina (CMI ≥ 2 ug/ml), el segundo grupo estuvo compuesto por 17 cepas invasoras sensibles (CMI ≤ 0.06 ug/ml), el tercero incluyó 13 cepas invasoras con resistencia intermedia (CMI 0.01-1 ug/ml), el cuarto y quinto grupo estuvieron formados por 13 cepas no invasoras: 7 sensibles y 6 resistentes.

La obtención de las PLPs se hizo mediante la preparación de lisados celulares de cada una de las cepas en estudio; cada uno de los lisados se incubó con diferentes concentraciones de bencilpenicilina tritiada (Amersham) en base a la CMI de cada una de las cepas, siendo 2.5 uCi/ml para las cepas sensibles, 20 uCi/ml (CMI 2 ug/ml), 30 uCi/ml (CMI 4 ug/ml), 40 uCi/ml (CMI 8 ug/ml) y 5 uCi/ml en las cepas con resistencia intermedia. Se determinó la cantidad de proteínas totales por medio de la reacción de Biuret (46). Se corrieron las proteínas en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (47), y la determinación de los patrones de PLPs se llevó a cabo por medio de la técnica de fluorografía (48,49).

Todos los procedimientos se describen detalladamente en el anexo I

Los resultados fueron analizados comparando visualmente los patrones electroforéticos obtenidos, con los reportados en la literatura. Se determinaron los pesos moleculares de las PLPs empleando marcadores de peso molecular de límites amplios, de 6,500 - 200,000 Daltones (BIO-RAD).

RESULTADOS

La primera colección de 52 cepas de *S. pneumoniae* analizadas en el presente estudio fueron seleccionadas de un total de 120 cepas aisladas de diversos cuadros clínicos, todas ellas invasoras y de niños menores de 5 años de edad; las CMI y los serotipos de las cepas antes mencionadas se muestran en los cuadros 1-3. Las figuras 1, 2 y 3 esquematizan los resultados de los 17 aislamientos sensibles a penicilina, cuya concentración mínima inhibitoria se encuentra en los valores de 0.03-0.06 ug/ml de penicilina. Estas cepas mostraron un marcado grado de similitud en el patrón de PLPs. Se observó una variación en la movilidad electroforética de la PLP 1a en todas las cepas sensibles analizadas cuando se compararon con el control sensible; así mismo se visualizó una variación en el perfil electroforético de la PLP 3 en la cepa 8 HIM con un peso molecular más alto (58 KDa), en relación con el control sensible cuyo peso molecular se estima en 52 KDa.

La figura 4 muestra el patrón de PLPs de los seis aislamientos clínicos resistentes a 2 ug/ml de penicilina (20 CMN, 18 HIM, 67 HIM, 62 HIM, 12 CMN y 24 HIM), en donde aparentemente no existe un cambio en la movilidad electroforética con respecto a la cepa control sensible, sin embargo si se aprecia una disminución en la afinidad de las PLP 1a y 2b.

Las figuras 5 y 6 muestran los resultados de los perfiles de las proteínas ligadoras de penicilina en las cepas resistentes a 4 ug/ml, en donde la afinidad de las PLPs 1a y 2b se observa fuertemente disminuida, aunada con un cambio en la movilidad electroforética en relación con el control sensible. De las 10

cepas con esta CMI, ocho fueron provenientes del HIM y las dos restantes del CMN.

Los fluorogramas de los patrones de las PLPs de las seis cepas resistentes a 8 ug/ml de penicilina se indican en la figura 7, en donde se aprecia claramente que las proteínas del grupo 2 (2a, 2b y 2x) fueron las más afectadas en cuanto a su capacidad de unión PLP-penicilina, sin omitir además la modificación de la PLP 1a. La cepa 35 HIM presentó un ligero cambio en la PLP 2b, el cual no fue tan marcado como en las cepas anteriormente mencionadas. En el aislamiento clínico 11 CMN se vió la ausencia de las PLPs 2a y 2b en donde a pesar de haber sido marcada con la misma cantidad de penicilina tritlada (40 uCi/ml) como el resto de las cepas resistentes a 8 ug/ml, no se logró visualizar las proteínas 2a y 2b de esta cepa, lo cual habla del grado de modificación que estas proteínas tienen. La figura 8 muestra los resultados de los perfiles electroforéticos de la cepa 11 CMN cuando ésta fue marcada con 60 y 80 uCi/ml de penicilina tritlada y se ve claramente la baja afinidad de las PLPs 2a y 2b.

El cuadro 4 agrupa los patrones electroforéticos de las 22 cepas resistentes analizadas, indicando las PLPs que sufrieron reducción en la afinidad por penicilina y agrupándolas en cuatro diferentes patrones; (1a⁺, 1b⁺, 2a⁺ y 2b⁻); (1a⁻, 1b⁺, 2a⁺ y 2b⁻); (1a⁻, 1b⁺, 2a⁻ y 2b⁻) y (1a⁺, 1b⁺, 2a⁺ y 2b⁺).

Los resultados de las 13 cepas con resistencia intermedia (CMI 0.1-1 ug/ml) analizadas en este trabajo mostraron claramente que las PLPs del grupo 2 (2a, 2b y 2x) son las primeras proteínas cuya capacidad de unión proteína-

penicilina se ve disminuida, figuras 9,10 y 11. En el cuadro 5 se agrupan los resultados del análisis de los tres fluorogramas anteriormente mencionados.

En el caso de la segunda colección de 13 cepas de *S. pneumoniae* analizadas en el presente estudio, provenientes de exudados faríngeos, se tiene la figura 12 donde se observan los perfiles de las siete cepas sensibles de *S. pneumoniae* aisladas de niños sanos (2CMN, 7CMN, 11CMN, 21CMN, 25CMN, 38CMN, 39CMN). Cuando se compararon estos patrones con los resultados de las cepas invasoras sensibles (figuras 1,2 y 3), se vió que la intensidad de las bandas es mayor, lo cual indica que la afinidad de la penicilina por las proteínas es superior en aislamientos de niños sanos, a pesar de que ambos grupos estuvieron constituidos por cepas con CMI de 0.03 y 0.06 ug/ml de penicilina. Resultados similares se obtuvieron cuando se compararon los perfiles de las cepas resistentes invasoras (figuras 4,5,6 y 7) contra las seis cepas resistentes de niños sanos (figura 13), en donde a pesar de presentar una disminución en la afinidad de unión, ésta no es tan marcada como la disminución que se observa en las cepas resistentes invasoras. Las CMI y los serotipos de las cepas antes mencionadas se muestran en los cuadros 6 y 7.

El análisis relacionando el patrón de PLPs y el serotipo de las cepas de *S. pneumoniae* en las cepas resistentes a penicilina se hizo sobre el serotipo 23F, ya que este fue el tipo predominante en los aislamientos analizados (68.1%). Cuando se analizaron los perfiles de cada una de estas 15 cepas se observaron tres diferentes patrones, dentro de los cuales el predominante fue el patrón 1 al que pertenecieron las cepas con alteraciones de las PLPs 1a y 2b, seguido del patrón 2 con alteraciones en las PLPs 1a, 2a y 2b (cuadro 8).

La distribución de los serotipos en las cepas sensibles es heterogénea, encontrándose presentes los serotipos 2, 23, 14, 6B, 10A, 11A y 19. Cuando se analizó la relación serotipo-patrón de PLPs para estas cepas, se vió una similitud en los perfiles del tipo 2 y 19; para los serotipos restantes no se pudo hacer ninguna comparación debido a su baja frecuencia (cuadro 2).

