



UNIVERSITAT DE BARCELONA

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS
MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA
A CIPROFLOXACINA EN *Streptococcus pneumoniae***

**Memoria presentada por Blanca Martínez Garriga
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS
MECANISMOS MOLECULARES DE LA RESISTENCIA
A CIPROFLOXACINA EN *Streptococcus pneumoniae***

**Memoria presentada por Blanca Martínez Garriga
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Barcelona**

Barcelona, Mayo 2005

DEPARTAMENT DE PATOLOGIA I TERAPÈUTICA EXPERIMENTAL
UNIVERSITAT DE BARCELONA



Curso de doctorado: MEDICAMENTOS, ALIMENTACIÓN Y SALUD (2000-2002)

TÍTULO DE LA TESIS:

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES DE LA
RESISTENCIA A CIPROFLOXACINA EN *Streptococcus pneumoniae***

DIRECTOR DE LA TESIS:

Dr. M. VIÑAS



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Departament de Patologia i Terapèutica Experimental
Facultat de Medicina
Campus de Bellvitge

MIQUEL VIÑAS CIORDIA, Catedrático de Microbiología del *Departament de Patologia i Terapèutica Experimental* de la *Universitat de Barcelona*

C E R T I F I C A ,

Que el trabajo de Tesis Doctoral que con el título “Contribución al estudio de los mecanismos moleculares de la resistencia a ciprofloxacina en *Streptococcus pneumoniae*” presentada por la doctoranda BLANCA MARTÍNEZ GARRIGA, ha sido realizada bajo mi supervisión en la Unidad de Microbiología del Campus de Bellvitge de esta Universidad.

Que la memoria presentada cumple a mi juicio los requerimientos formales y conceptuales necesarios para que sea tramitada su defensa pública y calificación por el tribunal correspondiente.

Y para que conste, firma el presente en l’Hospitalet de Llobregat a 25 de Mayo de 2005.

Miquel Viñas Ciordia

*“La formulación de un problema
es más importante que su solución”*

Albert Einstein

Quisiera mostrar mi agradecimiento más sincero a todas aquellas personas que han contribuido de una manera u otra a la realización de esta tesis.

Muy especialmente, al Dr. Miquel Viñas, director de esta tesis, por introducirme en el mundo de la microbiología y mostrarme el lado más fascinante de esta ciencia. Sin duda le debo gran parte del conocimiento microbiológico adquirido durante la realización de este trabajo.

Me gustaría dedicar unas palabras de agradecimiento a tres personas que, por el hecho de haberlas conocido, guiaron mi destino hasta este laboratorio: el Dr. Pallarès, el Dr. Bartrons y en especial, Lourdes Pastó.

Quisiera agradecer a la Dra. Liñares, de la Unidad de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge, su amable y valiosa contribución a este trabajo, no sólo por las cepas de estreptococos proporcionadas, sino también por su gran experiencia y conocimiento transmitido acerca de *Streptococcus pneumoniae*.

A lo largo de estos cinco años he tenido la gran suerte de estar rodeada de gente de una calidad humana excepcional. Debo destacar los que han sido mis compañeros de laboratorio durante todo este tiempo: Ana, César, Guillem, Laura, Lidia y la Dra. Neus Ruiz, con los que he compartido los buenos y malos momentos del día a día. Su amistad y ayuda han sido imprescindibles y decisivas a lo largo de todo este tiempo. Quisiera resaltar las aportaciones personales de cada uno de ellos, pero probablemente no acabaría. Ellos saben, a modo individual, qué han significado y significan para mí. También quisiera agradecer el afecto mostrado por la Dra. Vinuesa y la Dra. Truchero, personas que pertenecen a nuestro departamento o están vinculadas a él y que he tenido la oportunidad de conocer más recientemente.

No quisiera olvidarme de aquellos que, de manera desinteresada, me han acogido en sus grupos de investigación durante un breve periodo de tiempo y han compartido parte de su valioso conocimiento científico conmigo. Por un lado, el Dr. Rubens López y las personas que trabajan con él, en especial Patricia, por enseñarme tanto acerca del neumococo. Por otro lado, el Dr. Neyfakh, el Dr. Lee y la Dra. Vázquez y el resto de compañeros Kostya, Shalaka, Maria

y muy especialmente Lisa, junto con la que aprendí y apliqué la técnica de los *microarrays*. Su acogida fue excepcional. Por último, el Dr. Morrison, que me trasladó parte de su conocimiento en las técnicas moleculares aplicadas a *S. pneumoniae*.

Me gustaría citar también a otras personas que he ido conociendo durante la realización de este trabajo: la Dra. Montero, el Dr. Hernández, la reciente doctorada Sandra Merino, junto con la que asistí a los cursos de doctorado, el Dr. Barastegui, los compañeros de Biología Celular y Arnau, Cristina y Toni de Bioquímica. Más recientemente, mis actuales compañeros, Ana, Araceli, Conchi, Maite, Antonio Guzmán y, especialmente, el Dr. Antonio Rodríguez, que han sabido comprender mi situación actual y me han ayudado en todo momento, contribuyendo a hacer más llevadera esta última fase de finalización de la tesis. Hago extensivo este agradecimiento al Dr. Jesús Giraldo.

Quisiera dedicar también unas líneas a mis padres Antonio y Carmen, y a mis hermanos Germán y César, que han estado pendientes de mis avances y dándome ánimos continuamente. Su cariño ha significado un apoyo muy importante.

Finalmente, a Gerard, con el que he compartido los buenos y malos momentos que un trabajo de este tipo acarrea. En él he encontrado siempre el apoyo necesario para seguir adelante. Ha sabido escucharme y animarme en todo momento y ha estado siempre a mi lado. Por todo ello, gracias.

Debo agradecer a la Universidad de Barcelona la concesión de una beca de Investigación y Docencia durante estos años, que me ha permitido realizar la tesis. Los aspectos experimentales de este trabajo han sido financiados por el proyecto SAT2002-00698 (Ministerio de Educación y Ciencia y Fondos FEDER), cuyo IP es el Dr. Miquel Viñas.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIACIONES	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Características del género <i>Streptococcus</i>	3
1.1.1. Generalidades	3
1.1.2. Clasificación	4
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
1.2.1. Características estructurales	10
1.2.2. Factores de virulencia	13
1.2.3. Patogénesis de la infección neumocócica	16
1.3. La transformación bacteriana en <i>S. pneumoniae</i>	17
1.3.1. Generalidades	17
1.3.2. Transformación y competencia en bacterias Gram positivas	20
1.3.3. Desarrollo del estado de competencia en <i>S. pneumoniae</i>	21
1.3.3.1. Condiciones para el desarrollo de la competencia	21
1.3.3.2. Regulación de la competencia	21
1.3.3.3. El estado de competencia y la transformación en <i>S. pneumoniae</i>	23
1.3.4. Unión y entrada del DNA	25
1.3.5. Integración del DNA	26
1.3.5.1. Genes implicados en la recombinación	26
1.3.5.2. Papel de MmsA, RecA y Hex en la transformación	27
1.4. Agentes antimicrobianos y resistencia bacteriana	28
1.4.1. Quinolonas	30
1.4.1.1. Dianas principales de las fluoroquinolonas	30
1.4.1.2. Relación entre estructura y actividad	31
1.4.1.3. Mecanismo de acción	32

1.4.1.4. Clasificación y espectro antimicrobiano	33
1.4.2. La resistencia bacteriana a los antibióticos	34
1.4.2.1. Generalidades	34
1.4.2.2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos	36
1.4.2.3. Mecanismos de resistencia a las quinolonas	38
1.4.3. Los sistemas de reflujo	40
1.4.3.1. Transportadores secundarios de múltiples antibióticos	42
1.4.3.2. Transportadores ABC	44
1.4.4. La resistencia a los antibióticos en <i>S. pneumoniae</i>	45
1.4.4.1. La aparición de resistencias a los antibióticos en <i>S. pneumoniae</i>	45
1.4.4.2. La resistencia a quinolonas en <i>S. pneumoniae</i>	46
2. OBJETIVOS	49

3. MATERIAL Y MÉTODOS	53
------------------------------	-----------

3.1. Cepas bacterianas	55
3.2. Medios de cultivo	56
3.2.1. Caldo de tripton y soja (TSB)	56
3.2.2. Agar de tripton y soja (TSA)	56
3.2.3. Luria Broth (LB)	57
3.2.4. Caldo <i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)	57
3.2.5. Agar sangre	57
3.2.6. Müller-Hinton agar sangre	58
3.2.7. Medio de competencia C	59
3.2.8. Medio C+Y	61
3.2.9. Medio C+Y+A	62
3.2.10. Medio de conservación	62
3.3. Soluciones utilizadas	63
3.3.1. Catalasa 10 %	63

3.3.2.	Tampón de Morrison	64
3.3.3.	Fenol:cloroformo:isoamílico	64
3.3.4.	PBS	65
3.3.5.	Glicina-HCl, pH 3	65
3.3.6.	TAE × 50	65
3.4.	Determinación de la susceptibilidad microbiana a los antibióticos	66
3.4.1.	Preparación de los <i>stocks</i> de antibióticos y otras soluciones	66
3.4.2.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	66
3.5.	Experimentos de reflujo	68
3.5.1.	Ensayos de crecimiento e inhibición de <i>S. pneumoniae</i>	68
3.5.1.1.	Curva de crecimiento	68
3.5.1.2.	Ensayo de inhibición del crecimiento	68
3.5.1.3.	Efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento bacteriano, en presencia y ausencia de reserpina	69
3.5.2.	Experimentos de fluorimetría en <i>S. pneumoniae</i>	69
3.5.2.1.	Medida de la acumulación de ciprofloxacina	69
3.5.2.2.	Análisis estadísticos	71
3.6.	Transformación bacteriana	71
3.6.1.	Crecimiento y conservación de cepas de neumococo	71
3.6.2.	Preparación de células en estado de competencia	71
3.6.3.	Protocolo de transformación	72
3.7.	Técnicas de extracción de DNA	73
3.7.1.	Extracción de DNA cromosómico	73
3.7.1.1.	Extracción a gran escala	73
3.7.1.2.	Extracción a pequeña escala	74
3.7.2.	Extracción de DNA plasmídico	74
3.8.	Técnicas de cuantificación, manipulación y visualización del DNA	76
3.8.1.	Cuantificación de DNA	76

3.8.2. Precipitación de DNA	76
3.8.3. Fenolización	76
3.8.4. Purificación de productos de PCR	77
3.8.5. Digestión con enzimas de restricción	77
3.8.6. Purificación de fragmentos de DNA	77
3.8.7. Ligación de moléculas de DNA	77
3.8.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	78
3.9. Determinación de secuencias de genes	79
3.10. Inactivación del gen <i>pmrA</i> en <i>S. pneumoniae</i>	
Estrategia PLM (PCR Ligation Mutagenesis)	79
3.10.1. Análisis genómico para la detección de lugares de restricción poco frecuentes en <i>S. pneumoniae</i>	80
3.10.2. Amplificación de las regiones flanqueantes al gen y del cassette <i>cat</i>	80
3.10.3. Generación de la construcción mutagénica	83
3.10.4. Transformación y recombinación homóloga	83
3.11. Comparación y alineación de secuencias	85
3.12. <i>Microarrays</i> de DNA. Técnica FAIM (<i>Fitness Analysis of Insertional Mutants</i>)	86
3.12.1. Creación de una librería genómica	87
3.12.2. Condiciones de selección de la librería genómica	89
3.12.3. Extracción de DNA genómico	89
3.12.4. Obtención de la sonda de DNA	91
3.12.5. Hibridación de la sonda de DNA en el <i>microarray</i>	97
3.12.6. Descripción del <i>microarray</i> utilizado	98
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99

4.1. Susceptibilidad microbiana a los antibióticos en <i>S. pneumoniae</i>	101
4.2. Transferencia de la resistencia a los antibióticos entre especies del género <i>Streptococcus</i>	106

4.3. Determinación de las secuencias de los genes diana de las fluoroquinolonas	108
4.4. Estimación de la implicación del reflujo en la resistencia a ciprofloxacina	117
4.4.1. Susceptibilidad microbiana a los antibióticos y a otros compuestos	117
4.4.2. Ensayos de inhibición del crecimiento	121
4.4.3. Efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento bacteriano, en presencia y ausencia de reserpina	124
4.4.4. Experimentos de fluorimetría	129
4.5. Inactivación del gen <i>pmrA</i> en <i>S. pneumoniae</i>	134
4.5.1. Análisis genómico para la detección de lugares de restricción poco frecuentes en <i>S. pneumoniae</i>	136
4.5.2. Amplificación de las regiones flanqueantes al gen y del cassette <i>cat</i>	137
4.5.3. Generación de la construcción mutagénica	139
4.5.4. Estrategia PLM aplicada a la cepa de <i>S. pneumoniae</i> R6	141
4.5.5. Transformación de las cepas de <i>S. pneumoniae</i> 2375 y 3073	143
4.5.6. Transformantes de reflujo de R6 con DNA de las cepas 2375 y 3073	144
4.5.7. Estrategia PLM aplicada a los transformantes de reflujo de R6	147
4.6. Búsqueda de proteínas homólogas en <i>S. pneumoniae</i> a bombas de reflujo descritas en otras bacterias Gram positivas	151
4.7. <i>Microarrays</i> de DNA. Técnica FAIM (<i>Fitness Analysis of Insertional Mutants</i>)	160
5. CONCLUSIONES	173
<hr/>	
6. BIBLIOGRAFÍA	177
<hr/>	

ABREVIACIONES

aa	Aminoácido
aa-dUTP	dUTP aminoalil
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ACR	Acriflavina
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
CCCP	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
CF	<i>Competence factor</i>
CHL	Cloranfenicol
CIP	CIPROFLOXACINA
CSP	<i>Competence stimulating peptide</i>
Da	Daltons
DME	<i>Drug/Metabolite efflux</i>
dNTP	Dideoxinucleótido
EBR	Bromuro de etidio
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
<i>et al.</i>	y colaboradores
HSP	<i>Heat-shock protein</i>
GAT	Gatifloxacina
GEM	Gemifloxacina
LEV	Levofloxacina
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MOX	Moxifloxacina
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEN	Penicilina
PFGE	Electroforesis de campo pulsante (<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>)
PLM	Mutagénesis de ligación mediante PCR (<i>PCR Ligation Mutagenesis</i>)
QRDR	Región determinante de la resistencia a quinolonas (<i>Quinolone resistance determining region</i>)

R	Reserpina
RND	<i>Resistance-Nodulation-Cell Divison</i>
rpm	Revoluciones por minuto
ssDNA	DNA de cadena sencilla (<i>single-stranded DNA</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SMT	<i>Secondary Multidrug Transporters</i>
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SPN	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	Polimerasa termoresistente de <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampón Tris-EDTA
Tris	Trihidroximetilaminometano
ufc	Unidades formadoras de colonia
v/v	Volumen por volumen
w/v	Peso por volumen

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO *Streptococcus*

1.1.1. GENERALIDADES

El género *Streptococcus* está constituido por bacterias normalmente esféricas u ovoideas, con un tamaño inferior a 2 μm de diámetro, agrupadas en parejas o cadenas, cuando se cultivan en medio líquido. La longitud de las cadenas varía considerablemente entre distintas especies y cepas, dependiendo también de la composición del medio. Son bacterias Gram positivas, inmóviles y no formadoras de esporas.

La mayoría de estreptococos son anaerobios aerotolerantes, aunque frecuentemente nos referimos a ellos como facultativos, ya que pueden vivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, aunque algunos pueden ser estrictamente anaerobios. En muchas ocasiones requieren atmósferas con un 5% de CO_2 para su crecimiento, como es el caso de *S. mutans* y *S. pneumoniae*. Son quimiorganotrofos, con un metabolismo estrictamente fermentativo. Todos los estreptococos fermentan carbohidratos, que son los únicos nutrientes a partir de los cuales pueden obtener suficiente energía para soportar el crecimiento y la división celular, dando lugar principalmente a la producción de ácido láctico, pero no producen gas. Algunas especies fermentan ácidos orgánicos (como el málico y el cítrico) y ciertos aminoácidos (como serina y arginina). Son catalasa negativos y tienen requerimientos nutricionales complejos y variables.

Su crecimiento está restringido a temperaturas entre 25 y 45°C, encontrándose el óptimo alrededor de los 37°C. La mayoría de las especies existen como comensales o parásitos en el hombre y en animales, principalmente habitando la boca y el tracto respiratorio superior, siendo algunas especies altamente patógenas. Unos pocos son saprófitos y se encuentran en el medio ambiente.

El crecimiento en medio sólido se mejora con la adición de sangre, suero o glucosa. Las colonias desarrolladas en agar sangre tienen normalmente un diámetro de 0,5 a 1 mm, tras 24 h a 37 °C y apenas muestran un leve aumento de tamaño con incubaciones prolongadas. El crecimiento en medio líquido aumenta notablemente con la adición de glucosa, pero el rápido

descenso del pH inhibe el crecimiento a menos que el medio esté altamente tamponado, o bien que el pH se mantenga en valores próximos a la neutralidad por la adición continua de álcali.

La composición de la pared celular de los estreptococos es la característica de las bacterias Gram positivas, constituida principalmente de peptidoglicano, que está unido a una variedad de carbohidratos, ácidos teicoicos y antígenos proteicos de superficie.

No todas las especies forman cápsula. Algunas pueden formar cápsulas de ácido hialurónico durante la fase temprana de crecimiento, mientras que el neumococo posee diferentes cápsulas polisacáridicas, dando lugar a muchas variedades antigénicas tipo-específicas. Bastantes especies de estreptococos producen polisacáridos extracelulares solubles y/o insolubles en presencia de sacarosa, pero no necesariamente forman cápsulas morfológicamente distintas.

La figura 1.1 permite observar la disposición típica en parejas de las células de *S. pneumoniae*, así como su tamaño y forma.

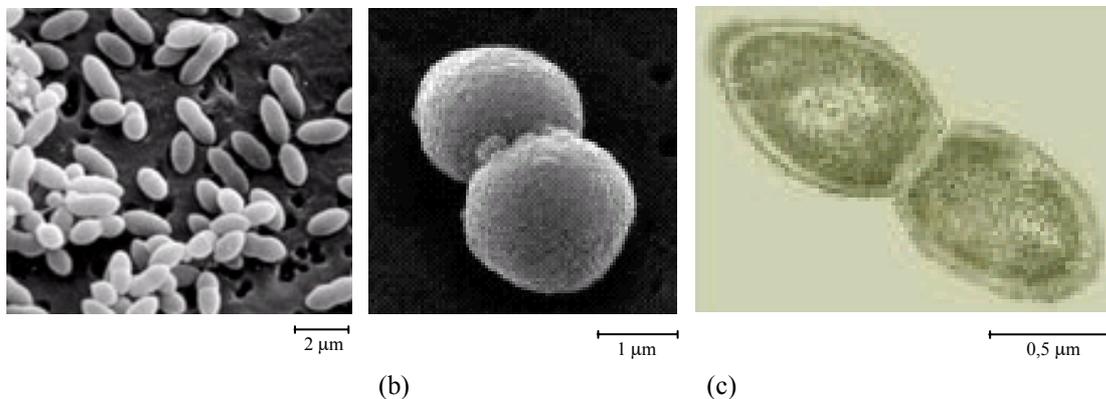


Fig. 1.1. (a), (b) Imágenes de *S. pneumoniae* obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido.
(c) Imagen de *S. pneumoniae* obtenida mediante microscopía electrónica de transmisión.

1.1.2. CLASIFICACIÓN

Para los laboratorios clínicos así como para los taxonomistas, una de las características fenotípicas más útiles de los estreptococos es la reacción de la bacteria en placas de agar sangre. El tipo de reacción hemolítica que presentan los estreptococos cuando

se cultivan en agar sangre permite clasificarlos en α -hemolíticos, β -hemolíticos, y γ -hemolíticos. La β -hemólisis está asociada a una lisis completa de los eritrocitos que rodean las colonias, de modo que los estreptococos β -hemolíticos dan lugar a una zona de clarificación completa alrededor de las colonias, denominada halo de hemólisis, cuyo tamaño varía en función de la cepa. La α -hemólisis es una hemólisis parcial asociada a la reducción de la hemoglobina, que da lugar a una zona de coloración verdosa alrededor de las colonias, de 1 a 3 mm de diámetro. Las colonias que no producen hemólisis se denominan γ -hemolíticas. En la tabla 1.1 se presentan las características de los estreptococos β -hemolíticos y en la tabla 1.2 se muestran las características de los estreptococos α y γ -hemolíticos.

Las colonias de *S. pneumoniae* producen una zona verdosa de hemólisis, que permite diferenciar *S. pneumoniae* de los estreptococos β -hemolíticos, pero no de los estreptococos comensales α -hemolíticos (estreptococos del grupo *viridans*) que son cohabitantes del tracto superior respiratorio. Sin embargo, existen pruebas específicas como la fermentación de la inulina, la solubilidad en bilis y la sensibilidad a la optoquina que permiten diferenciar el neumococo de los *Streptococcus* del grupo *viridans*. El uso de la reacción hemolítica en la clasificación de los estreptococos no es del todo satisfactorio ya que algunos estreptococos pueden mostrar α -, β - o incluso no mostrar hemólisis. La mayoría de *S. pneumoniae*, por ejemplo, son α -hemolíticos pero pueden causar β -hemólisis durante una incubación anaeróbica.

La serología ha sido de gran importancia en la clasificación e identificación de los estreptococos desde que se propuso por primera vez el esquema de agrupación de Lancefield en 1933, basado en la reactividad serológica de los antígenos polisacáridicos de la pared celular asociada a cepas β -hemolíticas. La estructura química de los polisacáridos se ha determinado en un número limitado de tipos y muestra características únicas para cada uno de ellos. Los serogrupos identificados están designados por letras del alfabeto (A-H y K-V). Los antígenos, conocidos como grupo-específicos o también llamados sustancias C, son polisacáridos (como ocurre en los grupos A, B, C, D, E, F y G) asociados a la pared celular o ácidos teicoicos (grupos D y N), situados en la región entre la membrana celular y la superficie interior de la pared celular.

Tabla 1.1. Identificación de los estreptococos β -hemolíticos.

Especies	Grupo Lancefield	Bac	Pyr	Cam	VP	Hip	Arg	Esc	Str	Sbl	Tre	Rib	Origen
<i>S. pyogenes</i>	A	+	+	-	-	-	+	v	-	-	NP	-	Humano
<i>S. agalactiae</i>	B	-	-	+	-	+	+	-	-	-	NP	NP	Humano, bovino
<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>dysgalactiae</i> ^b	C	-	-	-	-	-	+	v	-	v	+	+	Animal
<i>S. dysgalactiae</i> subesp. <i>equisimilis</i>	A, C, G, L	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	Humano, animal
<i>S. equi</i> subesp. <i>equi</i>	C	-	-	-	-	-	+	v	+	-	-	NP	Animal
<i>S. equi</i> subesp. <i>zooepidemicus</i>	C	-	-	-	-	-	+	v	+	+	v	NP	Animal, humano
<i>S. canis</i> ^c	G	-	-	+	-	-	+	+	-	-	v	NP	Perro, humano
<i>S. anginosus</i> (grupo)	A, C, G, F, ninguno	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	NP	Humano
<i>S. constellatus</i> subesp. <i>pharyngis</i>	C	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	NP	Humano
<i>S. porcinus</i>	E, P, U, V, ninguno	-	+	+	+	v	+	+	-	+	+	NP	Cerdo, humano, Delfín
<i>S. iniae</i>	Ninguno	-	+	+	-	-	-	+	+	-	NP	NP	pez, humano
<i>S. phocae</i>	C, F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	NP	NP	Foca

Bac, bacitracina; Pyr, pyrrolidonylarylamidasa; Cam, reacción CAMP; VP, reacción Voges-Proskauer; Hip, hidrólisis de hipurato; Arg, deaminación de arginina; Esc, hidrólisis de esculina; Str, hidrólisis de almidón; Sbl, Tre y Rib, producción de ácido en caldo de sorbitol, trehalosa y ribosa, respectivamente; +, reacción positiva en más del 95%; -, reacción negativa en más del 95%; v, reacción variable del 6 al 94% positiva; NP, no pertinente; letras, antígeno del grupo Lancefield; ^b, las cepas *S. dysgalactiae* subesp. *dysgalactiae* no son β -hemolíticas pero están incluidas en esta tabla por razones taxonómicas.

Tabla 1.2. Identificación de los cocos Gram positivos α y γ -hemolíticos en cadenas.

Especie o grupo	Antígeno	Opt	BS	BE	Na	Pyr	Ese	Vp	Man	Mel	Sbl	Tre	St	Dx	Origen
<i>S. pneumoniae</i>	pn	+	+	-	-	-	v	-	-	+	-	v	-	-	Humano
<i>S. equinus</i>	D	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	v	-	-	Equino, bovino
<i>S. gallolyticus</i>	D	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	Humano, koala, bovino
<i>S. pasteurianus</i>	D	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	Humano, bovino
<i>S. infantarius</i>	D (v)	-	-	-	-	-	v	+	-	+	-	-	+	-	Humano, bovino
<i>S. lutetiensis</i>	D (v)	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	v	-	Humano, bovino
<i>S. suis</i> ^a	Tipo 1-35 (R, S, T)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	Cerdo, humano
<i>Streptococcus viridans</i>	A, C, G, F, ninguno	-	-	-	-	-	v	v	v	v	v	v	v	v	Humano
Otros estreptococos	Desconocido	-	-	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	v	Animal, humano

pn, antisuero tipo neumocócico; letras, antígeno del grupo Lancefield; Opt, optoquina; BS, solubilidad en bilis; BE, reacción bde-esculina; Na, crecimiento en caldo al 6,5% de NaCl; Pyr, reacción pyrrolidonylarylamidasa; Ese, hidrólisis de esculina; Vp, reacción Voges-Proskauer; Man, Mel, Sbl, Tre, acidificación de caldos de manitol, melibiosa, sorbitol y trehalosa, respectivamente; St, hidrólisis de almidón; Dx, producción de polisacárido extracelular; +, reacción positiva en más del 95%; -, reacción negativa en más del 95%; v, reacción variable del 6 al 94% positiva. ^a La única manera de diferenciar *S. suis* de los estreptococos *viridans* es mediante el serotipaje; D, una proporción sustancial de las especies difieren.

El sistema de agrupación de Lancefield es principalmente útil para distinguir entre estreptococos patógenos β -hemolíticos de infecciones humanas y animales. Aun así, no es un sistema que pueda utilizarse para clasificar a todos los estreptococos, particularmente los no hemolíticos o los α -hemolíticos, que no poseen ninguno de los antígenos reconocidos del grupo de Lancefield.

Los neumococos no son tipificables según la clasificación de Lancefield, pero existen alrededor de 90 serotipos capsulares diferentes, que constituyen la base del sistema de clasificación serológica del neumococo [1;2].

En 1937, Sherman propuso un esquema de clasificación de los estreptococos en cuatro categorías, organizadas por reacciones hemolíticas, antígenos del grupo de carbohidratos y tests fenotípicos (principalmente tests de fermentación y de tolerancia): piogénicos, *viridans*, lácticos y enterococos [3;4]. Estas divisiones no son muy diferentes a las actuales, aunque se han añadido más especies. Según el “*Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*”, las especies del género *Streptococcus* pueden clasificarse en piogénicas, orales o anaerobias [5], sin embargo, no faltan dificultades para diferenciar entre estos grupos. En la tabla 1.3 se muestra una clasificación de las especies del género *Streptococcus* y sus reacciones diferenciales. En la tabla 1.4 se presentan las características bioquímicas de los estreptococos piogénicos, entre los que se encuentra *S. pneumoniae*.

La mayoría de las especies, particularmente en el grupo oral, están bajo estudios activos, con continuos reajustes de su taxonomía, de manera que en un buen número de casos su exacta adscripción taxonómica es todavía motivo de discusión.

En los últimos tiempos se han establecido distintas clasificaciones de los estreptococos según parámetros de nomenclatura, fenotípicos, médicos, ecológicos y filogenéticos [6]. Asimismo, los datos genómicos están permitiendo la identificación de genes conservados entre las diferentes especies de estreptococos, que podrían utilizarse para establecer nuevos criterios de clasificación.

Tabla 1.3. Reacciones diferenciales de las especies de *Streptococcus* y otras especies relacionadas.

CLASIFICACIÓN		CARACTERÍSTICAS										
		Condiciones de crecimiento					Hemólisis		Hidrólisis			Anaerobio estricto
		10°C	45°C	6,5% NaCl	pH 9,6	40% bilis	α	β	arginina	hipurato	esculina	
Estreptococos piogénicos	<i>S. pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	d	-
	<i>S. agalactiae</i>	d	-	d	-	d	-	d	+	+	-	-
	<i>S. equi</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	d	-
	<i>S. iniae</i>	+	-	-	-	-	+ ^b	+	ND	-	+	-
	<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	-	d	-
Estreptococos orales	<i>S. salivarius</i>	-	d	-	-	d	d	-	-	-	+	-
	<i>S. sanguis</i>	-	d	-	-	d	+	-	+	-	d	-
	<i>S. mitior</i>	-	d	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	<i>S. milleri</i>	-	d	-	-	d	-	- ^d	d	-	d	- ^f
	<i>S. mutans</i>	-	d	-	-	d	-	-	-	-	+	- ^f
	<i>S. rattus</i>	-	d	-	-	d	-	-	+	-	+	- ^f
	<i>S. cricetus</i>	-	d	d	-	d	-	-	-	-	d	- ^f
	<i>S. sobrinus</i>	-	d	d	-	d	-	-	-	-	d	- ^f
	<i>S. ferus</i>	-	-	-	-	ND	-	-	-	-	+	- ^f
Enterococos	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
	<i>E. faecium</i>	+	+	+	+	+	d	-	+	d	+	-
	<i>E. avium</i>	+	+	+	+	+	d	-	-	-	+	-
	<i>E. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	-	d	d	+	-
Estreptococos lácticos	<i>S. lactis</i>	+	-	-	-	+	d	-	d	d	d	-
	<i>S. raffinolactis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-
Estreptococos anaerobios	<i>S. morbillorum</i>	-	ND	ND	ND	ND	d	-	-	-	-	+
	<i>S. hansenii</i>	-	+	-	ND	ND	-	-	-	-	d	+
	<i>S. pleomorphus</i>	-	+	ND	ND	ND	-	-	ND	-	ND	+
	<i>S. parvulus</i>	-	+	-	ND	-	-	-	-	-	+	+
Otros estreptococos	<i>S. acidominimus</i>	-	-	ND	-	ND	d	-	-	+ ^e	-	-
	<i>S. uberis</i>	+	-	-	-	d	d	-	+	+	+	-
	<i>S. bovis</i>	-	d	-	d	+	- ^e	-	-	-	+	-
	<i>S. equinus</i>	-	+	-	-	+	- ^e	-	-	-	+	-
	<i>S. thermophilus</i>	-	+	-	-	-	d	-	d	-	-	-

+, el 90 % o más de las cepas son positivas; -, el 90 % o más de las cepas son negativas; d, entre el 11 y el 89 % de las cepas son positivas; ND, no determinado; ^b, fuera del anillo de α-hemólisis; ^c, normalmente reacción débil; ^d, las especies llamadas *S. anginosus* pueden ser positivas; ^e, a menudo lento; ^f, algunas especies son microaerófilas o requieren la adición de CO₂.

Tabla 1.4. Características bioquímicas de los estreptococos piogénicos^b.

Características	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. equi</i>	<i>S. dysgalactiae</i>	Grupos C, G, L	<i>S. iniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>	Grupos E, P, U, V
Producción de ácido a partir de								
Inulina	-	-	-	-	-	-	d	-
Lactosa	+	d	-	+	+	-	+	d
Manitol	-	-	-	-	-	+	-	+
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	+	-
Ribosa	-	+	-	+	+	ND	-	+
Salicina	+	d	+	d	ND	+	ND	+
Sorbitol	-	-	-	d	-	-	-	+
Trehalosa	+	+	-	+	+	+	+	+
Hidrólisis de								
Arginina	+	+	+	+	+	ND	+	+
Esculina	d	-	d	-	-	+	d	+
Hippurato	-	+	-	-	d	-	-	-
Voges-Proskauer	-	+	-	-	-	ND	-	+
Producción de								
Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	ND	-	+
α -Galactosidasa	-	d	-	-	-	ND	+	-
β -Glucuronidasa	d	d	+	+	+	ND	-	+
Pirrolidonicarilamidasa	+	-	-	-	-	ND	d	-
β -hemólisis	+	+	+	-	d	+	-	+
Sensibilidad a optoquina	-	-	-	-	-	-	+	-
Grupo Lancefield	A	B	C	C	C, G, L	-	-	E, P, U, V
Resistencia a bilis al 40%	-	d	-	-	ND	-	ND	ND

^a, el 90 % o más de las cepas son positivas; -, el 90 % o más de las cepas son negativas; d, entre el 11 y el 89 % de las cepas son positivas; ND, no determinado; ^b, ninguna cepa produce polisacáridos a partir de sacarosa o ácido de arabinosa.

1.2. *Streptococcus pneumoniae*

1.2.1. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

Las características estructurales del neumococo son similares a las del resto de estreptococos; la excepción importante es su cápsula, compuesta de polisacáridos complejos de elevado peso molecular y con actividad antigénica, que envuelve completamente las células neumocócicas.

La principal función que se atribuye a la cápsula polisacáridica es la protección de la bacteria frente a la actividad fagocítica de las células del sistema inmunitario, principalmente los macrófagos. El mecanismo viene determinado por diversos factores como son el efecto de enmascaramiento de los antígenos de superficie y la mayor dificultad de unión entre los anticuerpos y los antígenos, entre otros. Por ello, los organismos mucosos y capsulados son resistentes a la fagocitosis y en esas condiciones se multiplican rápidamente, mientras que los neumococos no capsulados son fagocitados rápidamente cuando se añaden a una suspensión de leucocitos en el suero normal. De hecho, en los textos de microbiología, la función principal que se atribuye a la cápsula es precisamente la inhibición de la fagocitosis tanto en bacterias que se encuentran en el interior de un vertebrado originando infecciones, como en bacterias del medio ambiente susceptibles de ser fagocitadas por protozoos.