Cuadro 1. Características de 22 cepas de *Streptococcus pneumoniae* invasoras y resistentes a penicilina.

No. DE CEPA	CMI ug/ml	SEROTIPO
24 HIM	2	9A
67 HIM	2	23F
62 HIM	2	19F
12 CMN	2	23F
20 CMN	2	19F
18 HIM	2	23F
1 HIM	4	23F
9 HIM	4	23F
13 HIM	4	23F
15 HIM	4	9A
22 CMN	4	23F
46 HIM	4	23F
58 HIM	4	23F
69 HIM	4	19A
22 HIM	4	19F
23 CMN	4	23F
11 HIM	8	23F
21 HIM	8	23F
31 HIM	8	23F
35 HIM	8	23F
11CMN	8	23F
13CMN	8	6B

Cuadro 2. Características de 17 cepas de *Streptococcus pneumoniae* invasoras y sensibles a penicilina.

No DE CEPA	CMI (ug/ ml)	SEROTIPO
7 HIM	0.06	10A
8 HIM	0.03	11A
10 HIM	0.03	14
40 HIM	0.06	19A
30 HIM	0.06	19A
32 HIM	0.06	19A
45 HIM	0.06	19A
37 HIM	0.06	6B
73 HIM	0.06	6B
36 HIM	0.06	14
59 HIM	0.03	14
47 HIM	0.06	19A
1 CMN	0.06	2
2 CMN	0.03	2
3 CMN	0.03	2
18 CMN	0.06	23F
19 CMN	0.03	23F

Cuadro 3. Características de 13 cepas de *Streptococcus pneumoniae* invasoras con resistencia intermedia a penicilina.

No. DE CEPA	CMI (ug/ml)	SEROTIPO
3 HIM	1	6B
52 HIM	1	6B
34 HIM	0.125	19A
71 HIM	0.125	19A
44 HIM	1	14
56 HIM	1	14
51 HIM	1	23F
77 HIM	0.125	23F
4 CMN	0.125	6B
5 CMN	0.125	6B
7 CMN	1	14
8 CMN	1	14
27 CMN	1	19F

Cuadro 4. Relación de patrones electroforéticos en cepas de *Streptococcus pneumoniae* invasoras y resistentes a penicilina.

No. CEPA	CMI (ug/ml)	SEROTIPO	PATRON ELECTROFORETICO				
			1a	1b	2a	2b	
20 CMN	2	19F	+	+	+	-	(1)
18 HIM	2	23F	-	+	+	-	(2)
67 HIM	2	23F	-	+	+	-	(2)
62 HIM	2	19F	+	+	+	-	(1)
12 CMN	2	23F	+	+	+	+	(4)
24 HIM	2	9A	-	+	+	-	(2)
15 HIM	4	9A	-	+	+	-	(2)
69 HIM	4	19A	-	+	+	-	(2)
22 CMN	4	23F	-	+	+	-	(2)
23 CMN	4	23F	-	+	+	-	(2)
22 HIM	4	19F	-	+	+	-	(2)
58 HIM	4	23F	-	+	+	-	(2)
13 HIM	4	23F	-	+	+	-	(2)
9 HIM	4	23F	-	+	+	-	(2)
1 HIM	4	23F	-	+	+	-	(2)
46 HIM	4	23F	-	+	+	-	(2)
35 HIM	8	23F	+	+	+	-	(1)
13 CMN	8	6B	+	+	+	+	(4)
31 HIM	8	23F	-	+	+	-	(2)
21 HIM	8	23F	-	+	+	-	(2)
11 HIM	8	23F	-	+	+	-	(2)
11 CMN	8	23F	-	+	-	-	(3)

Cuadro 5. Relación de patrones electroforéticos en cepas de *Streptococcus pneumoniae* invasoras con resistencia intermedia a penicilina.

No. CEPA	CMI (ug/ml)	SEROTIPO	PATRON ELECTROFORETICO			
			1a	1b	2a	2b
51 HIM	1	23F	+	+	+	+
56 HIM	1	14	+	+	+/-	+/-
71 HIM	0.125	19A	+	+	+	-
3 HIM	1	6B	+	+	+/-	+/-
52 HIM	1	6B	+	+	+/-	+/-
44 HIM	1	14	+	+	+	-
77 HIM	0.125	23F	+	+	+/-	+/-
34 HIM	0.125	19A	+	+	+	+
5 CMN	0.125	6B	+	+	+	+
7 CMN	1	14	+	+	+	-
8 CMN	1	14	+	+	+	-
27 CMN	1	19F	+	+	+	-
4 CMN	0.125	6B	-	+	+	-

Cuadro 6. Características de 7 cepas de *Streptococcus pneumoniae* no invasoras y sensibles a penicilina.

No. DE CEPA	CMI (ug/ml)	SEROTIPO
2 CMN	0.03	2
7 CMN	0.03	6A
11 CMN	0.03	2
21 CMN	0.06	14
25 CMN	0.03	6A
38 CMN	0.06	23F
39 CMN	0.06	23A

Cuadro 7. Características de 6 cepas de *Streptococcus pneumoniae* no invasoras y resistentes a penicilina.

No. CEPA	CMI (ug/ml)	SEROTIPO
5 CMN	4	23F
36 CMN	4	6B
6 TLAX	4	23F
17 TLAX	4	23F
61 TLAX	2	35
112 TLAX	2	6A

Cuadro 8. Relación entre patrones electroforéticos de las PLPs y el serotipo 23F de *Streptococcus pneumoniae* en cepas invasoras penicilino-resistentes.

No.CEPA	CMI (ug/ml)	SEROTIPO	PATRON ELECTROFORETICO				
			1a	1b	2a	2b	
18 HIM	2	23F	-	+	+	-	(1)
67 HIM	2	23F	-	+	+	-	(1)
22 CMN	4	23F	-	+	+	-	(1)
23 CMN	4	23F	-	+	+	-	(1)
58 HIM	4	23F	-	+	+	-	(1)
13 HIM	4	23F	-	+	+	-	(1)
9 HIM	4	23F	-	+	+	-	(1)
1 HIM	4	23F	-	+	+	-	(1)
46 HIM	4	23F	-	+	+	-	(1)
12 CMN	2	23F	+	+	+	+	(2)
35 HIM	8	23F	+	+	+	-	(4)
31 HIM	8	23F	-	+	+	-	(1)
21 HIM	8	23F	-	+	+	-	(1)
11 HIM	8	23F	-	+	+	-	(1)
11 CMN	8	23F	-	+	-	-	(3)

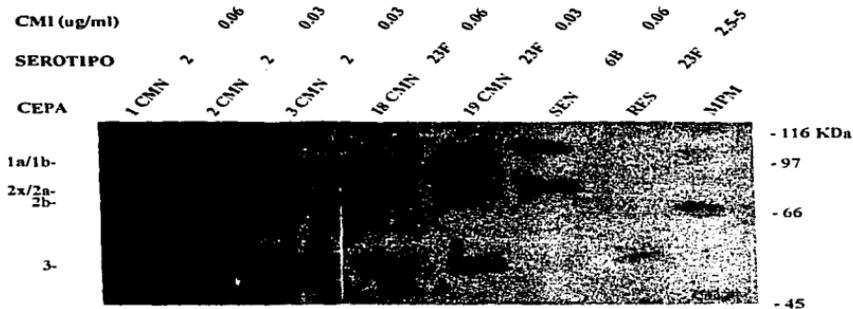


Fig. 1. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* sensibles a penicilina marcadas con 2.5 uCi/ml de bencilpenicilina tritizada. Las cepas controles sensibles y resistentes se marcaron con 2.5 y 5 uCi/ml respectivamente. El número de aislamiento, la CMI y el serotipo se indican en la parte superior del fluorograma. Los gels fueron expuestos a -70 °C durante 15 días.

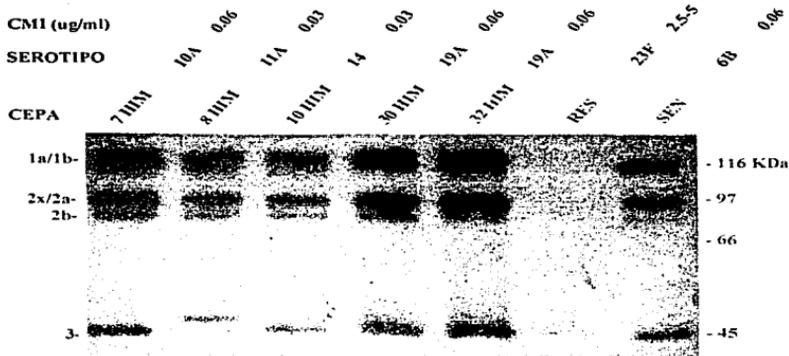


Fig. 2. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* sensibles a penicilina marcadas con 2.5 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada. Las cepas controles sensible y resistente se marcaron con 2.5 y 5 uCi/ml respectivamente. El fluorograma muestra los perfiles de los aislamientos clínicos del Hospital Infantil de México (HIM).

CMI (ug/ml)

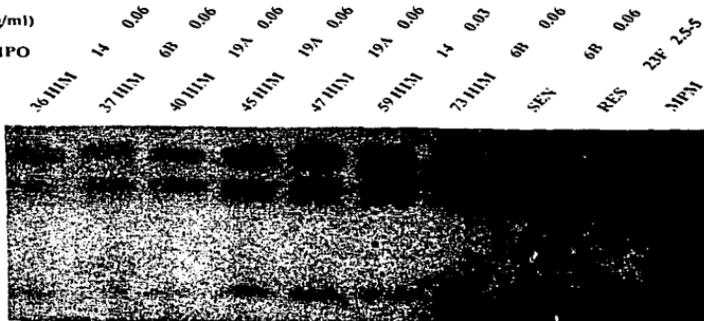
SEROTIPO

CEPA

1a/1b-

2x/2a-
2b-

3-



- 116 KDa

- 97

- 66

- 45

Fig. 3. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* sensible a penicilina marcadas con 2.5 uCi/ml de bencilpenicilina tritida. Las cepas controles sensibles y resistentes se marcaron con 2.5 y 5 uCi/ml respectivamente. Los aislamientos clínicos muestran una variación en la movilidad electroforética en relación con el control sensible.

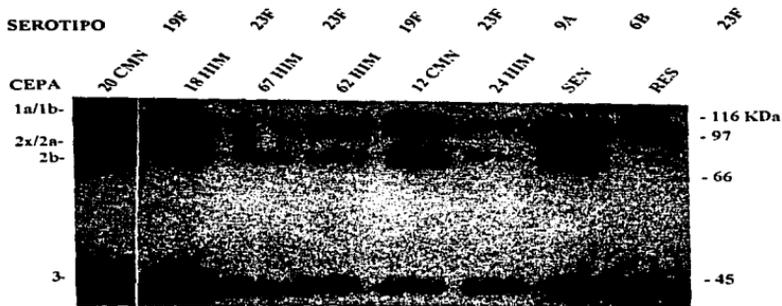


Fig. 4. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina (CMI=2 ug/ml) marcadas con 20 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada. Las cepas controles sensible y resistente se marcaron con 2.5 y 5 uCi/ml respectivamente. El número de aislamiento y el serotipo de las cepas son indicados en la parte superior del fluorograma

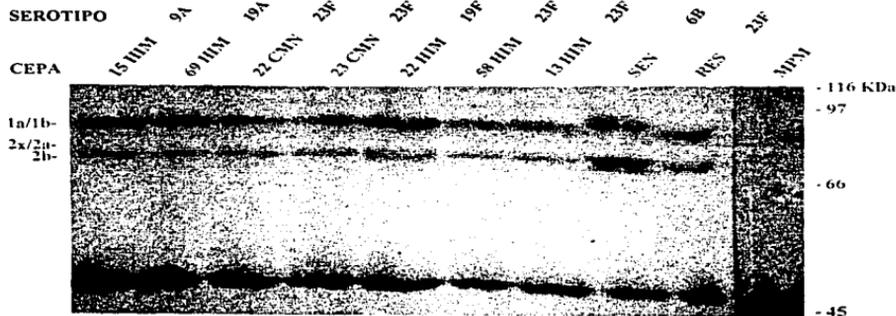


Fig. 5. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina (CMI=4 ug/ml) marcadas con 30 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada. Las cepas presentan alteraciones en las PLPs 1a y 2b en relación con el control sensible, así como un cambio en la movilidad electroforética. El número de aislamiento y el serotipo, se indican en la parte superior del gel.

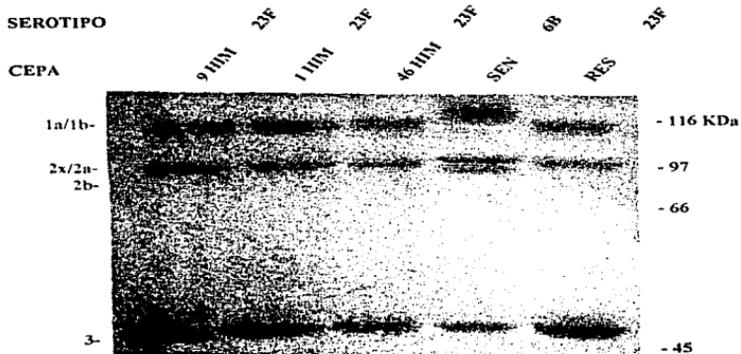


Fig. 6. Patrones electroforéticos de cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a 4 ug/ml de penicilina, marcadas con 30 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada.

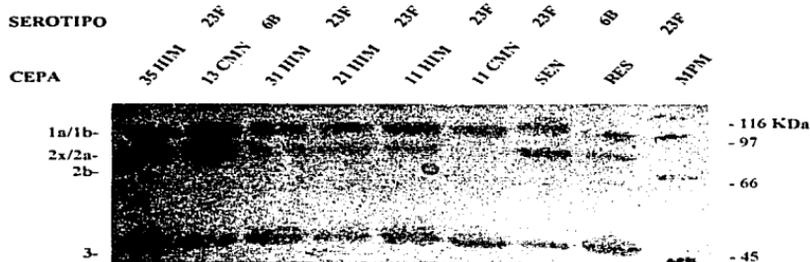


Fig. 7. Fluorograma de cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina (CMI=8 ug/ml) marcadas con 40 uCi/ml de benzilpenicilina tritiada. Los controles resistente y sensible se marcaron con 10 y 2.5 uCi/ml respectivamente. La afinidad de unión PLP-penicilina se ve disminuida en la cepa 11 CMN en donde las proteínas del grupo 2 no se visualizaron.