La observación en fresco por microscopía óptica de la cápsula polisacáridica del neumococo es difícil, ya que su índice de refracción es similar al del medio. Para poder visualizarla con el microscopio óptico se recurre a una tinción negativa por medio de nigrosina o tinta china (técnica de Burri). Al ser una estructura muy hidratada (99% de agua), su observación con las técnicas habituales de microscopía electrónica de transmisión y de barrido revela una notable contracción de su estructura. Además, los colorantes habituales tienen poca afinidad hacia ella. En microscopía electrónica, hay que recurrir a la estabilización previa de la estructura capsular (para evitar su contracción ulterior) por medio de anticuerpos anticapsulares o de lectinas. Tras esta operación, se procede a la tinción con una ferritina catiónica (por ejemplo, el rojo de rutenio), con afinidad hacia los polianiones. En la figura 1.2 se muestran dos imágenes de *S. pneumoniae* obtenidas por microscopía óptica y microscopía electrónica en las que se visualiza el material capsular.

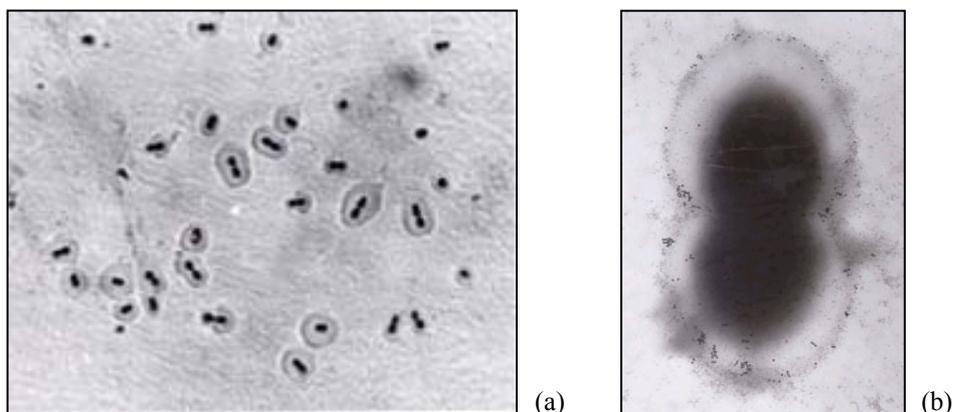


Fig. 1.2. (a) Imagen al microscopio óptico de células de *S. pneumoniae* teñidas con tinta china.
(b) Imagen de la cápsula de *S. pneumoniae* al microscopio electrónico.

Cuando *S. pneumoniae* crece en la superficie de un medio de cultivo sólido, la cápsula da lugar a colonias con una apariencia brillante y lisa. Estas células reciben el nombre de formas “S” (del inglés, *smooth*). Sin embargo, después de cultivos prolongados en medios artificiales, algunas células pierden esta capacidad de formar cápsula, y la superficie de sus colonias aparece rugosa “R” (del inglés, *rough*). Con la pérdida de la cápsula, la bacteria pierde también su virulencia. Como ya se ha comentado con anterioridad, se han identificado alrededor de 90 tipos capsulares diferentes del neumococo, que forman la base del serotipado antigénico del organismo.

El componente principal de la pared celular de *S. pneumoniae* es el peptidoglicano, constituido por largas cadenas de polisacárido unidas por enlaces peptídicos. El componente del polisacárido consiste en unidades alternas de los azúcares N-acetilglucosamina (NAG) y N-acetilmurámico (NAM), con ácidos teicoicos (TAs) anclados a través de enlaces fosfodiéster. La pared celular está también constituida por ácidos lipoteicoicos (LTAs), químicamente idénticos a los ácidos teicoicos pero anclados a la membrana celular mediante un grupo acilo graso C-terminal (en rojo en la figura 1.3). Los ácidos teicoicos (TAs) y lipoteicoicos (LTAs) (ambos en verde en la figura 1.3) son carbohidratos fosfatados ricos en colina (esferas naranjas). Éste es un elemento esencial en la biología de *S. pneumoniae* ya que la colina se adhiere específicamente a los receptores de unión a la colina, situados en todas las

células humanas. Las proteínas de unión a la colina (CBPs) están unidas a los TAs o LTAs de la pared celular vía dominios de unión a la colina (diagrama de cintas en rojo). Todas las CBPs comparten un dominio de unión a la colina C-terminal común mientras que los N-terminales de las CBPs son distintos, indicando que sus funciones son distintas. La familia de las CBPs incluye determinantes tan importantes de la virulencia como el antígeno de protección PspA, localizado en la pared celular del neumococo, las autolisinas LytA, B y C y la adhesina CbpA. Cabe destacar que la autolisina LytA es la responsable de la lisis celular del neumococo en la fase estacionaria del crecimiento. En principio todos los aislados clínicos poseen esta autolisina y sufren la lisis celular entre 18 y 24 horas después de la iniciación del crecimiento bajo condiciones óptimas. El antígeno neumocócico de superficie PsaA está situado debajo de la capa de peptidoglicano y está unido a la membrana celular. Las proteínas de unión a la penicilina (PBPs) están situadas en el espacio periplásmico, interaccionando con el peptidoglicano y muestran una única hélice transmembranal N-terminal (en azul). La hialuronidasa (Hyl) está unida al peptidoglicano por un motivo LPXTG.

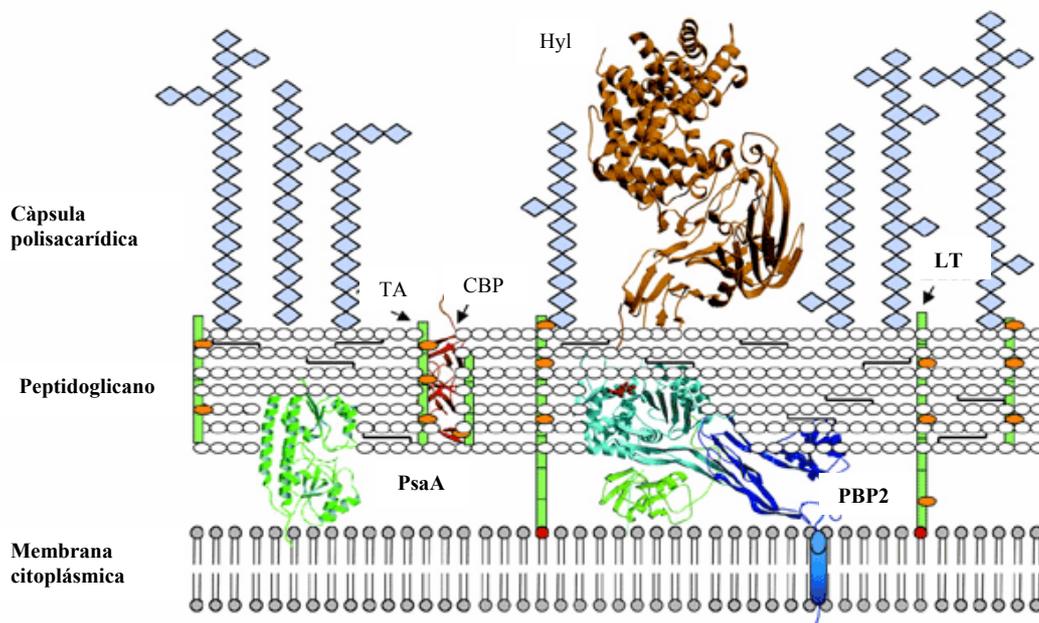


Fig. 1.3. Esquema de la pared bacteriana de *S. pneumoniae*.

1.2.2. FACTORES DE VIRULENCIA

Durante años, se ha considerado que el principal factor de virulencia en *S. pneumoniae* era su cápsula polisacáridica, porque las bacterias no capsuladas eran prácticamente inocuas comparadas con la misma cepa capsulada. El trabajo pionero de Griffith puso de relieve que las variantes neumocócicas no capsuladas eran completamente avirulentas, además de describir por primera vez el mecanismo de la transformación [7]. Posteriormente, se ha encontrado una relación cuantitativa entre la cantidad de polisacárido tipo-específico y la virulencia, aunque no todos los tipos serológicos son igualmente patogénicos; de hecho se ha observado que la composición química de la cápsula así como el mecanismo por el cual se produce también juegan un papel importante en la virulencia [8]. Aunque la cápsula polisacáridica ha sido reconocida como condición *sine qua non* de virulencia, recientemente se ha centrado la atención en el papel de las proteínas neumocócicas en la patogénesis, particularmente como consecuencia de su eventual interés en la producción y diseño de vacunas.

Ciertas proteínas y enzimas de la superficie de *S. pneumoniae* contribuyen significativamente a la patogénesis y pueden estar involucradas en el desarrollo de la enfermedad, bien como mediadores de la inflamación o bien directamente atacando los tejidos del huésped. Entre ellas se encuentran una hialuronidasa (Hyl), una neumolisina (Ply), dos neuraminidasas (NanA y NanB), la autolisina principal (LytA), la proteína de unión a la colina A (CbpA), el antígeno de superficie A (PsaA) y la proteína A (PspA) de la superficie neumocócica. En la figura 1.4 se presenta un esquema de la localización de cada una de las proteínas implicadas en la patogénesis de *S. pneumoniae*.

La neumolisina contribuye a la virulencia del neumococo, facilitando la adherencia, la invasión y la diseminación de este importante patógeno humano, ya que penetra a través de las defensas físicas del huésped [9]. A diferencia de otros antígenos del neumococo, esta molécula no está expuesta en su superficie, sino que es una enzima del citoplasma que se libera debido a la acción de la autolisina LytA. Así pues, las propiedades virulentas de Ply dependen directamente de la acción de la autolisina.

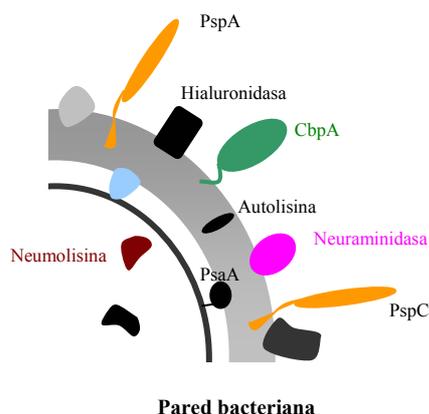


Fig. 1.4. Diagrama esquemático de los principales factores de virulencia en *S. pneumoniae* y su localización en la pared bacteriana.

Por otra parte, es un hecho conocido, no sólo en *S. pneumoniae* sino en muchos otros patógenos, que las enzimas hidrolíticas como la neuraminidasa y la hialuronidasa pueden también contribuir a la colonización y/o invasión del huésped, ya sea debilitando el tejido conjuntivo, o bien hidrolizando las moléculas de anticuerpo. La hialuronidasa, por ejemplo, es una de las proteínas más abundantes de superficie de *S. pneumoniae* con propiedades que permiten la penetración de las defensas físicas del huésped, que pueden ser esenciales para la virulencia total del neumococo.

La proteína de unión a la colina A (CbpA) tiene una gran habilidad para reaccionar tanto con anticuerpos humanos como con el suero protector del ratón, ya que permite la adherencia al tejido huésped y la posterior colonización.

El antígeno de superficie PsaA es otro factor de virulencia del neumococo que se encuentra anclado a la membrana citoplásmica por un componente lipídico, covalentemente unido a la proteína [10].

La proteína PspA es un antígeno de protección para el neumococo, con un final N-terminal que se extiende desde la pared celular hasta sobresalir fuera de la cápsula. Esta parte funcional N-terminal tiene una elevada carga electrostática polarizada. La carga electropositiva de la molécula estabiliza la carga electronegativa de la cápsula, mientras que la parte electronegativa de PspA probablemente previene la unión del complemento del huésped

al neumococo, que en último término llevaría a la lisis de las células de *S. pneumoniae*. En la figura 1.5 aparece un esquema de la pared celular del neumococo y la localización de la proteína PspA.

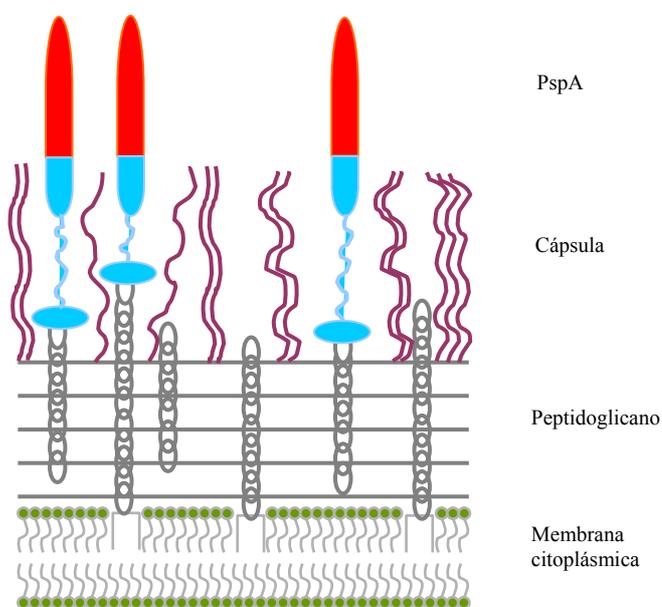


Fig. 1.5. Diagrama esquemático de la localización de PspA en la pared de *S. pneumoniae*. El carácter de las interacciones de la superficie de PspA con los ácidos teicoicos y la cápsula, expone el final altamente electronegativo (en rojo) de la molécula fuera de la célula bacteriana.

La contribución de todas estas proteínas se ha examinado a través de experimentos en los que se han obtenido mutantes específicos de los respectivos genes en el cromosoma del neumococo y en los que se ha examinado la modificación de la virulencia en modelos animales experimentales. Por ejemplo, la potencia como vacunas de estas proteínas se ha determinado por inmunización en ratones con antígenos purificados, seguida de pruebas con neumococos virulentos [11]. Asimismo se han realizado mutaciones en los genes que codifican alguna de las tres proteínas del neumococo antes mencionadas - Ply, LytA y PspA - consiguiéndose una reducción importante de la virulencia [12]. En cambio, deleciones de los genes *nanaA*, *hyl* y *cbpA* no implican una disminución significativa de la virulencia [10]. Por otra parte, dobles mutantes con más de una deleción génica sí consiguen un impacto destacado en la virulencia, aunque no en todos los casos. Por ejemplo, se ha comprobado que mutaciones adicionales de *nanaA* o *lytA* en mutantes *ply* no llevan a una atenuación de la virulencia. Individualmente, Ply y LytA contribuyen significativamente a la virulencia del neumococo, pero cuando Ply no se expresa en las células mutadas, LytA no proporciona protección

adicional ya que no hay moléculas Ply para liberar del citoplasma de estas células. A pesar de conseguir mutantes avirulentos inactivando los genes mencionados, la interrupción de la expresión de algunas de estas proteínas atenúa la virulencia pero no es probable que la suprima completamente [13].

1.2.3. PATOGÉNESIS DE LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA

S. pneumoniae se considera la principal causa de neumonía adquirida en la comunidad, además de estar implicada con frecuencia en exacerbaciones de bronquitis crónica y en meningitis, otitis media aguda y sinusitis.

El neumococo tiene una serie de características que le permiten colonizar una gran variedad de nichos ecológicos, encontrándose la mayoría de neumococos en la nasofaringe, una localización donde se puede presumir que fácilmente tiene lugar la transformación. La colonización nasofaríngea por *S. pneumoniae* puede ser origen de una posterior invasión y, en último término, puede llegar a causar enfermedad. En ocasiones, esta colonización induce una respuesta inmune que es capaz de detener el progreso de la infección.

La infección neumocócica tiene una distribución cosmopolita, con una incidencia mayor en niños y ancianos, colectivos particularmente sensibles a sus consecuencias. La gravedad de la enfermedad que provoca depende del tipo capsular, es decir, algunos tipos capsulares son más capaces que otros de originar enfermedad, tal y como se desprende de las diferencias observadas en la frecuencia relativa del aislamiento de ciertos serotipos en personas sanas y en personas enfermas.

Las infecciones neumocócicas severas y sus complicaciones se deben parcialmente a acciones directas de los determinantes de la virulencia en el neumococo (ver apartado 1.2.2.) y, por otra parte, a la respuesta inmune del huésped a diversos componentes neumocócicos. Así pues, puede decirse, como ocurre en muchas otras enfermedades infecciosas, que la patogenicidad de la infección neumocócica es una compleja interacción entre los determinantes de la virulencia neumocócica y la respuesta inmune del huésped.

Los determinantes de la virulencia neumocócica y las correspondientes respuestas inmunes producen cuatro efectos clave: la adhesión, la invasión, la inflamación y el shock [14]. Cabe destacar que la inmunidad en los enfermos es específica de serotipo pero no previene necesariamente la recolonización por el mismo serotipo en otro momento.

1.3. LA TRANSFORMACIÓN BACTERIANA EN *S. pneumoniae*

1.3.1. GENERALIDADES

En el mundo bacteriano existen diversos mecanismos naturales de intercambio genético. Los más conocidos son la transformación, la transducción y la conjugación. Se entiende por transducción la transferencia de genes cromosómicos a través de bacteriófagos. La conjugación es otra forma de intercambio genético que tiene lugar entre células bacterianas y que está mediada generalmente por plásmidos conjugativos, es decir, por plásmidos capaces de transferirse ellos mismos a otras células. Por último, la transformación genética es un proceso a través del cual una célula capta DNA extracelular que se encuentra en el medio circundante y lo incorpora en su citoplasma. Eventualmente, el DNA exógeno se combina con el DNA cromosómico, incorporando nueva información genética. Este hecho conlleva la aparición de un genotipo alterado que es hereditario.

Las bacterias son los únicos organismos, con la posible excepción de los hongos, conocidos por su capacidad de transformación en las condiciones naturales, aunque las células de organismos superiores, incluyendo las de los mamíferos y por tanto el hombre, son transformables por técnicas de laboratorio [15]. Probablemente, una minoría de especies bacterianas son naturalmente transformables, pero para algunas como *Bacillus*, *Streptococcus* y *Haemophilus* spp., la transformación parece ser la forma principal de intercambio genético, comparable en importancia a la conjugación y la transducción en otras especies. Estos organismos han desarrollado mecanismos altamente eficaces para liberar, captar e incorporar DNA. Bajo condiciones que favorecen la transformación, algunas células en la población actúan como donantes liberando DNA, ya sea por lisis o tal vez por excreción, mientras que otras células captan el DNA y lo incorporan en su genoma.

La primera demostración de la existencia de la transformación bacteriana fue a través de un experimento *in vivo* iniciado en 1928 con el trabajo de un bacteriólogo inglés, Fred Griffith (figura 1.6). Griffith descubrió que cuando bacterias vivas avirulentas (formas R) de *S. pneumoniae*, y bacterias virulentas (formas S) muertas por calor se inoculaban conjuntamente a un ratón, éste enfermaba y llegaba a morir. A partir de los animales muertos se aislaron bacterias S. Así pues, “algo” en las bacterias S muertas provocaba un cambio permanente en el fenotipo de las células R. Griffith concluyó que las formas R habían sido transformadas por las formas S, sin saber en ese momento qué sustancia había causado este cambio morfológico. A este proceso se le denominó transformación [16].

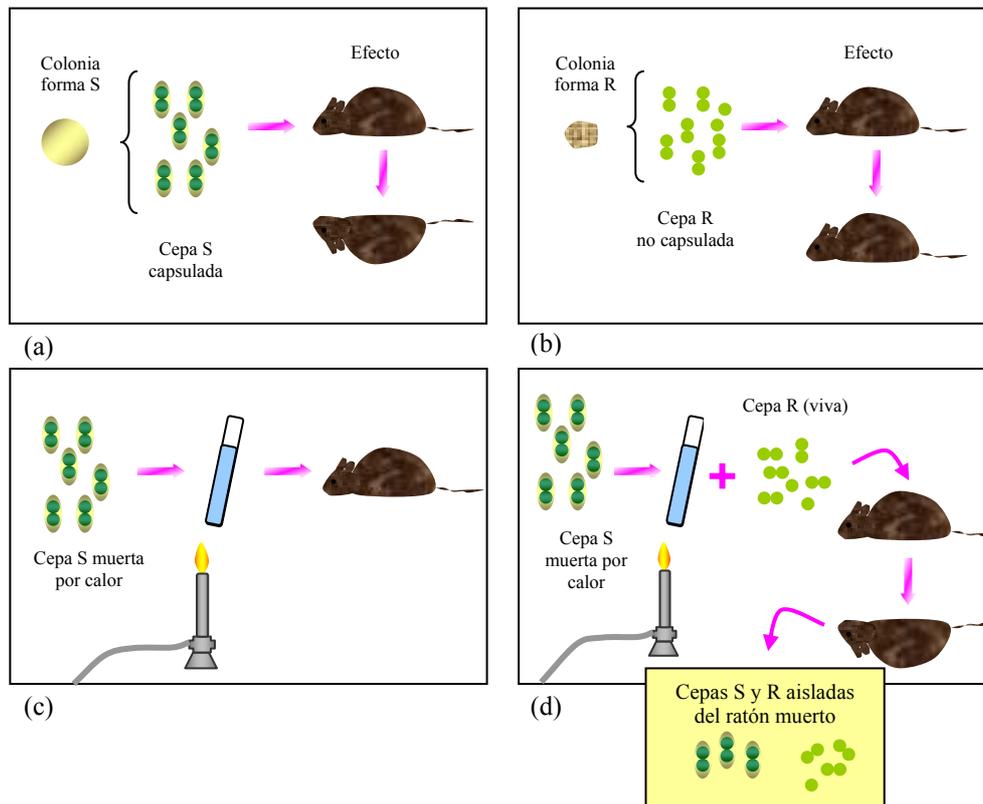


Fig. 1.6. Experimento de transformación llevado a cabo por F. Griffith en el año 1928. (a) Formas S de *S. pneumoniae* en ratón producen su muerte. (b) Formas R de *S. pneumoniae* en ratón son avirulentas. (c) Formas S inactivadas por calor no producen virulencia en el ratón. (d) Formas R no virulentas, juntamente con formas S virulentas muertas por calor, llevan a la muerte del ratón. El material genético de las formas S es adquirido por las formas R, transformándolas en cepas virulentas.

En 1944 Oswald Avery y sus colegas en el Rockefeller Institute en Nueva York demostraron que el material que se intercambiaba y principio transformador en el experimento de Griffith era el DNA. Para demostrarlo, realizaron transformaciones *in vitro* usando un extracto de células bacterianas. Tratando el extracto con enzimas para destruir todos los polisacáridos, lipasas para destruir los lípidos, proteasas para destruir todas las proteínas y RNasa para destruir el RNA, observaron que no se destruía la capacidad de los extractos para transformar la bacteria. Por el contrario, tratando los extractos con DNasa, se abolía su capacidad de transformación. Así pues, el DNA era el único material procedente de las células muertas capaz de transformar.

En la actualidad, el proceso de transformación en los organismos transformables de forma natural puede dividirse en cinco etapas, cada una de las cuales puede ser analizada independientemente [15;17]:

- (i) inducción de un estado de competencia
- (ii) interacción de las células con el DNA
- (iii) adquisición del DNA
- (iv) formación de un complejo preintegrativo
- (v) integración y expresión del DNA en el cromosoma de la cepa receptora.

Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas siguen estas etapas básicas, aunque utilizan distintos mecanismos durante el proceso, probablemente debido a la diferencia estructural de sus envueltas celulares. En el apartado que se desarrollará a continuación se tratará más concretamente el fenómeno de la transformación en bacterias Gram positivas.

1.3.2. TRANSFORMACIÓN Y COMPETENCIA EN BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Generalmente se asume que el DNA puede ser liberado al medio como resultado de una lisis bacteriana espontánea, por digestión, por acción de bacteriófagos, etc. Cada microambiente es probablemente diferente con respecto a su contenido en nucleasas, proteasas, sales y otros agentes o factores capaces de promover la liberación del DNA de la bacteria, de su degradación o de su protección. Por estos motivos, se puede asumir que existe DNA a distintas concentraciones en casi todos los entornos. Por otra parte, el tamaño y el estado físico del DNA pueden variar, influyendo en la capacidad de incorporación del mismo en la bacteria receptora [17]. La capacidad bacteriana de captar DNA libre del medio circundante se conoce como mecanismo de competencia.

En la mayoría de bacterias transformables de forma natural como *S. pneumoniae* la competencia es un estado transitorio inducible, mientras que en otras como *Neisseria gonorrhoeae* la competencia es constitutiva. En *Haemophilus influenzae*, por ejemplo, el desarrollo de la competencia empieza cuando la bacteria se transfiere a un medio definido que no permite el crecimiento o cuando la división celular se bloquea bajo condiciones permisivas para la síntesis proteica. Existen otros casos en los que la competencia se desarrolla una vez las bacterias empiezan a crecer y alcanzan su máxima eficiencia de transformación durante la etapa logarítmica, como en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* [16], o durante la transición de la etapa logarítmica a la estacionaria, como se observa en *Bacillus subtilis*. En *Mycobacterium smegmatis*, por ejemplo, la competencia tiene lugar durante toda la etapa exponencial y disminuye durante la fase estacionaria. Así pues, el desarrollo de la competencia vendrá determinado, en parte, por la etapa de crecimiento en que se encuentre cada especie bacteriana.

1.3.3. DESARROLLO DEL ESTADO DE COMPETENCIA EN *S. pneumoniae*

1.3.3.1. Condiciones para el desarrollo de la competencia

La capacidad de transformación genética en *S. pneumoniae* depende del estado de competencia. El estado de competencia en *S. pneumoniae*, al igual que en la mayoría de las bacterias transformables, se alcanza únicamente bajo ciertas condiciones de crecimiento. Una cepa transformable de *S. pneumoniae* llegará a ser competente si se cultiva en un medio apropiado y si se alcanza una concentración bacteriana que puede variar alrededor de 10^5 a 10^8 ufc/ml [18;19]. La densidad celular crítica para el desarrollo de la competencia depende de la composición del medio, de la cepa y de otros factores como el pH. Por ejemplo, alteraciones en el pH inicial del medio de cultivo (en el rango de 6.8 a 8.0) afectan marcadamente la densidad poblacional para el desarrollo de la competencia. En medios con un pH inicial bajo se observa un solo pico de competencia, mientras que a pH más alcalinos se observan una serie de ciclos de competencia, pero con una proporción más elevada de células competentes en el ciclo inicial [19].

1.3.3.2. Regulación de la competencia

La competencia en *S. pneumoniae* no es constitutiva, sino que está regulada por los productos génicos del operón *com* [20-22]. Este operón contiene tres genes: *comC*, *comD*, y *comE*, directamente implicados en la regulación de la competencia. El gen *comC* codifica un péptido de estimulación de la competencia (CSP), también llamado activador o factor de competencia (CF), que tiene la capacidad de inducir la transformación genética. Los genes *comD* y *comE* codifican una proteína transmembranal denominada histidina quinasa y una proteína reguladora de respuesta, respectivamente. Existe otro operón, denominado *comAB*, que también juega un papel importante en la coordinación del desarrollo espontáneo de la competencia en los cultivos de *S. pneumoniae*, ya que es el encargado de exportar el péptido CSP, codificado por el gen *comC* [23].

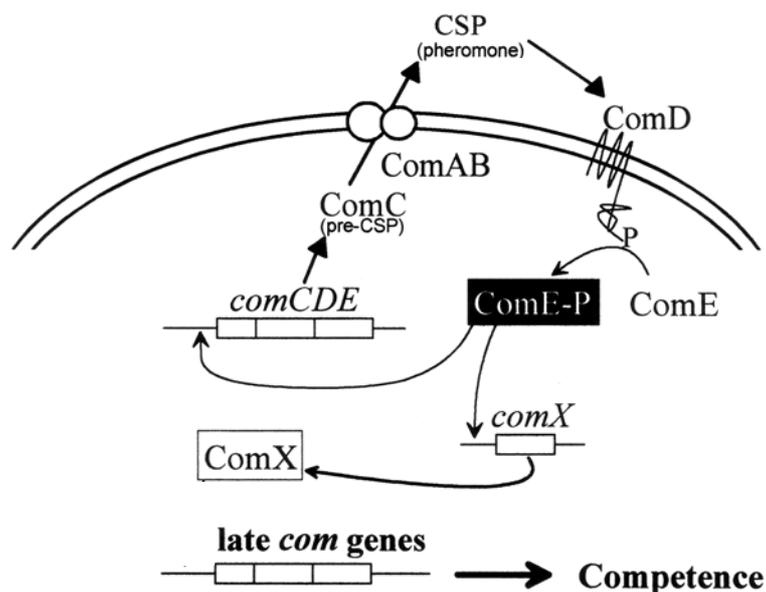


Fig. 1.7. Esquema simplificado del desarrollo de la competencia en *S. pneumoniae*, tomado de G. Alloing *et al.* [21].

En la figura 1.7 se muestra un esquema del desarrollo de la competencia en el neumococo y de los genes implicados. El CSP se libera de manera continua en los cultivos en crecimiento, alcanzando rápidamente concentraciones efectivas a elevadas densidades celulares. Se secreta y se procesa por el aparato de secreción constituido por el sistema de transporte ComAB [20-22], e induce el estado de competencia, que dura únicamente unos 15-20 minutos [18;24], cuando su concentración en el medio alcanza un nivel crítico [22;25;26]. A esta concentración, la señal es percibida por el receptor de CSP, ComD, unido a la membrana, que probablemente activa ComE por transferencia de un grupo fosfato al módulo receptor conservado de este regulador de respuesta. Presumiblemente, la forma fosforilada de ComE actúa como sitio promotor para aquellos genes cuyos niveles de expresión están regulados durante el desarrollo de la competencia [22].

El regulador ComX, recientemente identificado, se requiere para la expresión de muchos genes específicos de la competencia que comparten una secuencia consenso no habitual en sus regiones promotoras (TACGAATA) [24]. La expresión de ComX activa la transcripción de los últimos genes *com* ("late *com* genes") que juntos constituyen un regulón

de la competencia que contiene distintas proteínas involucradas en la unión, el procesado, la adquisición y la recombinación del DNA [21;24;27].

1.3.3.3. El estado de competencia y la transformación en *S. pneumoniae*

Un aspecto importante del metabolismo del neumococo con una gran influencia en la transformabilidad es su estado capsular: las cepas capsuladas son normalmente no competentes, en contraste con las formas rugosas no capsuladas de las cuales derivan [18]. Concretamente, los primeros estudios de transformación genética en *S. pneumoniae* demostraron que ciertos mutantes no capsulados y, por tanto, avirulentos podrían ser transformados *in vitro* y adquirir la resistencia antibiótica y el tipo capsular de la cepa donadora con elevada eficiencia (frecuencias mayores a 1 transformante por cada 100 a 1000 células viables) [28]. Sin embargo, la eficiencia de transformación de organismos capsulados resultó ser significativamente inferior (menos de 1 transformante por cada 10^6 células viables) [28]. Más adelante se demostró que la eficiencia de transformación disminuía con el aumento del tamaño de la cápsula [22;29]. Estos estudios demostraron que la transformabilidad natural de *S. pneumoniae* no es un rasgo presente en todas las cepas de neumococo, sino que existen cepas que son naturalmente no competentes, debido a distintos factores. Puede deberse a defectos en la producción o secreción de CSP o bien a que el CSP queda atrapado en la cápsula, pese a una normal producción del factor de competencia. En estos casos en los que la cápsula interfiere en la transformación, si la inducción de la competencia se realiza durante la fase de latencia o la fase logarítmica temprana (cuando la producción de cápsula es mínima) puede conseguirse un aumento de la capacidad de transformación de la bacteria. Si no resulta efectivo, puede añadirse CSP exógeno en exceso, de manera que puede llegar a penetrar a través de la cápsula e inducir el estado de competencia. Hay que tener en cuenta que cuando se añade CSP a suspensiones de células no competentes, se inducen elevados niveles de competencia en un periodo de tiempo muy breve (entre 10 y 20 minutos). El CSP puede recuperarse de los sobrenadantes de cultivos de estreptococos, como una proteína pequeña de 5.000 a 10.000 Da [30]. Como resulta lógico pensar, se encuentran distintos tipos específicos de factores de competencia entre varias especies neumocócicas.

Pese a que la adición de factor de competencia exógeno puede provocar la competencia de algunos neumococos capsulados y virulentos [19;28], no todas las cepas

pueden llegar a ser transformables. Esta falta de capacidad de transformar algunas cepas, incluso tras la inducción, puede ser el resultado de defectos específicos en el procesado del DNA, que no puede ser suplido por la adición de CSP exógeno u otros factores.

Una explicación posible de la falta de capacidad de transformación de un elevado porcentaje de cepas de neumococo con CSP sintéticos es que existan alelos *comC* y *comD* no relacionados en una misma cepa. Estudios recientes han mostrado que puede darse el fenómeno de transferencia génica horizontal entre operones *com* de distintas especies de estreptococos, generando de este modo genes en mosaico [20;22]. El análisis comparativo de las variaciones en las secuencias de *comC* y *comD* muestra que la falta de transformabilidad de muchas cepas de *S. pneumoniae* en el laboratorio se debe a la evidencia de la transferencia génica horizontal en el operón *com*. Estos descubrimientos evidencian la posibilidad de que la presencia de alelos *comC* y *comD* no relacionados pueda ser la causa de la imposibilidad de inducir competencia en muchos aislados.

Otra explicación al hecho de que muchas cepas de *S. pneumoniae* no sean transformables bajo condiciones de laboratorio es la presencia de dos variantes alélicas del gen *comC* que codifica para el péptido CSP: *comC1* y *comC2* [31]. Los péptidos sintéticos CSP-1 y CSP-2 correspondientes pueden ser utilizados para inducir la competencia en cepas de neumococo, que pueden llegar a ser competentes tras la adición de un u otro péptido, de ambos o bien no llegar a serlo [31]. En general, parece ser que la mayoría de cepas que llevan el alelo *comC1* no se les puede inducir el estado de competencia con el péptido CSP-2 codificado por el alelo *comC2*, y viceversa [22].

La proporción de células capaces de captar DNA en un cultivo puede estimarse a partir de la eficiencia de transformación obtenida, expresada generalmente como el número de transformantes por μg de DNA y puede variar según la población bacteriana. En *S. pneumoniae* la eficiencia de transformación descrita puede llegar a ser muy elevada, aunque dependerá del tipo capsular [25;28].

1.3.4. UNIÓN Y ENTRADA DEL DNA

El DNA adquirido durante la transformación genética puede reemplazar eficientemente regiones homólogas del cromosoma del microorganismo receptor y, consecuentemente, provocar un cambio permanente en el genotipo y, por tanto, en el fenotipo celular. Tal y como se ha visto en el apartado 1.3.3, este proceso depende de la expresión de un conjunto de genes cuyos productos están involucrados en la unión, adquisición e integración de DNA extracelular.

En la figura 1.8 se muestra un esquema de la unión y la entrada del DNA en *S. pneumoniae*.