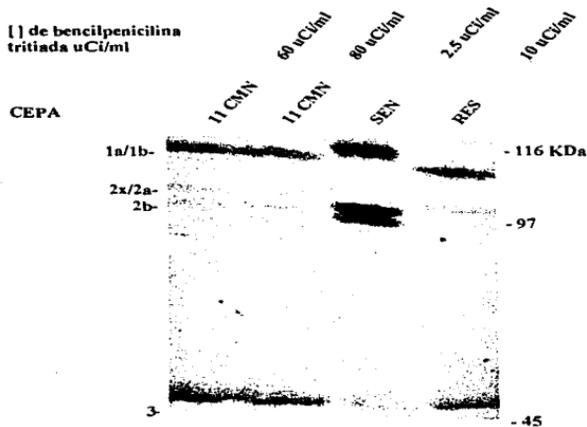


Fig. 8. Perfiles electroforéticos de la cepa 11 CMN resistente a 8 ug/ml de penicilina. La cepa fue tratada con 60 uCi/ml y 80 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada. Como puede observarse la visualización de las PLPs 2a y 2b es pobre a pesar de las altas concentraciones de bencilpenicilina tritiada con que fueron tratadas las células. El gel se expuso a -70°C durante 15 días.

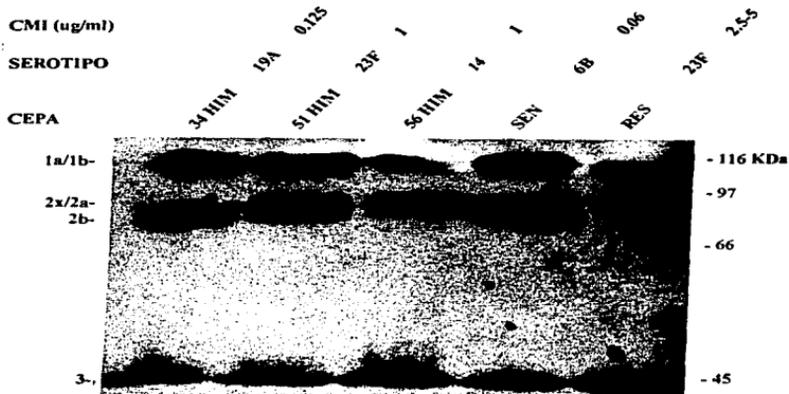


Fig. 9. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia intermedia (CMI=0.1-1ug/ml) marcadas con 5 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada; los controles se marcaron con 2.5 uCi/ml en el control sensible y 10 uCi/ml en la cepa resistente. Se observan algunos cambios en la afinidad de unión en las PLPs del grupo 2.

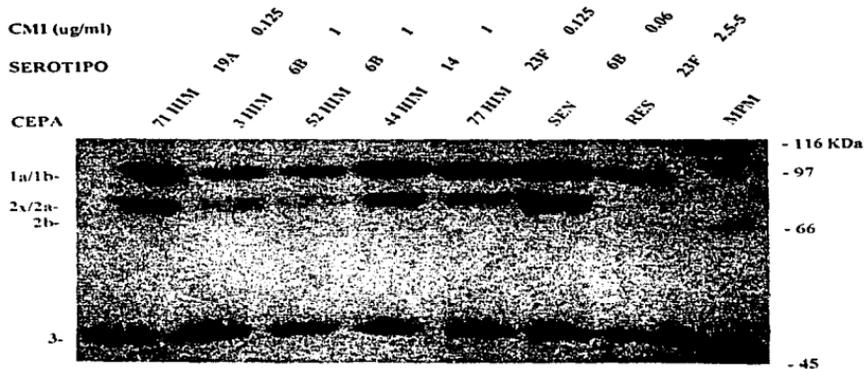


Fig. 10. Perfiles electroforéticos de las PLPs de cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia intermedia (CMI=0.1-1ug/ml) marcadas con 5 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada.

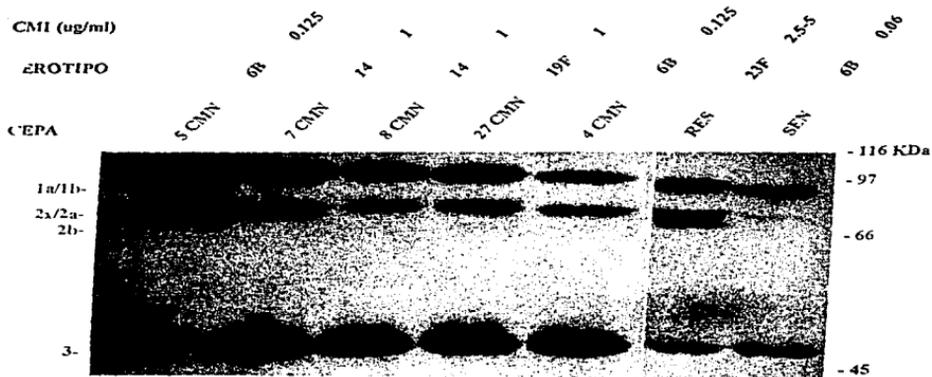


Fig. 11. Patrones electroforéticos de las cepas invasoras de *Streptococcus pneumoniae* con resistencia intermedia (CMI=0.1-1 ug/ml) marcadas con 5 uCi/ml de benzylpenicilina tritiada.

CMI (ug/ml)

SEROTIPO

CEPA

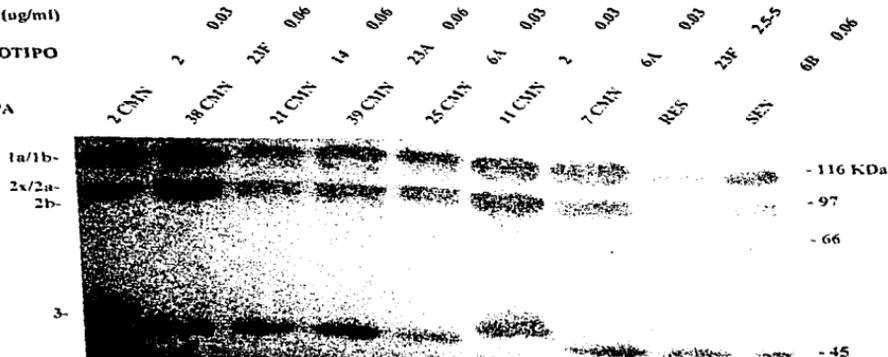


Fig. 12. Patrones electroforéticos de cepas de *Streptococcus pneumoniae* no invasoras sensibles a penicilina marcadas con 2.5 uCi/ml de bencilpenicilina tritiada. La intensidad de las bandas es mayor en relación con las cepas sensibles invasoras (fig. 1-3). El gel fue expuesto a -70°C durante 15 días.

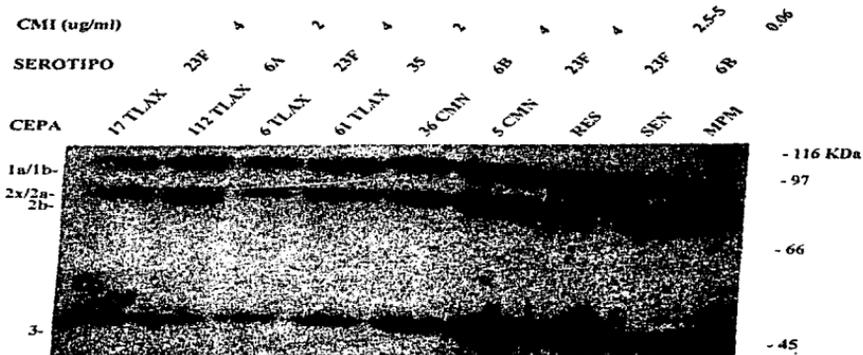


Fig. 13. Perfiles de PLPs de cepas no invasoras de *Streptococcus pneumoniae* resistentes a penicilina marcadas con 20 uCi/ml (CMI=2 ug/ml) y 30 uCi/ml (CMI=4 ug/ml) de bencipencilina tritiada. Las cepas controles se marcaron con 10 y 2.5 uCi/ml. Los geles fueron expuestos a -70°C durante 15 días.

DISCUSION

Streptococcus pneumoniae es la causa más común de neumonías, otitis media y bacteremia en niños menores de cinco años y la tercera causa más importante de meningitis en el mismo grupo de edad (50). El tratamiento contra estos padecimientos se ha visto obstaculizado por el desarrollo de cepas resistentes y multiresistentes (51). El amplio uso de la penicilina y otros antibióticos beta-lactámicos ha impuesto una presión selectiva importante, que ha originado el desarrollo de resistencia en muchas especies bacterianas. La emergencia de neumococos resistentes a penicilina es el resultado de por lo menos tres eventos distintos: (i) la introducción de uno o varios genes exógenos, vía transformación y recombinación dentro de al menos una clona bacteriana; (ii) la distribución de estas clonas resistentes y (iii) la distribución de mosaicos de genes de la clona resistente dentro de otras clonas (52). Por lo antes mencionado las cepas de neumococos resistentes a penicilina, son en la actualidad un problema importante en varias partes del mundo.

Los perfiles de las PLPs de las cepas sensibles a penicilina analizadas en este estudio, muestran una marcada similitud de un patrón de PLP a otro (figuras 1,2 y 3); una conservación similar del patrón ha sido observada en las PLPs de otras especies bacterianas (53,54), por lo que se ha propuesto que los patrones de las PLPs pueden ser usados como marcadores taxonómicos (15). Dentro de este mismo grupo de cepas se vió que la proteína más variable en términos de movilidad electroforética fue la PLP 1a. El cambio en el peso molecular de la PLP 1a en cepas sensibles ha sido demostrado inmunológicamente (27,55). El gen que codifica para la PLP 1a parece tener

poco efecto en las diferentes fases de crecimiento de la bacteria y la susceptibilidad a penicilina (56).

La presencia de la PLP 3 con un peso molecular más alto (58 KDa) en relación con el peso molecular de la cepa control sensible (52 KDa) presente en nuestros resultados es un fenómeno descrito con anterioridad (27). Trabajos de cromatografía líquida de alta resolución realizados por García-Bustos en 1987, demostraron que las cepas sensibles que presentan desviación del patrón típico (PLPs 1a y 3), tienen el mismo patrón de péptidos que las cepas sensibles con patrones normales (57).

La relación entre los niveles de resistencia y la afinidad de las PLPs por el antibiótico en las 22 cepas resistentes analizadas, muestran claramente que las PLPs 1a y 2b requieren gradualmente concentraciones de penicilina cada vez más elevadas, siendo además estas las proteínas aparentemente más variables en términos de movilidad electroforética (figuras 4,5 y 6). Tomasz y col. en 1986 utilizando las cepas controles 8249 (resistente) y R6 (sensible), encontraron marcadas diferencias de unión de las PLPs 1a y 2, cuando compararon diferentes concentraciones de penicilina tritizada vs densidad (58). Las alteraciones de estas PLPs que acompañan a la adquisición de resistencia en cepas de *S. pneumoniae* indican que al menos en término de PLPs afectadas, los neumococos contienen más de un blanco celular (48).

Las PLPs modificadas pueden representar mutantes derivadas de las PLPs normales, por reemplazamiento de aminoácidos en una región del genoma ocasionando cambios conformacionales que alteran las propiedades de unión PLP-penicilina, siendo esta reestructuración compatible con la baja

afinidad del antibiótico, el aumento de resistencia y en algunos casos, con los cambios de movilidad electroforética observados; sugiriendo un alto grado de plasticidad en los determinantes genéticos de las PLPs neumocócicas. Los cambios observados en las PLPs de las cepas resistentes en comparación con el patrón de la cepa silvestre, sugiere que los altos niveles de resistencia a penicilina involucra un número de alteraciones secuenciales. Esta conclusión es fundamentada por hallazgos con transformantes genéticos, en los cuales la adquisición gradual de resistencia a penicilina va acompañada por cambios graduales en los perfiles de las PLPs (59).

Los resultados obtenidos de un estudio sobre las alteraciones cinéticas de las PLPs realizado por Tomasz en 1986, indican que el principal factor responsable de la disminución observada en la unión del antibiótico en las cepas resistentes, involucra una disminución en la afinidad (**K**) y en el porcentaje de acilación (**K₂**) de las PLPs, en base a la siguiente fórmula: $E + I \xrightarrow{k} EI \xrightarrow{k_2} EI \xrightarrow{k_3} E + P$ en donde **E** es la enzima, **I** es el sustrato y **P** el producto; esto es constante para cada microorganismo cuando se marca el mismo volumen de cultivo, en la fase logarítmica de crecimiento (58).

Los patrones electroforéticos de las cepas con resistencia intermedia (figuras 9, 10 y 11) fueron parecidos a los reportados en cepas intermedias de Alaska y Sudáfrica en las que se observaron cuatro distintos patrones de PLPs (55).

Los neumococos resistentes han sido reportados con diferentes tipos capsulares, la mayoría pertenecientes a los serotipos 6, 14, 19 y 23. (9, 50, 60, 61). Cuando se relacionó el perfil de PLPs y el serotipo de las cepas

invasoras penicilino-resistentes (cuadro 4), se encontró que el tipo 23F presente en 15 cepas de 22 analizadas presentó tres diferentes patrones, siendo el patrón 1 (PLP 1a y 2b) el más abundante 12/15. La distribución intercontinental de la clona 23F multiresistente fue reportada en 1991 (37,62). Estos investigadores examinaron algunas cepas 23F de Ohio y España y demostraron que los organismos analizados tenían patrones similares de PLPs, perfiles enzimáticos y de endonucleasas de restricción (37,39,63,64). El análisis de cepas neumocócicas resistentes a penicilina de algunos continentes, ha demostrado que generalmente los organismos que circulan en áreas locales, son derivados de un número de clonas relativamente pequeño. Por lo antes mencionado se destaca la importancia de realizar un análisis molecular más profundo que permita conocer la distribución de clonas de *S. pneumoniae* en México, teniendo como antecedente que este es el primer trabajo de análisis molecular a nivel de proteínas, en cepas neumocócicas mexicanas.

Las cepas sensibles de aislamientos clínicos muestran una disminución en la unión PLP-penicilina, en comparación con cepas sensibles aisladas de niños sanos, lo cual se puede atribuir a la presión selectiva a la que se ve sometida una cepa invasora cuando el paciente es tratado con diversos antimicrobianos.

La emergencia de neumococos multiresistentes es un problema alarmante en todo el mundo; con la finalidad de llevar a cabo un tratamiento adecuado en pacientes con infecciones neumocócicas, muchos médicos pueden cambiar su práctica de prescripción en el tratamiento de infecciones comunes. Estos cambios en la prescripción pueden solo ser apropiadamente dirigidos cuando se cuenta con la vigilancia epidemiológica de la resistencia en todas las

áreas geográficas. La protección óptima contra el impacto de las enfermedades neumocócicas requiere un esfuerzo conjunto de los médicos, pacientes y de los servicios de salud pública para optimizar el uso de la vacuna disponible y mediante el uso prudente de los antibióticos reducir la presión selectiva para el desarrollo de resistencia. (65).

Estos estudios proporcionan bases para comprender mejor los mecanismos de resistencia y los factores que contribuyen a la selección, diseminación y prevalencia de las cepas resistentes, conocimiento indispensable para el control y manejo de *S. pneumoniae*. La apropiada intervención para la prevención de las infecciones y control de cepas resistentes incluye entre otros, el estudio de la prevalencia de cepas y serotipos resistentes, evitar el uso indiscriminado de antibióticos y el análisis profundo de los mecanismos involucrados en la resistencia (21).