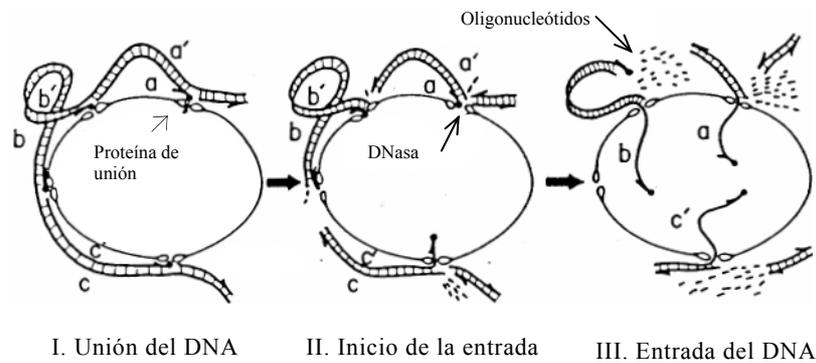


Fig. 1.8. Entrada de DNA exógeno en *S. pneumoniae* en el inicio del proceso de transformación.

La entrada de DNA implica la actividad de nucleasas de membrana, que degradan una de las dos hebras de la cadena del DNA exógeno unido a la célula. Al inicio de la entrada, tiene lugar la rotura de la doble cadena, con la consecuente entrada de segmentos de cadena sencilla en la célula, a la vez que la hebra complementaria es digerida por una nucleasa unida a la membrana. La cadena sencilla llega a estar asociada con una proteína específica de la competencia para formar un complejo. Finalmente, la integración incluye el reemplazo de una cadena del DNA receptor por la cadena donadora y la recombinación entre el cromosoma aceptor y el fragmento de DNA donador de cadena sencilla.

1.3.5. INTEGRACIÓN DEL DNA

1.3.5.1. Genes implicados en la recombinación

Los mecanismos de recombinación en *S. pneumoniae*, se han llegado a comprender gracias al estudio de mutantes que reducen la frecuencia de transformación, aunque únicamente se han caracterizado a nivel molecular dos genes implicados en la recombinación: *recA* y *mmsA* [32]. El gen *recA* codifica una proteína esencial para la recombinación homóloga y forma parte de un operón que es inducible en células competentes por el péptido de estimulación de la competencia CSP. En cuanto al gen *mmsA*, los mutantes correspondientes exhiben una elevada sensibilidad a la luz UV y a los rayos X, así como una reducción de la capacidad de recombinación.

En el proceso de recombinación del DNA exógeno en el cromosoma bacteriano interviene también un sistema generalizado de reparación (*mismatch repair system*), denominado sistema Hex, que corrige errores potencialmente mutagénicos. La inactivación de cualquiera de los genes *hexA* y *hexB* que forman parte del sistema Hex, confiere un fenotipo mutante que anula el sistema de reparación durante la transformación [33]. La frecuencia de recombinación homóloga disminuye con la divergencia de la secuencia entre el donador y el receptor. El sistema HexAB corrige errores puntuales que tienen lugar durante la recombinación. La proteína HexA reconoce errores en el DNA heteroduplex y es capaz de extraer la cadena sencilla donadora entera y prevenir la recombinación. Sin embargo, mientras que el papel del sistema Hex consiste en detectar errores puntuales hay evidencias de que el sistema puede saturarse con facilidad si la presencia de errores en el DNA es elevada, pudiendo no actuar como una barrera eficiente de la recombinación [32]. A diferencia de *recA*, cuando se comparan extractos de cultivos competentes y no competentes se observa que no hay ningún cambio en la concentración de proteínas HexA y HexB, sugiriendo que los genes *hexA* y *hexB* no son inducidos durante la competencia. Se ha observado que el sistema Hex impide la integración cromosómica de fragmentos de DNA ligeramente divergentes (alrededor de un 2%) y claramente divergentes (alrededor de un 20 %) en el DNA receptor, mientras que no lo hace de fragmentos con un porcentaje de similitud intermedio [34].

Un tercer fenómeno posiblemente involucrado en la reparación de errores está determinado por la mutación *pms* [34]. Esta mutación afecta también a la reparación del DNA, la recombinación y el sistema de reparación mediado por Hex, aunque todavía se desconocen muchos otros aspectos. La caracterización del gen *pms* podría suponer un avance en la comprensión de la relación entre la reparación de errores y la recombinación.

1.3.5.2. Papel de MmsA, RecA y Hex en la transformación

El proceso de recombinación durante la transformación en *S. pneumoniae* consta de cuatro etapas básicas (figura 1.9). En primer lugar, la proteína RecA inicia el proceso de asimilación de un DNA donador de cadena simple que conduce a la formación de una región heterodúplex donador-receptor. Seguidamente, la proteína MmsA del neumococo reconoce específicamente la estructura de tres hebras y se une a ella, haciendo que la unión se desplace para extender la región heterodúplex.

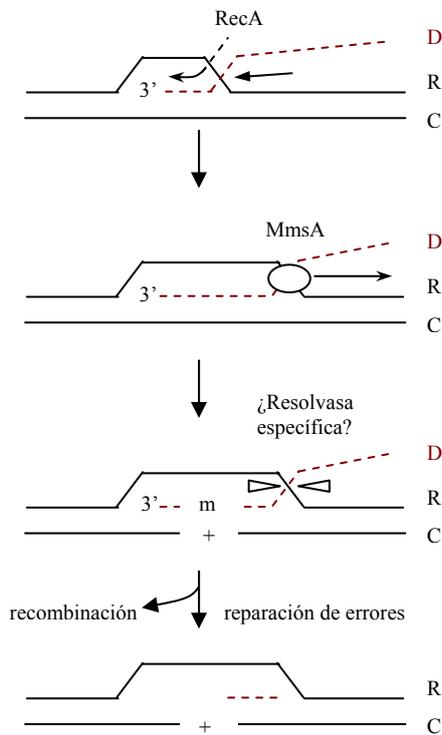


Fig. 1.9. Entrada de DNA exógeno en *S. pneumoniae* en el inicio del proceso de transformación [34]. D, hebra sencilla del donador; R, hebra del receptor de la misma polaridad; C, hebra complementaria del receptor; m/+, presencia de un error.

La incisión simultánea del receptor y el donador (indicada por triángulos en la figura 1.9) puede requerir la intervención de una resolvasa específica. La ligación generaría entonces el producto final recombinante. Alternativamente, en presencia de un error (m/+), el sistema Hex aborta la recombinación.

1.4. AGENTES ANTIMICROBIANOS Y RESISTENCIA BACTERIANA

Inicialmente, se denominó antibiótico a cualquier sustancia producida por un microorganismo capaz de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. En la actualidad, se denomina antibiótico a toda sustancia de origen natural, sintético o semisintético con efecto antimicrobiano, que actúa o ejerce su acción a nivel molecular, en un proceso metabólico o en una estructura concreta de un microorganismo [35].

La característica más relevante de un antibiótico es su toxicidad selectiva. La toxicidad selectiva se consigue gracias a las diferencias intrínsecas existentes entre el huésped y el organismo invasor. Este es uno de los principales factores que permite crear antibióticos contra las bacterias, ya que estos son procariontes y, como tales, difieren de manera significativa de las células humanas. Esta propiedad supone que el antibiótico ha de tener un mecanismo de acción que afecte estructuras o procesos bacterianos que no existan o sean marcadamente diferentes de las células del huésped.

De acuerdo con el patrón de sensibilidad o resistencia natural de los microorganismos, pueden clasificarse los antibióticos en agentes de amplio espectro y compuestos de espectro reducido. Los antibióticos de espectro reducido afectan sólo a un grupo concreto de microorganismos y son la mejor elección cuando se conoce el agente causante de la infección. Estos compuestos actúan específicamente sobre los microorganismos sensibles y no son activos frente a la mayor parte de la microbiota que protege el cuerpo humano.

En cambio, los antibióticos de amplio espectro son activos frente a dos o más grupos de microorganismos. La ampicilina, por ejemplo, es activa tanto contra bacterias Gram positivas como bacterias Gram negativas y su uso determina una gran ventaja frente a infecciones producidas por agentes desconocidos. Aun así, los antibióticos de amplio espectro

de actuación pueden alterar de forma significativa la flora bacteriana del hombre, permitiendo que otros microorganismos colonicen y causen una sobreinfección.

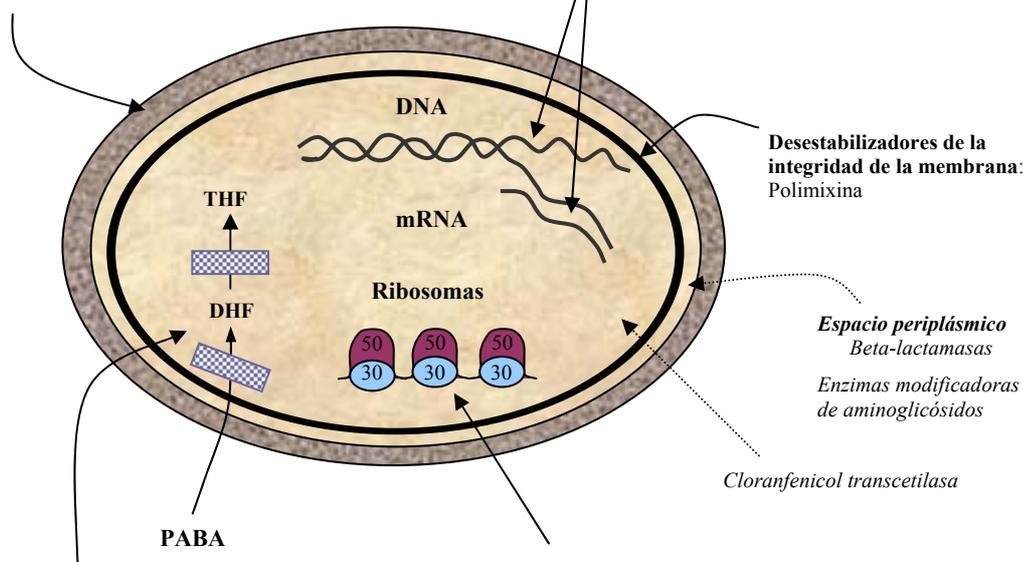
Según su mecanismo de acción, los agentes antimicrobianos se clasifican en: inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibidores de la síntesis de proteínas, inhibidores de la síntesis de peptidoglicano y desestabilizadores de la integridad de la membrana (figura 1.10).

Inhibidores de la síntesis de peptidoglicano

- Inhibidores de la síntesis de precursores en el citoplasma: Fosfomicina
- Inhibidores del transporte de precursores: Bacitracina
- Inhibidores del ensamblaje: Vancomicina y β -lactámicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactams y Carbapenems)

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

- Inhibidores de la DNA girasa: Quinolonas
- Inhibidores de la RNA polimerasa: Rifampicina



Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

- Inhibidores del metabolismo de nucleótidos (de la biosíntesis del ácido tetrahidrofólico -THF-, sustrato donador de carbonos en la síntesis de purinas y pirimidinas): Trimetoprim
Sulfonamidas

Inhibidores de la síntesis proteica

- Inhibidores de la subunidad 50S del ribosoma: Macrólidos (eritromicina)
Cloranfenicol
Clindamicina
- Inhibidores de la subunidad 30S del ribosoma: Tetraciclina
Aminoglicósidos
Estreptomina
Gentamicina
Tobramicina
Amikacina

Fig. 1.10. Esquema de los mecanismos de acción de los antibióticos.

1.4.1. QUINOLONAS

Las quinolonas son agentes antimicrobianos de síntesis química, cuyo principal mecanismo de acción es la inhibición de las enzimas DNA girasa y topoisomerasa IV. Las fluoroquinolonas, también llamadas 4-quinolonas o ácidos carboxílico-quinolona son análogos del ácido nalidíxico, el primer agente antibacteriano desarrollado de esta familia de antibióticos. Se consideran una clase relativamente nueva de antimicrobianos de amplio y potente espectro de acción. En comparación con el ácido nalidíxico, las nuevas fluoroquinolonas han mejorado las propiedades farmacocinéticas, incluyendo una mayor absorción oral, un incremento de la concentración máxima en el suero, concentraciones mayores en los tejidos y tiempos más largos de vida media. Las reacciones adversas asociadas al uso de las fluoroquinolonas afectan principalmente al sistema gastrointestinal, la piel y el sistema nervioso central.

1.4.1.1. Dianas principales de las fluoroquinolonas

Las fluoroquinolonas interfieren en el metabolismo bacteriano del DNA por la inhibición de dos topoisomerasas (DNA girasa y topoisomerasa IV). Las DNA topoisomerasas son enzimas que controlan y modifican la topología del DNA en las células. La enzima DNA girasa es una topoisomerasa de tipo II que cataliza el superenrollamiento negativo del DNA procariótico, utilizando la energía libre liberada por la hidrólisis del ATP. Así pues, la DNA girasa introduce superenrollamientos en la doble hélice dando lugar a la estructura tridimensional altamente condensada del DNA. La función de la topoisomerasa IV es poco conocida aunque se sabe que, a diferencia de la DNA girasa, es una enzima incapaz de catalizar el superenrollamiento del DNA pero sí de controlar su relajación. Ambas enzimas presentan una gran homología en las secuencias y son estructuralmente muy parecidas. Tanto la DNA girasa como la topoisomerasa IV son proteínas tetraméricas constituidas por dos subunidades. La DNA girasa está constituida por las subunidades GyrA y GyrB y la topoisomerasa IV por las subunidades ParC y ParE [36-38]. La proteína ParC es homóloga a la proteína GyrA, mientras que la subunidad ParE es homóloga a la subunidad GyrB.

Estas enzimas, dependiendo del tipo de bacteria, representan la diana principal o secundaria de la acción antimicrobiana de las quinolonas. La DNA girasa es la diana principal

de las fluoroquinolonas en las bacterias Gram negativas, mientras que la topoisomerasa IV parece ser la diana principal de muchas fluoroquinolonas en las bacterias Gram positivas, como *S. pneumoniae* y *S. aureus* [36]. Sin embargo, existen trabajos que indican que la principal diana de determinadas fluoroquinolonas frente a bacterias Gram positivas puede ser la DNA girasa. Este es el caso de la esparfloxacina, que parece actuar principalmente en la DNA girasa de *S. pneumoniae* [36].

1.4.1.2. Relación entre estructura y actividad

Las distintas quinolonas comparten un esqueleto común, que determina su actividad antimicrobiana, así como la naturaleza de los sustituyentes periféricos y su relación espacial [39-41]. En la figura 1.11 se muestran los lugares que determinan la relación entre la estructura química y la actividad de las quinolonas.

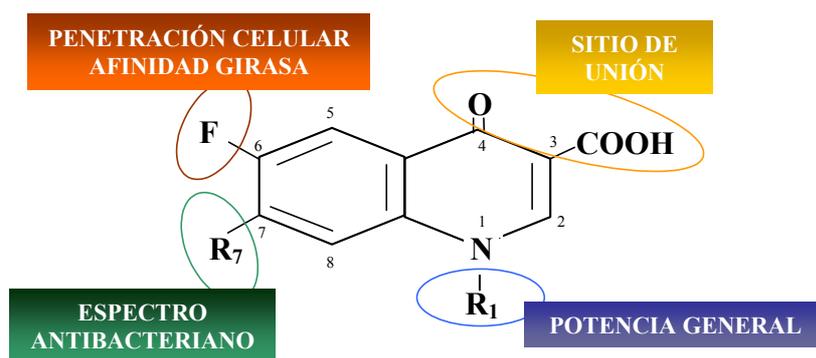


Fig. 1.11. Lugares que determinan la relación entre la estructura química y la actividad de las quinolonas.

Los grupos carboxílico (C-3) y carbonilo (C-4) son esenciales para la actividad bactericida, porque median la unión del complejo DNA-DNA girasa. En cuanto a la presencia de un átomo de flúor en la posición C-6 parece ser que está asociada a una mayor potencia antibacteriana respecto a otros sustituyentes como H, Cl, Br, COCH₃, CN o NO₂. En concreto, se le atribuye un aumento de la inhibición de la DNA girasa y una mayor penetración en la célula. Sin embargo, no se ha observado una correlación entre la concentración de quinolona acumulada intracelularmente y el número de átomos de flúor del núcleo de la quinolona (mono, di o trifluorada) [42]. En la posición C-7 de la molécula los sustituyentes pequeños

tienen una moderada actividad biológica, mientras que aquellas quinolonas que tienen un anillo heterocíclico en esta posición presentan una mayor actividad antibacteriana. Por último, se ha demostrado que la potencia antibacteriana está enormemente influida por el sustituyente en la posición N-1 [41]. Los cationes divalentes o trivalentes pueden alterar la absorción de todas las fluoroquinolonas.

1.4.1.3. Mecanismo de acción

Los pasos secuenciales de la acción antibacteriana de una quinolona se resumen en:

- 1) Paso del antibiótico a través de las envueltas celulares de la bacteria hasta alcanzar el citoplasma.
- 2) Inhibición de al menos una de las enzimas diana de las quinolonas: DNA girasa y/o topoisomerasa IV.
- 3) Inhibición de la síntesis replicativa del DNA.
- 4) Inducción de la respuesta SOS y otros efectos en la estructura celular y respuesta bioquímica.

En la figura 1.12 se esquematiza el mecanismo de acción de las quinolonas.