CONCLUSIONES

- 1.- Las cepas invasoras resistentes a penicilina presentan alteraciones en las PLPs 1a, 2a y 2b, en comparación con los patrones conservados de los aislamientos sensibles.**
- 2. - Las modificaciones de estos blancos celulares (PLPs) se aprecian claramente, cuando se analiza el patrón de la cepa 11CMN resistente a 8 ug/ml de penicilina.**
- 3.- Si bien es cierto que en los resultados no se manejan porcentajes de afinidad (unión PLP-penicilina), este fenómeno está implícito en la resistencia y ésto se observa claramente cuando se comparan las cepas invasoras contra los aislamientos de niños sanos.**
- 4.- La presencia del serotipo 23F altamente predominante en las cepas resistentes analizadas, corrobora una vez más la amplia distribución de esta clona y su participación en la resistencia.**

LITERATURA CITADA

1. Breed RS, Murray EGD, Smith NR. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, E.U. 1990.
2. Lee CJ. Bacterial capsular polysaccharide biochemistry, immunity and vaccine. Mol Immunol, 1987; 24: 1005.
3. Henrichsen J. Six newly recognized types of ***Streptococcus pneumoniae***. J Clin Microbiol, 1995; 33: 2759-2762.
4. Musher DM. Infections caused by ***Streptococcus pneumoniae***: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clin Infect Dis, 1992; 14: 801-809.
5. Wong WY, Overturf GD, Powars DR. Infection caused by ***Streptococcus pneumoniae*** in children with sickle cell disease, epidemiology, immunologic mechanisms, prophylaxis, and vaccination. Clin Infect Dis, 1992; 14: 1124-1136.
6. Anónimo. New vaccine development establishing priorities. Diseases of importance in developing countries Vol II, National Academy Press, Washington, DC. 1986.
7. OPS/OMS. Sistema regional de vacunas (SIREVA). Estudio de factibilidad, 1991; pp. 25-28.
8. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (México); Epidemiología. 1997; 14: 18-24
9. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. Clin Microbiol Rev, 1990; 3: 171-196.
10. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in ***Streptococcus pneumoniae***: An overview. Clin Infect Dis, 1992; 15: 77- 83.

11. Friedland IR, Istre GR. Management of penicillin- resistant pneumococcal infections. *Pediatr Infect Dis J*, 1992; 11: 433-435.
12. Fenoll A, Martin Bourgon C, Muñoz R, et al. Serotype distribution and antimicrobial resistance of ***Streptococcus pneumoniae*** isolates causing systemic infections in Spain 1979-1989. *Rev Infect Dis*, 1991; 13: 56-60.
13. Koornhof HJ, Wassas S, and Klugman KP. Antimicrobial resistance in ***Streptococcus pneumoniae***. A South Africa perspective. *Clin Infect Dis*, 1992; 15: 84-94.
14. Friedland IR, Klugman KP. Antibiotic-resistant pneumococcal disease in South African children. *AJDC*, 1992; 146: 920-923.
15. Geslin P, Buu-Hoi A, Fremaux A, Ascar JF. Antimicrobial resistance in ***Streptococcus pneumoniae***: An epidemiological survey in France, 1970-1990. *Clin Infect Dis*, 1992; 15: 95-98.
16. Marton A, Gulyas M, Muñoz R, Tomasz A. Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of ***Streptococcus pneumoniae*** in Hungary. *J Infect Dis*, 1991; 163: 542-548.
17. Echániz AG, Velazquez MME, Carnalla BN, Soto NA, et al. Antimicrobial susceptibilities and capsular types of invasive ***Streptococcus pneumoniae*** isolated in children in Mexico City. *Microbial Drug Resistance*, 1997; 3: 153-157.
18. Gray BM, Converse GM, Dillon HC. Serotypes of ***Streptococcus pneumoniae*** causing diseases. *J Infect Dis*, 1979; 140: 972-983.
19. Echániz AG, Carnalla BN, Velazquez MME, Soto NA, et al. Capsular types of ***Streptococcus pneumoniae*** causing disease in children from Mexico City. *Pediatr Infect Dis J*, 1995; 14: 907-909.

20. Georgopapadaku NH. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to B-lactams. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993; 37: 2045-2053.
21. Tomasz A. Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of B-lactam antibiotics. *Rev Infect Dis*, 1986; 8: 250-278.
22. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of B-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 1986; 30: 1-5.
23. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 1992; 257: 1064-1072
24. Cohen M, Dinubline MJ, Dudley MN, Shlaes D. Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Atención Médica*, 1994; 4: 53-67.
25. Sprat B. Penicillin-Binding and the future of B-lactam antibiotic. *J. Gen. Microbiol*, 1983; 129: 1247-1260.
26. Nikaido H, Rosenberg BY, Foulds J. Porin channels in *Escherichia coli* studies with B-lactamases intact cells. *J. Bacteriol*, 1983; 153: 232-240.
27. Ellerbrok H, Hakenbeck R. Penicillin-degrading activities of peptides from pneumococcal penicillin-binding proteins. *Eur J Biochem*, 1988; 171: 219-224.
28. Dowson CG, Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding-protein-mediated resistance to beta-lactam antibiotics. *Trends Microbiol*, 1994; 2: 361-366.
29. Salakovitch CH L, Seroude L, Sicard AM. The role of penicillin-binding-protein 3 (PBP 3) in cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Gent*, 1993; 239: 77-80.
30. Hakenbeck R, Briese T, Chalkley L, et al. Variability of penicillin-binding proteins from penicillin-sensitive *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1991; 164: 307- 312.

31. García-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Altered peptidoglycan structure in a pneumococcal transformant resistant to penicillin. *J Bacteriol*, 1988; 170: 2143-2147.
32. Waltman WD, Gray BM, Svanborg C, et al. Epidemiologic studies of group 9 pneumococci in terms of protein type and 9N versus 9V capsular type. *J Infect Dis*, 1991; 163: 812-818.
33. Sibold C, Herichsen J, König A, et al. Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol*, 1994; 12: 1013-1023.
34. Laible G, Spratt BG, Hakenbeck R. Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 1991; 5: 1993-2002.
35. Dowson GC, Hutchison A, Woodford N, et al. Penicillin-resistant viridans streptococci have obtained altered penicillin-binding protein genes from penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 5858-5862.
36. Dowson GC, Hutchison A, Brannigan JA, et al. Horizontal transfer of penicillin-binding protein genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 8842-8846.
37. Muñoz R, Coffey TJ, Daniels M, et al. Intercontinental spread of a multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis*, 1991; 164: 302-306.
38. Coffey TJ, Dowson GC, Daniels M, et al. Horizontal transfer of multiple Penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 1991; 5: 2255-2260.
39. Muñoz R, Musser JM, Crain M, et al. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-

binding protein typing and multilocus enzyme analysis. Clin Infect Dis, 1992; 15: 112-118.

40. Figueiredo AM, Connor JD, Tomasz A. Evidence for a unique mechanism of beta-lactam antibiotic resistance in a ceftriaxone resistant clinical isolate of ***Streptococcus pneumoniae*** in: Abstracts of the 31 st. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); September 29-October 3, 1991 Chicago,IL. Abstract. 1430

41. Koneman WE, Allen DS, Dowell RV, et al. Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana, Bueno Aires, Argentina, 1989, pp. 309-314.