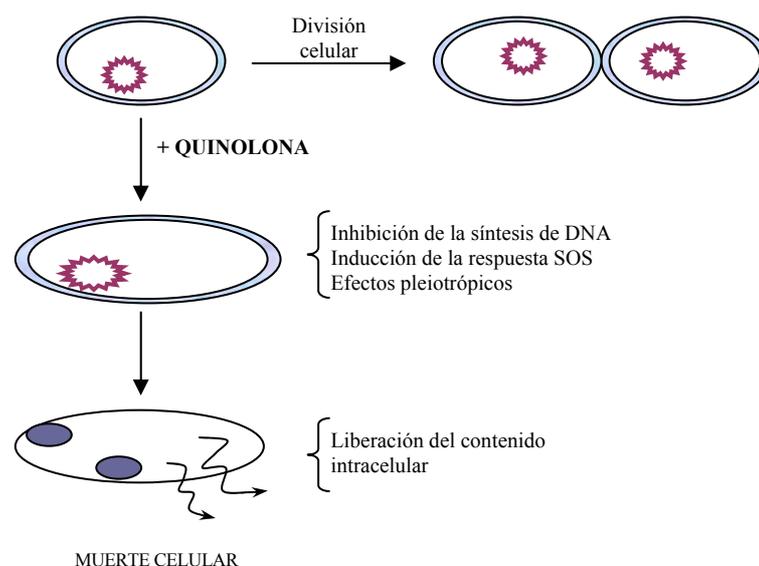


Fig. 1.12. Mecanismo de acción de las quinolonas

1.4.1.4. Clasificación y espectro antimicrobiano

Por analogía con otras familias de antibióticos, puede establecerse un criterio de clasificación de las quinolonas por generaciones (tabla 1.5). La primera generación incluye el ácido nalidíxico y la cinoxacina, que son las quinolonas más antiguas y menos utilizadas en la actualidad. Su uso se ha restringido al tratamiento de infecciones no complicadas del tracto urinario, ya que alcanzan niveles muy bajos en el suero. Por otra parte, requieren una dosis más frecuente que las quinolonas posteriores (de segunda generación y siguientes) y son además más susceptibles al desarrollo de la resistencia bacteriana [43].

Tabla 1.5. Clasificación de las principales quinolonas y espectro antimicrobiano correspondiente.

<i>Clasificación</i>	<i>Agentes</i>	<i>Espectro antimicrobiano</i>	<i>Indicaciones clínicas generales</i>
Primera generación	Ácido nalidíxico Cinoxacina	Bacterias Gram negativas (a excepción de <i>Pseudomonas</i> spp.)	Infecciones del tracto urinario no complicadas
Segunda generación	Norfloxacin Ciprofloxacina Lomefloxacina Enoxacina Ofloxacina	Bacterias Gram negativas (incluyendo <i>Pseudomonas</i> spp.) Algunas bacterias Gram positivas y algunos patógenos atípicos	Infecciones del tracto urinario complicadas y no complicadas y pielonefritis, enfermedades de transmisión sexual, infecciones de tejidos suaves y piel
Tercera generación	Levofloxacina Esparfloxacina Gatifloxacina Moxifloxacina	Igual a los de segunda generación, pero mayor actividad frente a Gram positivos (neumococos sensibles y resistentes a penicilina) y mayor actividad frente a patógenos atípicos	Exacerbaciones agudas de bronquitis crónica, neumonía adquirida en la comunidad
Cuarta generación	Trovafloxacina	Mismo espectro de actividad que los de tercera generación más frente a anaerobios	Igual a los agentes de primera, segunda y tercera generación (sin incluir infecciones del tracto urinario complicadas y pielonefritis) e infecciones abdominales, neumonía nosocomial, infecciones pélvicas

La segunda generación de quinolonas, entre las que se incluye la ciprofloxacina, ha aumentado la actividad frente a bacterias Gram negativas, así como frente a algunas Gram positivas y patógenos atípicos. Comparados con los de primera generación, estos agentes tienen una aplicación clínica más amplia en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y de

pielonefritis, enfermedades de transmisión sexual, ciertas neumonías e infecciones de la piel. Aunque esta segunda generación de antibióticos se ha utilizado en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio inferior y sinusitis aguda, se ha comprobado que *S. pneumoniae* es habitualmente resistente a estos agentes. Consecuentemente, la segunda generación de quinolonas no es la mejor opción para el tratamiento de este tipo de enfermedades.

La tercera generación de quinolonas incluye la levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina y esparfloxacina. Éstas tienen una mayor actividad frente a organismos Gram positivos, particularmente frente a neumococos sensibles y resistentes a penicilina. Pese a ello, son menos activas que la ciprofloxacina frente a especies de *Pseudomonas*. Son quinolonas útiles en el tratamiento de neumonías adquiridas en el ambiente extrahospitalario y sinusitis aguda, entre otras enfermedades.

Se ha establecido una cuarta generación de quinolonas, constituida por el antibiótico trovafloxacina, que añade una actividad antimicrobiana frente a anaerobios, mientras que mantiene la actividad de las quinolonas de tercera generación frente a Gram positivos y Gram negativos [43]. También mantiene una actividad comparable a la ciprofloxacina en especies de *Pseudomonas*.

1.4.2. LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

1.4.2.1. Generalidades

El descubrimiento de los antibióticos ha representado una de las revoluciones más espectaculares en la medicina del siglo XX: en el año 1940 los científicos británicos H. W. Florey y E. B. Chain que demostraron que la penicilina, observada por Fleming en el 1929, podía convertirse en una substancia quimioterapéutica efectiva. Desde entonces se han descubierto y sintetizado una gran cantidad de antimicrobianos que son efectivos en el tratamiento de la enfermedad infecciosa y han permitido, desde finales de los años 40, vencer infecciones antes incurables (neumonías, meningitis, tuberculosis, sífilis, etc.).

Pero el hombre y los microorganismos evolucionan conjuntamente de modo que, si el ser humano aprende a defenderse de la enfermedad infecciosa mediante el uso de antibióticos, cincuenta años después, la rápida adaptabilidad de las poblaciones bacterianas ha llevado a la aparición de cepas resistentes a diferentes antimicrobianos. Las primeras noticias sobre cepas resistentes se remontan al segundo año de la aparición del primer antibiótico, cuando se detectaron las primeras cepas de estafilococos resistentes a penicilina. En los años setenta, la industria farmacéutica creía que los antibióticos de los que disponía eran suficientes para combatir las enfermedades infecciosas y hacer frente a los fenómenos de resistencia, que entonces se creía estaban confinados en los hospitales. A finales de los años ochenta, la aparición de cepas multiresistentes y de resistencias extrahospitalarias, hizo plantear a la industria farmacéutica la necesidad de sintetizar nuevos agentes antimicrobianos capaces de resolver el problema de las resistencias. En la actualidad, las compañías farmacéuticas continúan sus esfuerzos en la creación de antibióticos más eficaces, con un mayor espectro de actividad y un nivel de toxicidad menor.

Las bacterias presentan características que pueden influir poderosamente en la aparición, la persistencia y la transmisión de los genes que codifican para la resistencia a los agentes antimicrobianos. Entre estos cabe destacar las propiedades intrínsecas que las hacen resistentes a los antibióticos, la facilidad de intercambio de material genético (transmisión genética horizontal), la elevada capacidad de supervivencia después de haber modificado las condiciones ambientales, la facilidad de colonización y de infección bacterianas y, muy especialmente, su capacidad de crecer siguiendo una cinética exponencial que les permite colonizar en un periodo de tiempo muy breve.

Entre los factores que favorecen la expansión de microorganismos resistentes cabe destacar, por un lado, la presión selectiva ejercida por el uso de los antibióticos, y por otro lado, la facilidad con la que los organismos resistentes llegan a sus huéspedes a través de la infección. El uso, y en ocasiones el abuso, extensivo de antibióticos ha ocasionado un aumento en la frecuencia de aislamiento de microorganismos resistentes. También hay que destacar que la introducción de agentes antimicrobianos de amplio espectro ha proporcionado una presión selectiva a un elevado número y variedad de microorganismos. Otro factor que contribuye de forma notoria en la evolución de bacterias hacia la multiresistencia es el uso de antibióticos en medicina veterinaria y en la alimentación de animales para consumo humano.

En la ganadería, los antibióticos se utilizan con una finalidad profiláctica, terapéutica o como promotores del crecimiento (*Antibiotic Growth Promoters -AGPs-*). Algunos de estos AGPs están relacionados estructuralmente con antibióticos utilizados en medicina humana, de manera que bacterias resistentes encontradas en animales pueden fácilmente ser resistentes a antibióticos utilizados por humanos. Es lo que se conoce con el nombre de resistencia cruzada (*cross-resistance*). Estas bacterias resistentes pueden constituir por sí mismas una amenaza para la salud humana o pueden transferir los genes de resistencia a bacterias capaces de colonizar el hombre.

1.4.2.2. Mecanismos de resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antibióticos en los microorganismos puede ser debida a condiciones intrínsecas (resistencia natural) o bien a la adquisición de cambios genéticos (resistencia adquirida). La resistencia natural o intrínseca a los agentes antimicrobianos se asocia a distintos factores. En primer lugar, algunas especies no tienen la diana de ataque del agente antimicrobiano. Por ejemplo, la penicilina interfiere en la síntesis del peptidoglicano, de manera que si un organismo no tiene este compuesto será resistente de forma natural. Así pues, la penicilina no se prescribe para tratar infecciones causadas por hongos, protozoos o bacterias que no tengan pared celular, como es el caso del micoplasma. Otras especies son resistentes de forma natural porque la sustancia antimicrobiana no puede penetrar en el interior de la célula y ejercer allí su efecto. Por ejemplo, las bacterias Gram negativas están protegidas contra la acción de muchos antibióticos, incluidas la mayoría de las penicilinas, por la impermeabilidad relativa de su membrana externa.

Las cepas bacterianas pueden llegar a ser resistentes a los antibióticos (resistencia adquirida) debido a cambios genéticos. Estos cambios genéticos no están causados por los antibióticos, sino que tienen lugar de forma espontánea, como sucede con todas las mutaciones e intercambios genéticos. No obstante, cuando existen grandes concentraciones de antibióticos en el medio ambiente, las cepas sensibles a éstos son eliminadas, mientras que las cepas resistentes persisten y pueden llegar a ser dominantes. La resistencia a los antibióticos se debe a la presencia de genes que codifican proteínas que protegen los microorganismos.

Los principales mecanismos moleculares y bioquímicos que conducen a la resistencia a los antibióticos pueden distribuirse en tres grupos: alteración o destrucción del antibiótico, modificación de la diana del antibiótico, y modificación de la accesibilidad a la diana, incluyendo la disminución de la permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y las bombas de reflujo, que expulsan el agente antimicrobiano fuera de la bacteria (figura 1.13).

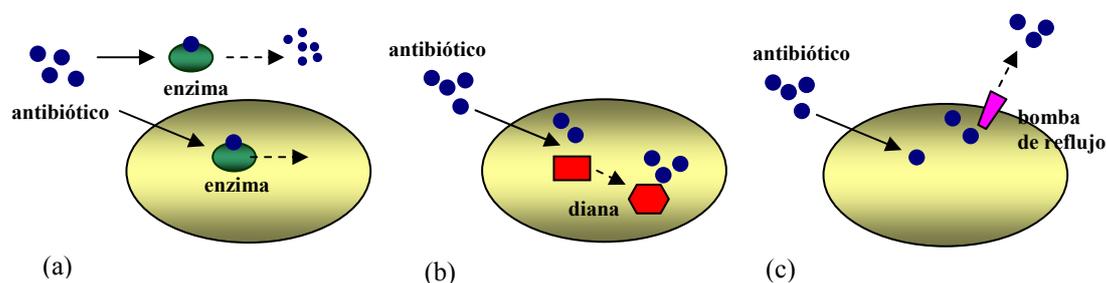


Fig. 1.13. Mecanismos de resistencia a los antibióticos. (a) Inactivación del antibiótico por una enzima. (b) Modificación de la diana del antibiótico. (c) Extrusión del antibiótico por acción de una bomba de reflujo.

a) Alteración o destrucción del antibiótico

Un mecanismo bastante común de resistencia es la producción de enzimas que destruyen los antibióticos, como es el caso de la hidrólisis de antibióticos β -lactámicos por acción de las enzimas β -lactamasas. Otro tipo de resistencia puede deberse a la alteración del agente antimicrobiano (por ejemplo, la fosforilación o acetilación de los antibióticos aminoglicósidos).

b) Modificación de la diana del antibiótico

Las dianas celulares pueden ser alteradas por mutación o modificación enzimática, de tal manera que se reduce la afinidad del antibiótico por la diana. La modificación de la diana del antibiótico de compuestos como los β -lactámicos, los macrólidos, las quinolonas y los antagonistas de la síntesis de folato, son un ejemplo de este mecanismo de resistencia. Por ejemplo, ciertas cepas de *S. pneumoniae* adquieren resistencia a la penicilina a través de una serie de mutaciones que afectan a sus proteínas de unión a la penicilina, denominadas PBPs

(enzimas que catalizan la formación del peptidoglicano), que hacen que las mismas sean incapaces de unirse a la penicilina.

c) Mecanismos que expulsan el antibiótico fuera de la bacteria

Existen mecanismos que hacen más difícil la penetración del antibiótico en la célula bacteriana, debido a una serie de modificaciones de las cubiertas. Además, existen bacterias que desarrollan un sistema de transporte a través de la membrana que las capacita para bombear las moléculas de antibiótico desde el interior hacia el exterior de la célula (bombas de reflujo). Este reflujo activo de clases específicas de antibióticos permite a las bacterias expulsar el agente antimicrobiano una vez ha entrado (por ejemplo, el bombeo de tetraciclina por una proteína Tet).

Todos estos mecanismos no son excluyentes, ya que en un mismo microorganismo pueden estar presentes varios de ellos y actuar de forma cooperativa, de manera que se llegue a niveles tan significativos de resistencia como los que desarrollan las bacterias [44]. En general, el mecanismo de resistencia a quinolonas en bacterias Gram positivas y Gram negativas parece ser el resultado de uno o varios mecanismos de resistencia [45], como alteraciones en las dianas enzimáticas de las quinolonas (DNA girasa/topoisomerasa IV), disminución de la permeabilidad de la membrana externa en bacterias Gram negativas y desarrollo de mecanismos de reflujo.

1.4.2.3. Mecanismos de resistencia a las quinolonas

En principio, la resistencia a las quinolonas puede deberse a mutaciones que afecten al proceso de penetración o de alcance de la diana intracelular de las bacterias (DNA girasa o topoisomerasa IV). Según esto, los mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas pueden agruparse en tres categorías:

1. Resistencias de tipo cromosómico, que dan lugar a mutaciones en una región concreta de los genes que codifican la DNA girasa (especialmente en la subunidad A) y la topoisomerasa IV, denominada QRDR (del inglés "*Quinolone Resistance-Determining Region*") [46].

2. Resistencias por alteraciones en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que disminuyen la penetración intracelular del fármaco. Estas modificaciones se originan en alteraciones de los genes que codifican los canales de las porinas, lo que impide la entrada del antimicrobiano en la bacteria.
3. Resistencias debidas a la expulsión del antibacteriano desde el medio intracelular al extracelular por acción de transportadores.

Sin embargo, no se han descrito enzimas bacterianas capaces de degradar o inactivar las quinolonas en el medio intracelular [46].

Como ya se ha comentado anteriormente, la enzima diana principal de las quinolonas dependerá del tipo de bacteria sobre la que actúe. En bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa*, la DNA girasa es la principal diana de acción de las quinolonas, mientras que en algunas bacterias grampositivas como *S. aureus* y *S. pneumoniae* las primeras resistencias aparecen por mutaciones producidas en la topoisomerasa IV [47;48]. Sin embargo, ya se había apuntado que distintas quinolonas pueden tener distintas dianas en la misma especie bacteriana, hecho que acarrea importantes implicaciones en la práctica clínica. Así pues, sería útil conocer el estado de las regiones QRDR de los genes *parC* y *gyrA* en los agentes causantes de infecciones para evitar las resistencias. Por ejemplo, mutantes en *parC* y no en *gyrA* son resistentes a la ciprofloxacina pero sensibles a la esparfloxacina [49].

Por otro lado, como norma general, se considera que un tamaño voluminoso del antibiótico es un factor limitante en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias Gram negativas, ya que la membrana externa dificulta la entrada. Otros impedimentos se asocian a la carga negativa y al aumento de la hidrofobicidad de la molécula, que parecen tener relevancia tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas.

Las mutaciones QRDR en la girasa o la topoisomerasa IV no son los únicos mecanismos que desarrollan los microorganismos frente a la acción de las quinolonas, sino que existen otros mecanismos que pueden estar implicados en la resistencia, como los

procesos de transporte a través de la membrana, incluyendo los sistemas de reflujo, de los que se hablará con más detalle en el apartado 1.4.3.

La expresión de los transportadores de reflujo está reconocida como causa de la resistencia de bajo nivel a las quinolonas y se considera que existe una relación entre los procesos de expulsión y la estructura de las quinolonas. Por ejemplo, el principal determinante de altos niveles de resistencia de las quinolonas es su hidrofilia, especialmente en microorganismos con proteínas de reflujo NorA, como *S. aureus* [50;51]. En el caso de la bomba de reflujo PmrA de *S. pneumoniae*, Brenwald *et al.* [52] demostraron que las fluoroquinolonas hidrofóbicas eran sustratos pobres de esta proteína.

Este proceso de expulsión es importante ya que puede permitir que las bacterias sobrevivan durante un corto periodo de tiempo y desarrollen resistencias vía mutaciones en los lugares clave de los genes de las dianas de las quinolonas. Los tres tipos de mecanismos de resistencia pueden manifestarse solos o en combinación, si bien se cree que el aumento en el grado de resistencia a las quinolonas *in vivo* se debe a varios mecanismos simultáneos o secuenciales.

1.4.3. LOS SISTEMAS DE REFLUJO

Todas las células, tanto procariotas como eucariotas, tienen sistemas de transporte de membrana involucrados en la captación de nutrientes esenciales e iones y en la excreción de productos tóxicos y sustancias deletéreas fuera del citoplasma [53], un gran número de los cuales se han identificado en los últimos años gracias al desarrollo de las técnicas de clonación y secuenciación. Este hecho ha permitido identificar diferentes familias de transportadores y se ha demostrado que muchos de estos sistemas juegan un papel importante confiriendo resistencia a compuestos tóxicos. Entre estos agentes transportadores destacan las bombas de reflujo, que son sistemas proteicos que bombean el antibiótico fuera del citoplasma con una gran eficacia, disminuyendo la concentración intracelular de ciertas sustancias a niveles por debajo de la toxicidad.

La organización de este tipo de sistemas es distinta en bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas, debido principalmente a las diferencias estructurales de estos dos grandes grupos bacterianos. La envuelta celular de las bacterias Gram positivas, a diferencia de las Gram negativas, tiene una estructura relativamente simple que contiene la membrana citoplásmica y una gruesa capa de peptidoglicano. Es por ello que las bombas de reflujo presentes en las bacterias Gram positivas son más simples en organización y tienen un único componente situado en la membrana citoplásmica (figura 1.13).

En adición a los mecanismos principales de resistencia presentes en las bacterias, como la inactivación de los antibióticos y la alteración de las dianas específicas, las bombas de reflujo juegan un papel importante en la resistencia a múltiples antibióticos. Las bombas de resistencia a múltiples antibióticos (MDRs), que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo bacteriano y eucariota, son translocasas de membrana que tienen la sorprendente habilidad de extraer fuera de la célula una gran variedad de sustancias no relacionadas entre sí. En el caso de las células eucariotas, uno de los sistemas de reflujo más conocidos es el de la glicoproteína P, codificada por el gen *mdr1* humano o de roedor, que confiere resistencia a un amplio rango de agentes citotóxicos vía exportación dependiente de ATP. La glicoproteína P es miembro de una superfamilia de *transportadores ATP-binding cassette* (ABC), presente también en el mundo bacteriano.

Según criterios estructurales y bioenergéticos, los transportadores de resistencia a múltiples antibióticos pueden dividirse en dos clases principales [54]: los transportadores secundarios de múltiples antibióticos (SMT, del inglés, *Secondary Multidrug Transporters*) y los transportadores ABC de múltiples antibióticos (ABC, del inglés, *ABC Multidrug Transporters*). En la figura 1.13 se muestra un esquema del mecanismo de acción de estas dos clases mayoritarias de transportadores.

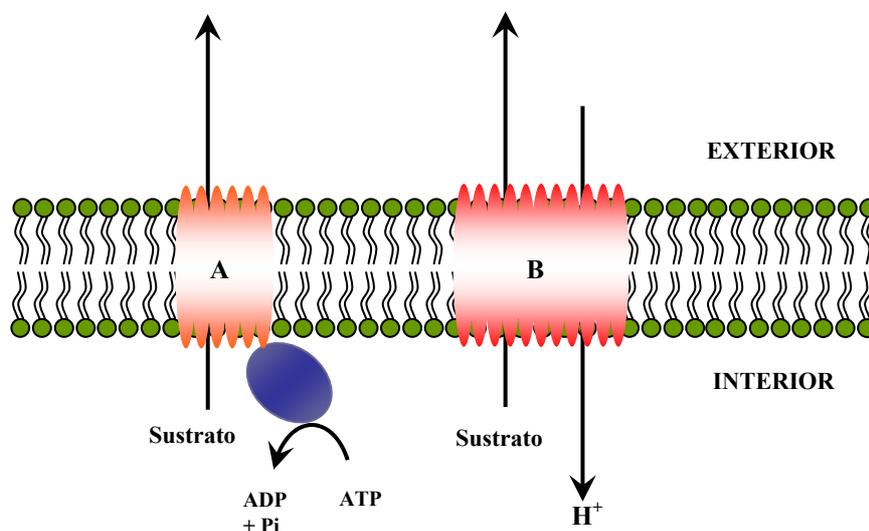


Fig. 1.13. Representación esquemática de las dos clases mayoritarias de transportadores de múltiples antibióticos. A. Los transportadores ABC utilizan la energía libre de la hidrólisis del ATP para bombear antibióticos fuera de la célula. B. Los transportadores secundarios de múltiples antibióticos median la extrusión de compuestos estructuralmente no relacionados en un intercambio con protones o iones sodio.

Existe además otra familia de transportadores relativamente nueva denominada familia de extrusión de múltiples antibióticos y de compuestos tóxicos (MATE, del inglés *Multidrug and Toxic Compound Extrusion Family*), de la cual se conoce apenas su estructura, regulación o mecanismo de acción [55].

1.4.3.1. Transportadores secundarios de múltiples antibióticos

La extrusión de antibióticos y otros compuestos tóxicos en los organismos procariontas suele deberse a la acción de bombas en las cuales el proceso de reflujos tiene lugar por el influjo de un protón. Estos transportadores están involucrados en el transporte de azúcares, aniones y antibióticos y son conducidos por el gradiente electroquímico, normalmente por la fuerza protón-motriz. Estas bombas se denominan a menudo antiportadoras de protones y pueden subdividirse en distintas familias de proteínas, agrupadas según el tamaño y las similitudes de sus estructuras primaria y secundaria: MFS (*major facilitator superfamily*),

SMR (*small multidrug resistance family*) RND (*resistance-nodulation-cell division family*) y DME (*drug/metabolite efflux family*), escasamente descrita hasta el momento [55].

En la tabla 1.6 se presentan las características de estas tres familias. Como puede observarse, la bomba de reflujo de *S. pneumoniae* PmrA (del inglés "*pneumococcal multidrug resistance protein*") [56], la única descrita y caracterizada hasta el momento en esta bacteria, pertenece a la familia MFS y se caracteriza por tener 12 segmentos transmembranales.

Tabla 1.6. Transportadores secundarios de múltiples antibióticos SMT.

Familia	Características	Transportador		Organismo
MFS	Transportan azúcares, intermediarios del ciclo de Krebs, ésteres fosfatados, oligosacáridos, antibióticos (quinolonas, cloranfenicol, aminoglicósidos, tetraciclina), acriflavina, bromuro de etidio.	12 segmentos transmembrana (12-TMS)	NorA Bmr y Blt LmrP Bcr, MdfA y EmrD PmrA Tap	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y <i>Mycobacterium fortuitum</i>
		14 segmentos transmembrana (14-TMS)	Bmr3 ErmB LfrA QacA y QacB VceB	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vibrio cholerae</i>
SMR	Son las proteínas de reflujo de menor tamaño dentro de este tipo. Transportan antibióticos (quinolonas, eritromicina), compuestos de amonio cuaternarios, bromuro de etidio, telurito potásico, acriflavina.	EbrA, EbrB, YkkC y YkkD EmrE (MvrC) Mmr QacE QacEΔ1 QacG QacH Smr (Ebr/QacC/QacD)	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Bacterias Gram negativas Bacterias Gram negativas y Gram positivas <i>Staphylococcus</i> spp. <i>S. saprophyticus</i> <i>S. aureus</i>	
RND	Interaccionan con una proteína de fusión (MFP) y una proteína de membrana externa para permitir el transporte a través de la membrana interna y externa de bacterias Gram negativas. Transportan antibióticos (quinolonas, eritromicina, aminoglicósidos, macrólidos, β-lactámicos), detergentes, colorantes básicos.	AmrB AcrB, AcrF (EnvD) y YhiV HI0895 MexB, MexD, MexF y MexY MtrD	<i>Burkholderia pseudomallei</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Pseudomonas eruginosa</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	

Cabe destacar que dentro de la familia MFS se encuentran dos tipos de proteínas distintas, que exhiben 12 ó 14 segmentos transmembranales. Englobados dentro de ambos

tipos de proteínas, se encuentran indistintamente transportadores de un único antimicrobiano o de múltiples antibióticos, de modo que no puede hablarse de una distinción fundamental entre estos dos tipos de bombas [53].

En la familia de los transportadores MFS, así como en las familias SMR y RND, los análisis de alineamiento de secuencias múltiples revelan la presencia de tres o más motivos conservados, tal y como muestra la figura 1.14.

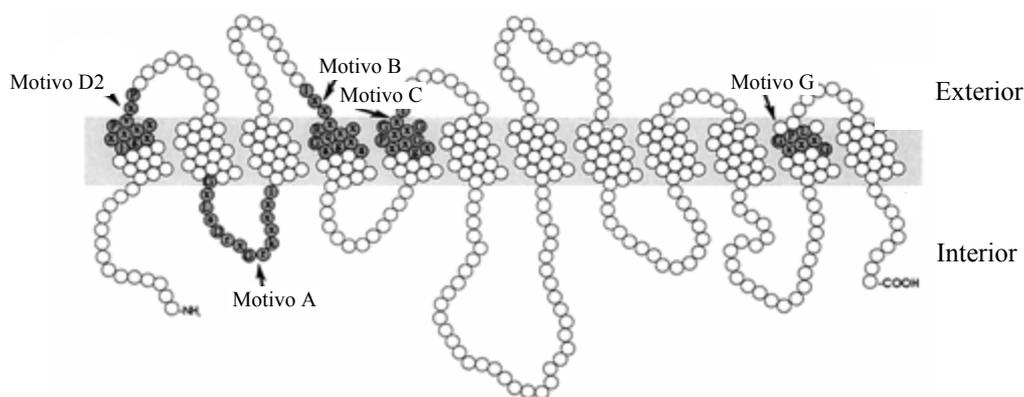


Fig. 1.14. Modelo genérico de una proteína de 12 segmentos transmembranales de la familia de transportadores MFS.

1.4.3.2. Transportadores ABC

La familia de transportadores de membrana ABC constituye el principal mecanismo de reflujos en los organismos eucariotas y, a diferencia de lo que ocurre en los organismos procariotas, es un mecanismo mediado por proteínas que obtienen su energía de transporte de la hidrólisis del ATP [55]. Dentro de esta familia se encuentra la glicoproteína P, bomba de reflujos que confiere resistencia a sustancias anticancerosas. Se han identificado también algunas proteínas homólogas a ésta en ciertas bacterias, como el transportador LmrA de *Lactococcus lactis* y el transportador de *E. coli* MacB, involucrado en el reflujos de macrólidos. Aunque la mayoría de transportadores ABC se descubrieron como transportadores de drogas, frecuentemente transportan un amplio rango de sustratos, incluyendo colorantes, lípidos, ciertos péptidos y esteroides [55].

1.4.4. LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS EN *S. pneumoniae*

1.4.4.1. La aparición de resistencias a los antibióticos en *S. pneumoniae*

La resistencia a un amplio rango de agentes antibacterianos utilizados en el tratamiento de las infecciones neumocócicas tuvo su aparición hace cuatro décadas. La resistencia a la tetraciclina y la eritromicina surgió por primera vez en los años 60, seguido de la resistencia a cloranfenicol, co-trimoxazol, penicilina y, más recientemente, a cefalosporinas y a las nuevas fluoroquinolonas [101].

La capacidad de transformación genética en *S. pneumoniae* juega un papel importante en la evolución y en la aparición de resistencias a los antibióticos en esta especie. En primer lugar, y tal y como ya se ha expuesto con anterioridad, el estado de competencia puede alcanzarse en condiciones relativamente simples, no requiriéndose ni células en fase estacionaria (como en *Haemophilus*) ni células en fase logarítmica tardía (como en *Bacillus*), sino células en crecimiento exponencial a una concentración determinada [26]. La elevada capacidad de intercambio genético repercute directamente en la evolución de nuevos genes de resistencia a los antibióticos, debido a la adquisición de segmentos génicos de otras especies de estreptococos orales. Esto da lugar a una combinación de genes entre especies íntimamente relacionadas, denominados genes en mosaico [26;31].

Sin embargo, este no es el único factor implicado en la resistencia a los antibióticos en el neumococo. Como es sabido, *S. pneumoniae* es un patógeno que coloniza comúnmente el tracto respiratorio, especialmente en niños, en los que existe una exposición frecuente a los agentes antimicrobianos. La duración de la permanencia del neumococo en este hábitat varía de 1 a 17 meses [2], dependiendo de la edad del huésped y del serotipo de la cepa colonizadora. Durante este periodo de tiempo, los neumococos tienen la posibilidad de ser expuestos a una presión selectiva a los antibióticos, que explicaría parcialmente por qué el elevado nivel de resistencia a los antibióticos está asociado a los serotipos 6B, 9V, 9A, 14, 19F y 23F, también llamados serotipos pediátricos.

1.4.4.2. La resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae*

Las cepas de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina (el primer antibiótico utilizado para tratar enfermedades causadas por esta bacteria) se describieron por primera vez a finales de los años 60. Desde entonces, la incidencia de infecciones por neumococos resistentes a penicilina y otros antibióticos β -lactámicos fue aumentado progresivamente. En los años 1980 y 1990, la resistencia del neumococo a múltiples agentes antibacterianos (incluyendo los β -lactámicos, los macrólidos, las tetraciclinas y el cotrimoxazol), emergió de manera notoria [38]. La creciente prevalencia de la resistencia de *S. pneumoniae* a estos antibióticos ha subrayado la necesidad de agentes antimicrobianos efectivos como las fluoroquinolonas. Esta clase de antibióticos es una de las terapias antimicrobianas más utilizadas en hospitales y en el ámbito extrahospitalario. Una de las quinolonas más utilizadas en las dos últimas décadas ha sido la ciprofloxacina, pero su actividad frente a patógenos Gram positivos es actualmente limitada. Las nuevas fluoroquinolonas como la levofloxacina, la gatifloxacina, la moxifloxacina y la gemifloxacina han aumentado la actividad frente a la mayoría de patógenos respiratorios y algunas de ellas están siendo utilizadas más extensamente para tratar infecciones del tracto respiratorio. Por ello, la aparición de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a las fluoroquinolonas es una preocupación para los clínicos que tratan infecciones del tracto respiratorio [38]. Como ya se ha comentado anteriormente, la resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas se debe principalmente a la alteración de las dianas de esta clase de antibióticos, la DNA topoisomerasa IV y la DNA girasa. En *S. pneumoniae*, la actividad bactericida de las fluoroquinolonas puede producirse sobre la girasa, la topoisomerasa IV o ambas, dependiendo de la estructura de la quinolona [49;57]. En general, sin embargo, las primeras resistencias a quinolonas en *S. pneumoniae* aparecen por mutaciones producidas en la topoisomerasa IV, mientras que las mutaciones en la girasa proporcionan resistencias adicionales [47;49;58]. Cabe decir que se ha llegado a establecer un criterio de clasificación de las quinolonas en función del orden de las mutaciones consecutivas presentes en las topoisomerasas de mutantes resistentes de *S. pneumoniae* [49;57]. Según este criterio, el primer grupo incluiría las quinolonas ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina, pefloxacina y trovafloxacina, que parecen inducir mutaciones en la QRDR de la topoisomerasa IV antes que en la girasa [36;58;59]. Un segundo grupo de quinolonas estaría compuesto por esparfloxacina, grepafloxacina, gatifloxacina y moxifloxacina. Este grupo, a diferencia del primero, produce mutaciones en la girasa antes que en la topoisomerasa IV [49;60]. Finalmente, clinafloxacina

y gemifloxacin, que actúan por igual sobre ambas dianas, la girasa y la topoisomerasa IV, constituirían otro grupo de fluoroquinolonas [57;61]. Estos resultados demuestran que la estructura de estos antibióticos determina su modo de acción frente a *S. pneumoniae*.

Aunque el principal mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas en *S.pneumoniae* se debe a mutaciones en las dianas de estos antibióticos, se ha descrito recientemente un segundo mecanismo con una clara e importante contribución a la resistencia, asociado a niveles bajos de resistencia: las bombas de reflujo [62;63]. Las proteínas de reflujo transportan compuestos estructuralmente diversos fuera de la bacteria, previniendo su acumulación intracelular. Las actividades de muchas de estas bombas pueden ser inhibidas por diferentes sustancias como el alcaloide reserpina y el CCCP, no utilizables en la práctica clínica debido a su elevada toxicidad. En el futuro, la aplicación conjunta de los inhibidores de las bombas de reflujo y los antibióticos, puede ofrecer terapias efectivas para el tratamiento de infecciones originadas por mutantes de reflujo.

En el año 1999, se identificó la bomba de reflujo PmrA [56], que produce resistencia a fluoroquinolonas y colorantes, principalmente. Esta proteína es parecida a la bomba NorA de *S. aureus*, con la que comparte un 24% de identidad. Estudios posteriores sugieren la presencia adicional de transportadores de múltiples antibióticos en *S. pneumoniae* [64].

Hay que destacar que se han realizado estudios en los que se describe que de unos 300 aislados clínicos resistentes a ciprofloxacina, el 45% deben gran parte de su resistencia al reflujo [53]. El reflujo resulta ser, por lo tanto, un mecanismo de gran importancia en la resistencia a las quinolonas en *S. pneumoniae*.