42. Lund E, Henrichsen J. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of ***Streptococcus pneumoniae*** in: Bergan T, Norris JR eds. Methods in Microbiology. New York Academic Press, New York, E.U. 1978; 12: 241-262.

43. Musher DM. Pneumococcal pneumoniae including diagnosis and therapy of infection caused by penicillin-resistant strains. Infect Dis Clin North Am, 1991; 5: 509-521.

44. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Ed. Approved Standard NCCLS Document M7-A2. Villanova, Pa: NCCLS; 1995.

45. Henrichsen J. The pneumococcal typing system and pneumococcal surveillance. J Infect. 1979; suppl. 2: 34-37.

46. Sorensen K, Brodbeck U. A sensitive protein assay method using micro-titer plates. Experientia, 1986; 42:161-162

47. Osterman LA. Methods of Protein and Nucleic Acid Research. Ed. Springer-Verlag, Alemania 1984; pp. 3-44.

48. Hakenbeck R, Tarpay M, and Tomasz A. Multiple changes of penicillin binding proteins in penicillin-resistant pneumococcal isolates. Antimicrob Agents Chemother, 1980; 17: 364-371.

49. Williamson R, Hakenbeck R, Tomasz A. In vivo interaction of beta -lactam antibiotics with the penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 1980; 18: 629-637.
50. Klein JO. The epidemiology of pneumococcal disease in infants and children. Rev Infect Dis, 1981; 3: 246-253.
51. Jamin M, Hakenbeck R, Frere JM. Penicillin binding protein 2x as a major contributor to intrinsic B- lactam resistance of *Streptococcus pneumoniae*. FEBS Lett, 1993; 331: 101-104.
52. Hakenbeck R, Henrichsen J, Wang J, Sibold C. Genetic relationships of penicillin-susceptible and resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. Infect Immun, 1992; 60:4119-4126.
53. Williamson R, Calderwood SB, Moellering RC, Tomasz A. Studies on the mechanism of intrinsic resistance to beta-lactam antibiotics in enterococcal group D streptococci. J Gen Microbiol, 1983; 129: 813-822.
54. Williamson R, Gutmann L, Horaud T, et al. Use of penicillin-binding proteins for the identification of enterococci. J Gen Microbiol 1986; 132: 1929-1936.
55. Markiewicz Z, Tomasz A. Variation in penicillin-binding protein patterns of penicillin-resistant clinical isolates of pneumococci. J Clin Microbiol, 1989; 27: 405-410.
56. Kell CM, Sharma UK, Dowson CG, et al. Deletion analysis of the essentiality of penicillin-binding proteins 1A, 2B and 2x of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett, 1993; 106: 171-175
57. Garcia-Bustos JF. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. J Biol Chem, 1987; 262: 15400-15405.

58. Tomasz A, Handwerger S. Alterations in kinetic properties of penicillin-binding proteins of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 1986; 30: 57-63.
59. Zigelboim S, Tomasz A. Penicillin-binding proteins of multiply antibiotic resistant South African strains of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 1980; 17: 434-442.
60. Michel J, Dickman D, Greenberg, et al. Serotype distribution of penicillin-resistant pneumococci and their susceptibilities to seven antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother, 1983; 23: 397-401.
61. Ward J. Antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical and epidemiologic aspects. Rev Infect Dis, 1981; 3: 254-266.
62. Barnes DM, Whittier S, Gilligan PH. Transmission of multidrug resistant serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain in vivo. J Infect Dis, 1995; 171: 890-896.
63. McDougal LK, Facklam R, Reeves M, et al. Analysis of multiply antimicrobial resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36: 2176-2184.
64. Tomasz A, Musser MJ, Kristinsson KG, et al. Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980's. J Infect Dis, 1993; 168: 158-63.
65. Block SL, Hedrick JA, Fyler RD, Smith RA. Outpatient antibiotic management in: Abstracts of the 34 st. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); October 4-7, 1994 Orlando, Florida. Abstract. M64.
66. Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, et al. Manual of clinical microbiology. Ed. American Society for Microbiology, Massachusetts, E.U. 1991, pp.1296.

ANEXO I

PRUEBA DE SENSIBILIDAD AL DISCO DE OPTOQUINA

La optoquina es una sustancia química, hidrocloreto de etilhidrocupreína, al cual *Streptococcus pneumoniae* es susceptible. Para la prueba de la optoquina se utilizan discos de 6 mm de diámetro impregnados con 5 ug de etilhidrocupreína.

Procedimiento

1. Cultivo puro de 24 hrs de *S. pneumoniae*
2. Preparar una suspensión de bacterias en solución salina al 0.9 % a una densidad igual al 0.5 del estándar de MacFarland (66).
3. Inocular de manera homogénea una placa de agar sangre de carnero, con la ayuda de un hisopo.
4. Colocar un disco de optoquina en el centro del área inoculada, presionando suavemente el disco para que se adhiera a la superficie.
5. Invertir la caja e incubarla 24 hrs a 37°C con CO₂ al 5%

Interpretación

El desarrollo de *S. pneumoniae* es típicamente inhibido por el disco de optoquina, la zona de inhibición debe de ser mayor o igual a 14 mm de diámetro para considerarse, sensible a la optoquina.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD EN BILIS

Las sales biliares, específicamente el desoxicolato y taurocolato de sodio, tienen la capacidad de lisar selectivamente a *S. pneumoniae* cuando el reactivo se incorpora a las células bacterianas que se desarrollan activamente en un medio de cultivo artificial.

Procedimiento

1. Cultivo puro de 24 hrs. de la cepa de *S. pneumoniae*
2. Se colocan 0.5 ml de caldo de cerebro-corazón en tubos de 13 x 100, cada tubo se marca, uno como prueba (P) y otro como control (C).
3. Ambos tubos se inoculan con una asada ligera de bacterias.
4. Al tubo prueba se le adiciona 0.5 ml de desoxicolato de sodio al 10%.
5. Al tubo control se le adiciona 0.5 ml de caldo de cerebro-corazón.
6. Agitar ambos tubos suavemente e incubarlos 3 hrs a 37°C, observándolos cada hora.

Interpretación

Organismos solubles en bilis (reacción positiva), aclaramiento visible de la turbidez en el tubo prueba (P), el tubo control debe permanecer turbio después de tres horas de incubación.

PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

METODO DE MICRODILUCION EN PLACA

Las placas de microdilución de 96 pozos son preparadas con la solución antibiótico-caldo de cultivo y congeladas para el uso de rutina. Se pueden probar cuatro cepas y tres controles en cada placa.

1. Cultivo puro de 24 hrs de las cepas de *S. pneumoniae* en estudio y controles de referencia, sensible (CMI= 0.06 ug/ml), resistente (CMI= 2.5-5 ug/ml) y ATCC 49619 (CMI= 0.1-1 ug/ml).
2. Preparar sangre de caballo desfibrinada al 50%.
3. Agregar 5 ml de la solución de sangre de caballo al 50% a 100 ml de caldo Mueller- Hinton.
4. Preparar una solución concentrada de 10.000 ug/ml de penicilina.

5. Hacer una dilución 1/10 con agua estéril de este antibiótico, la concentración final es de 1000 ug/ml.

6. Agregar 0.1 ml del "stock" de penicilina 1000 ug/ml a 6.15 ml de caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo, se obtiene ahora 6.25 ml de solución de trabajo de penicilina 16 ug/ml.

7. Hacer las diluciones de penicilina desde 16 hasta 0.015 ug/ml en caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo.

8. Poner en cada pozo (11 de los 12 de cada fila de la microplaca) 50 ul de las diferentes concentraciones de penicilina preparada en caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo, el último pozo solo contendrá medio de cultivo.

9. Preparar el inóculo bacteriano a partir de un cultivo puro de 18-24 hrs, emulsificar el microorganismo en 3 ml de solución salina estéril a una densidad igual al estándar de MacFarland 0.5, equivalente a 10^8 UFC/ml.

10. Diluir la suspensión 0.5 MacFarland 1/100 agregando 0.1 ml a 9.9 ml de caldo Mueller-Hinton suplementado con sangre de caballo; la concentración del organismo será 10^6 UFC/ml.

11. Agregar 50 ul del organismo a prueba a cada uno de los 12 pozos dispuestos horizontalmente en la microplaca, el último pozo solo contendrá organismo y diluyente y actuará como control de crecimiento. La concentración del organismo en el pozo será 5×10^4 UFC/ml.

12. La última fila dispuesta horizontalmente en la microplaca, solo contendrá medio de cultivo y servirá como control de posible contaminación.

13. Incubar las placas 24 hrs a 37°C en atmósfera normal.

14. Determinar la concentración mínima inhibitoria a las 24 hrs.

Interpretación

Primero se revisan los pozos de los controles de crecimiento para asegurar que las cepas crecieron bien, después se analizan los pozos del control de esterilidad para determinar alguna posible contaminación, posteriormente se checa que el desarrollo de los controles de resistencia se haya inhibido en las concentraciones establecidas para cada uno de ellos; por último se analizan los resultados de los aislamientos clínicos, indicando la concentración del antibiótico en la que ya no se presentó crecimiento.

REACCION DE QUELLUNG

Hasta ahora, existen 90 serotipos de *S. pneumoniae* reconocidos. Los primeros 80 serotipos fueron identificados alrededor de 1957, tres más fueron adicionados durante los siguientes 28 años, en 1985 Austrian describió el serotipo 16A y recientemente, Henrichsen publicó la existencia de 6 serotipos más (3).

La identificación definitiva de *S. pneumoniae* se realiza empleando el suero Omni el cual es una mezcla concentrada de sueros polivalentes producida

en conejos. Este suero se emplea en la reacción de hinchazón capsular de Neufeld. El suero contiene anticuerpos contra los 90 serotipos y es producido en el Statens Seruminstitut en Dinamarca. La reacción de Neufeld o de hinchamiento capsular es una reacción del suero específico que contiene los anticuerpos que reaccionan con los polisacáridos capsulares de los neumococos, haciendo evidente la cápsula cuando se observa con el microscopio.

Procedimiento

1. Cultivo puro de *S. pneumoniae* de 24 hrs.
2. En portaobjetos previamente rotulados con el número de cepa se coloca una gota de "buffer" de fosfatos pH 7.2.
3. Posteriormente se pone de 1-3 colonias bacterianas y se le agrega una gota de cada suero de los diferentes serotipos contenidos en las mezclas de la A-1.
4. Se cubre la preparación con un cubreobjetos y se coloca una gota de aceite de inmersión. Observar con el objetivo 100X.
5. Cuando hay una reacción positiva se observa una hinchazón de la cápsula, reacción suero-específica.
6. De acuerdo al grupo en el que reaccionen (hinchazón capsular), se prueba con los tipos que incluye esa mezcla; de esta manera se determina el serotipo capsular.

PREPARACION DE LISADOS CELULARES

Procedimiento

1. Se crece cada aislamiento en 3 ml de caldo cerebro-corazón suplementado con 0.1% de glucosa y 5% de suero de caballo de 4-6 hrs a 37°C.
2. 1 ml de cultivo en su fase exponencial se incuba con diferentes concentraciones de (4 (n)-fenil bencilpenicilina tritlada (Amersham) durante 15 min a 37°C.
3. Los cultivos se centrifugan a 4°C por 20 min. a 12.000 rpm.
4. La pastilla se resuspende en 50 ul de "buffer" de lisis y se incuba 30 min. a 37°C hasta que la lisis se lleve a cabo completamente
5. A cada muestra se le adiciona 30 ul de "buffer" de muestra y se refrigera a 4°C.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Procedimiento

1. Para la determinación de proteínas se utiliza un equipo llamado análisis de proteínas con ácido bicicónico (BCA), marca PIERCE.

2. Se prepara el reactivo de trabajo combinando 50 partes del reactivo A (carbonato de sodio, bicarbonato de sodio, reactivo de detección de BCA y tartrato de sodio) con una parte del reactivo B (sulfato de cobre al 4%).
3. Se prepara un juego de estándares de proteínas por dilución de la solución "stock" de BSA (suero de albumina bovina) en agua; con concentraciones de 200-1200 ug/ml.
4. 10 ul de cada estándar, blanco (agua) y muestra no conocida se colocan en una placa de 96 pozos.
5. Se adiciona 200 ul del reactivo de trabajo en cada pozo.
6. Se mezcla la muestra por 30 seg. en un agitador.
7. Se cubre la microplaca y se incuban las muestras a 37°C, 30 min.
8. Se determina la absorbancia de las muestras a 570 nm en un lector de ELISA.
9. Se prepara una curva estándar graficando la absorbancia neta a 570 nm vs la concentración de proteína. Usando esta curva estándar se determina la concentración de proteínas, para cada muestra de proteína desconocida.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA - DODECIL SULFATO DE SODIO

1. Se prepara un gel con concentraciones finales de acrilamida- bisacrilamida al 10% en el gel separador y 7% en el gel concentrador.
2. Se coloca en cada pozo del gel 15 μ l de muestra.
3. Se corre el gel durante 3.5 hrs a 50 volts en el gel concentrador y a 150 volts en el gel separador.
4. El gel se tiñe con azul de Coomassie R-250 0.025%, metanol 40%, y ácido acético 7% durante 30 min.
5. Se destiñe 30 min con una solución de metanol 40%, ácido acético 7% y agua.
6. El gel queda listo para la fluorografía

FLUOROGRAFIA

Procedimiento

1. Los geles se impregnan con salicilato de sodio 1M, durante 30 minutos

2. Se secan a 80°C durante una hora y se exponen a -70°C durante 15 días con una película radiográfica previamente sensibilizada. (Hyperfilm-MP; Amersham)

3. Los pesos moleculares son estimados comparando los geles teñidos y fluorografiados con patrones de pesos moleculares de límites amplios, 6,500 - 200,000 Daltones (Amersham).

ANEXO II

Acrilamida al 30%

Acrilamida	60 g
Bis-acrilamida	1.6 g
Agua bidestilada	200 ml

Tris 0.25 M pH 6.8

Tris	3.03 g
Agua bidestilada	100 ml

Tris 1.5 M pH 8.8

Tris	36.3 g
Agua bidestilada	200 ml

SDS 10%

Dodecil sulfato de sodio (SDS)	10 gr
Agua bidestilada	100 ml

"Buffer" de corrida pH 8.3

Tris base	3.02 g
Glicina 0.19 M	14.41 g

SDS. 0.1% 1.0 g
Aforar a un litro con agua bidestilada

Solución Tefidora

Azul de Coomassie R-250 0.5 g
Metanol 800 ml
Acido acético 140 ml

Solución Desteñidora

Metanol 400 ml
Acido acético 70 ml
Aforar con agua bidestilada a un litro

"Buffer" de muestra

Tris 1 M pH 6.8 1.8 ml
SDS 10% 2.0 ml
Glicerol 4.3 ml
Mercaptoetanol 1.5 ml
Azul de bromofenol 0.05% 0.3 ml

"Buffer" de lisis

Sarkosyl 1% 1 g
Buffer de fosfatos 50 mM 100 ml