2. OBJETIVOS

Los trabajos desarrollados hasta el momento en este laboratorio han seguido una trayectoria común, centrada en el estudio de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias de origen hospitalario. La selección de bacterias resistentes es un proceso complejo y progresivo que se ha observado en la mayoría de las especies bacterianas debido, entre otros factores, al uso prolongado e inadecuado de los antibióticos. En este laboratorio han sido objeto de estudio bacterias Gram negativas como *Serratia marcescens*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis*. Siguiendo la misma línea de investigación, el microorganismo estudiado en este trabajo fue la bacteria Gram positiva *Streptococcus pneumoniae*, por representar una de las prioridades importantes en los problema de salud pública. *S. pneumoniae* es uno de los principales agentes causantes de una gran variedad de cuadros clínicos, infecciones benignas como otitis media y sinusitis agudas, e infecciones severas como septicemia, meningitis y neumonía, siendo responsable de una elevada morbilidad y letalidad. *S. pneumoniae* forma parte de la flora bacteriana normal de la mucosa nasal y faríngea y coloniza preferentemente el tracto respiratorio superior de niños y ancianos.

En la última década hemos asistido a la emergencia de cepas de *S. pneumoniae* multirresistentes, inicialmente mostrando una sensibilidad disminuida a la penicilina. La creciente prevalencia de la resistencia de *S. pneumoniae* a este y otros antibióticos ha llevado a la utilización de nuevos agentes antimicrobianos como las fluoroquinolonas, entre las que se encuentra la ciprofloxacina.

Uno de los objetivos iniciales de este trabajo fue el de poner de manifiesto el posible papel de los estreptococos comensales en la propagación de los marcadores de resistencia a las especies patógenas y, particularmente, a *S. pneumoniae*. Posteriormente, se definió un nuevo objetivo centrado en el estudio de los mecanismos implicados en la resistencia a fluoroquinolonas en *S. pneumoniae*. Este estudio llevó a la profundización y evaluación de la importancia de las bombas de reflujo en la resistencia a ciprofloxacina en cepas clínicas de *S. pneumoniae*. Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar el patrón de sensibilidad de las cepas clínicas de *S. pneumoniae*.
2. Intentar dar una explicación al origen de la resistencia en este patógeno, por transformación genética con otros estreptococos orales resistentes.
3. Realizar un estudio de los posibles mecanismos moleculares implicados en la resistencia a ciprofloxacina de las cepas clínicas de *S. pneumoniae*. Para ello es necesario:
 - Analizar las principales dianas de las fluoroquinolonas, con el fin de determinar mutaciones en los genes donde actúan estos antibióticos.
 - Relacionar los niveles de resistencia a ciprofloxacina con la presencia de mutaciones en los genes diana del antibiótico.
 - Comprobar y evaluar la acción de un mecanismo activo de reflujo implicado en la resistencia a ciprofloxacina.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas utilizadas, así como sus características más relevantes, se exponen en las tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1. Relación de cepas de *S. pneumoniae* utilizadas.

CEPA	ORIGEN	SEROTIPO CAPSULAR	PFGE
R6	Cepa de laboratorio [65]	No capsulada	-
841	LRT	14	Spain-14-5
850	Sangre	14	Spain-14-5
1643	Espito	23F	Spain-23F-1
2205	LRT	9V	Spain-9V
2375	Espito	19F	1903
2459	Espito	23F	Spain-23F-1
3073	Espito	21	179_MAD
4371	Espito	9V	Spain-9V-3
5558	Espito	9V	Spain-9V-3

PFGE: perfil electroforético. LRT, tracto respiratorio inferior. -, no procede.

Tabla 3.2. Relación de cepas de *Streptococcus* del grupo *viridans* utilizadas.

CEPA	REFERENCIA	ORIGEN
<i>S. mitis</i>	CECT 804	Cepa de colección ^(a)
<i>S. grupo viridans</i>	237	Espito
<i>S. mitis</i>	181731-1	Espito
<i>S. mitis</i>	181731-2	Espito
<i>S. mitis</i>	181731-3	Espito
<i>S. mitis</i>	121	Espito

^(a) Colección Española de cultivos Tipo [66].

Además de las cepas de *Streptococcus* mencionadas, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* LE392, que contenía el plásmido pR326, con un cassette de resistencia a cloranfenicol. Esta cepa fue cedida por el Dr. Rubens López del Departamento de Genética del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de Madrid, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

3.2. MEDIOS DE CULTIVO

3.2.1. CALDO DE TRIPTONA Y SOJA (TSB)

Medio líquido altamente nutritivo. Se utilizó como medio de uso general en el crecimiento de cepas de *E. coli*.

- Composición (g/l):

Triptona.....	17.0
Peptona de soja.....	3.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Fosfato di-potásico.....	2.5
Glucosa.....	2.5

- Preparación: Disolver 30 g del producto en 1 l de agua destilada, ajustando el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 °C. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.2. AGAR DE TRIPTONA Y SOJA (TSA)

Medio sólido equivalente al TSB pero sin glucosa ni fosfato, utilizado para el crecimiento en medio sólido y la conservación a corto plazo de la cepa de *E. coli*.

- Composición (g/l):

Triptona.....	15.0
Peptona de soja.....	5.0
Cloruro de sodio.....	5.0
Agar.....	15.0

- Preparación: Disolver 40 g del producto en 1 l de agua destilada, ajustando el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 °C. Calentar y llevar a ebullición para que el agar quede completamente disuelto. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y distribuir en placas de Petri estériles.

3.2.3. LURIA BROTH (LB)

Medio nutritivo utilizado para el crecimiento de la cepa de *Escherichia coli*, en la extracción de DNA plasmídico.

- Composición (g/l):

NaCl	0.5
Peptona tríptica de caseína	10.0
Extracto de levadura	5.0

- Preparación: Disolver 15 g del producto en 1 l de agua destilada, ajustando el pH a 7.2 ± 0.2 a 25 °C. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.4. CALDO *BRAIN HEART INFUSION* (BHI)

Medio líquido utilizado para el crecimiento de cepas de *Streptococcus*

- Composición (g/l):

Extracto de cerebro	7.8
Extract de corazón	9.7
Peptona de proteosa	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato di-sódico	2.5

- Preparación: Disolver 37 g del producto en 1 l de agua destilada, ajustando el pH a 7.4 ± 0.2 a 25 °C. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.5. AGAR SANGRE

Rutinariamente se sembraron las cepas de *Streptococcus* en placas de agar sangre de la casa Bio-Mérieux, preparadas con agar Columbia y un 5 % de sangre de cordero (Ref. 43041 COS).

En determinadas ocasiones, se prepararon las placas de agar sangre en el laboratorio, generalmente a partir de medio TSA y sangre de caballo estéril desfibrinada.

- Composición (g/l):

Triptona.....	15.0
Peptona de soja.....	5.0
NaCl.....	5.0
Agar.....	15.0

- Preparación: Disolver 40 g del producto en 1 l de agua destilada y ajustar el pH a 7.3 ± 0.2 a 25 °C. Calentar y llevar a ebullición para que el agar quede completamente disuelto. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y dejar enfriar a 45 °C. Posteriormente, añadir la sangre a una concentración final del 5 %, mezclar bien y distribuir en placas de Petri estériles. Cuando se requiera, añadir el antibiótico o producto a la concentración deseada, antes de distribuir el medio en las placas.

3.2.6. MÜLLER HINTON AGAR SANGRE

Medio nutritivo sólido constituido por Müller Hinton agar y sangre de caballo estéril desfibrinada. Se utilizó en los experimentos de sensibilidad a agentes antimicrobianos, por el método de difusión en agar.

- Composición (g/l):

Caseína ácida.....	17.5
Almidón.....	1.5
Agar.....	15.0

- Preparación: Disolver 40 g del producto en 1 l de agua destilada, ajustando el pH a 7.4 ± 0.2 a 25 °C. Calentar y llevar a ebullición para que el agar quede completamente disuelto. Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y dejar enfriar a 45 °C. Posteriormente, añadir la sangre a una concentración final del 5 %, mezclar bien y añadir el antibiótico a la concentración deseada. Distribuir el medio en placas de Petri estériles.

3.2.7. MEDIO DE COMPETENCIA C

Medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas de estreptococos, especialmente para la obtención de cultivos en estado de competencia y en los experimentos de transformación [67].

La composición de este medio se detalla en la tabla 3.3. Todos los componentes del medio se mantuvieron a 4 °C, a excepción del medio base Pre-C y el tampón fosfato, que se guardaron a temperatura ambiente.

Tabla 3.3. Composición del medio C

MEDIO C	
Composición	Volumen (ml)
Pre-C (A)	400 ml
Suplemento B (B)	13 ml
L-Glutamina 1 mg/ml	10 ml
Adams III (C)	10 ml
Piruvato 2 % (w/v)	5 ml
Tampón fosfato 1 M, pH 8.0 (D)	15 ml

La L-glutamina y el piruvato se prepararon a las concentraciones correspondientes y se esterilizaron por filtración. Para ello se utilizaron filtros estériles de acetato de celulosa para jeringa de la casa ALBET, con un diámetro de poro de 0.22 μm (Ref. ALBET-JACS-020-25-50). El resto de soluciones que forman parte del medio C se prepararon según consta en la tabla 3.4.

Tabla 3.4. Composición de las soluciones A, B, C y D del medio C.

SOLUCIÓN	COMPONENTE	CANTIDAD	PREPARACIÓN
(A) Pre-C	Acetato sódico·3H ₂ O	2 g	Se ajustó el pH a 7.4-7.6 con NaOH 10 N. Se repartió en matraces de 500 ml y se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.
	Casaminoácidos	5 g	
	L-Triptófano	5 mg	
	L-cisteína hidrocloreada	50 mg	
	Agua destilada	1 l	
(B) Suplemento B	Solución 3 sales en 1 (E)	20 ml	La solución se preparó mezclando cada componente estéril por separado.
	Glucosa 20 % ^(a)	40 ml	
	Sacarosa 50 % ^(a)	2 ml	
	Adenosina 2 mg/ml ^(b)	40 ml	
	Uridina 2 mg/ml ^(b)	40 ml	
(C) Adams III	Adams I (F)	64 ml	Se esterilizó la solución por filtración y se mantuvo protegida de la luz.
	Adams II (G)	16 ml	
	L-Asparagina	800 mg	
	Colina clorada	80 mg	
	Solución de CaCl ₂ al 1 %	0.64 ml	
	H ₂ O destilada	hasta 400 ml	
(D) Tampón fosfato 1M, pH 8.0	KH ₂ PO ₄ 1 M	26.5 ml	Se mezclaron las dos soluciones, previamente esterilizadas.
	K ₂ HPO ₄ 1 M	473.5 ml	

^(a) Se esterilizó en el autoclave a 110 °C y media atmósfera de presión. La sacarosa se calentó previamente para disolverla bien. ^(b) Se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y se dejó enfriar.

La composición y el método de preparación de las soluciones E, F y G se detallan en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Composición de las soluciones E, F y G del medio C.

SOLUCIÓN	COMPONENTE	CANTIDAD	PREPARACIÓN
(E) Solución "3 sales en 1"	MgCl ₂ ·6H ₂ O	100 g	Se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y, una vez frío, se guardó a 4 °C.
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.662 g	
	MnSO ₄ 0.1 M	0.2 ml	
	H ₂ O destilada	1000 ml	
(F) Adams I	Biotina 0.5 mg/ml	0.06 ml	Se mezclaron todos los componentes y se esterilizó la solución por filtración. Se guardó a 4 °C, protegida de la luz.
	Ácid nicotínico	30 mg	
	Piridoxina·HCl (B ₆)	35 mg	
	Pantotenato cálcico	120 mg	
	Tiamina·HCl	32 mg	
	Riboflavina	14 mg	
	H ₂ O destilada	hasta 200 ml	
(G) Adams II	CuSO ₄ ·5H ₂ O	50 mg	Se mezclaron todos los componentes y se esterilizó la solución por filtración. Se guardó a 4 °C, protegida de la luz.
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	50 mg	
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	20 mg	
	HCl 11.6 M	1 ml	
	H ₂ O destilada	hasta 100 ml	

3.2.8. MEDIO C+Y

El medio líquido C+Y se preparó añadiendo 2 ml de una solución de extracto de levadura al 4 % a 100 ml de medio C y se utilizó para el crecimiento de las cepas de estreptococos estudiadas.

El medio sólido C+Y se utilizó para el crecimiento de los transformantes neumocócicos obtenidos en los experimentos de transformación. Su composición y modo de preparación se indican a continuación.

- Composición (ml):
 - Medio C+Y 300
 - Agar al 4 % 100
 - Catalasa al 10 % 4
- Preparación: Preparar matraces con agar al 4 % y esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos. Dejar enfriar y guardar a temperatura ambiente. Atemperar el medio C+Y a 45 °C y añadir la catalasa al 1 % de concentración final, preparada según está descrito en el apartado 3.3.1. Mezclar con el agar, previamente fundido y atemperado a 45 °C, mezclar bien y distribuir en placas de Petri estériles. Cuando se requiera, añadir el antibiótico a la concentración deseada para la selección de los transformantes, antes de distribuir el medio en las placas.

3.2.9. MEDIO C+Y+A

Medio de cultivo líquido utilizado para el crecimiento y expresión fenotípica de los transformantes de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas. Se prepara añadiendo 2 ml de una solución de albúmina al 4 % a 100 ml de medio C+Y.

3.2.10. MEDIO DE CONSERVACIÓN

BHI con glicerol

Medio utilizado para la conservación a largo plazo de las cepas bacterianas utilizadas. Su composición es BHI y glicerol al 15 %. El medio se preparó pesando 3.7 g de BHI que se resuspendieron en 85 ml de agua destilada y, posteriormente, se añadieron 15 ml de glicerol. Se mezcló bien y se esterilizó en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Para conservar las cepas de *Streptococcus* se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Se realizaron cultivos en medio sólido de cada una de las cepas y se incubaron a 37 °C, con un 5 % de CO₂.
- Al día siguiente, se recuperaron las colonias crecidas en las placas y se resuspendieron en 1 ml de medio de conservación, contenido en tubos *ependorf*.
- Los tubos se congelaron a -80 °C hasta su utilización.

Cabe destacar que cuando las cepas se sembraron en medio de cultivo líquido C+Y, se les añadió glicerol estéril hasta una concentración final del 10 % y la mezcla se distribuyó en alícuotas de 0.5-1 ml. A continuación, se congelaron rápidamente en una mezcla de etanol-hielo seco y se guardaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En ocasiones, las muestras se congelaron y mantuvieron en nitrógeno líquido.

TSB con glicerol

Medio utilizado para la conservación por congelación a largo plazo de la cepa de *E. coli* utilizada. Su composición es TSB y glicerol al 15 %. El medio se preparó pesando 3 g de TSB que se resuspendieron en 85 ml de agua destilada y, posteriormente, se añadieron 15 ml de glicerol. Se mezcló bien y se esterilizó en el autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos.

Para conservar las cepas de *E. coli* se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

- Se realizaron cultivos en medio líquido (5 ml de TSB), incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante aproximadamente 18 horas.
- A continuación, se centrifugó 1 ml en tubos *ependorf* a $8000 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- El sedimento se resuspendió en 1 ml de medio de conservación.
- Se guardaron los tubos *ependorf* a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

3.3. SOLUCIONES UTILIZADAS

3.3.1. CATALASA 10 %

Solución utilizada en la preparación del medio sólido C+Y.

- Composición (ml):

catalasa	10
H ₂ O destilada	90
- Preparación: Centrifugar 15 minutos a 3500 - 4000 rpm y esterilizar por filtración. Repartir en alícuotas de 4 ml.

3.3.2. TAMPÓN DE MORRISON

Este tampón se utilizó para lisar los cultivos de neumococo [68].

- Composición:

Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
EDTA	30 mM
Sarcosil.....	0.4 %
Triton-X100	0.1 %

3.3.3. FENOL:CLOROFORMO:ISOAMÍLICO

Solución utilizada para la purificación de ácidos nucleicos.

En primer lugar se preparó una solución de fenol a pH 7.8:

- A 250 ml de fenol se le añadieron 0.25 g de 8- hidroxiquinoleina, que actúa como antioxidante y proporciona una coloración amarillenta que permite distinguir la fase fenólica de la acuosa.
- Se mezcló bien con un volumen igual de solución 0.5 M Tris-HCl pH 8.0, y se dejó en reposo hasta que las fases se separaron. Se eliminó el tampón y se sustituyó por tampón nuevo. Este procedimiento se repitió hasta que el pH de la fase acuosa se situó por encima de 7.8. El fenol se conservó a 4 °C protegido de la luz.

En segundo lugar se preparó una solución de cloroformo:isoamílico (24:1):

- Se mezclaron 24 volúmenes de cloroformo y 1 volumen de alcohol isoamílico.

Finalmente, se preparó la solución de fenol:cloroformo:isoamílico (24:24:1):

- Se mezcló en una proporción del 50 % la solución de fenol y la solución de cloroformo:isoamílico.

3.3.4. PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

Se utilizó como solución amortiguadora de pH en el lavado y mantenimiento de células bacterianas. Se preparó una solución *stock* a una concentración diez veces superior a la de utilización.

- Composición de la solución PBS × 10 (g/l):

NaCl	80.0
KH ₂ PO ₄	2.0
Na ₂ HPO ₄	11.4
KCl	11.0

- Preparación: Disolver en 1 l de agua destilada y ajustar el pH a 7.5 ± 0.2 . Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 20 minutos y dejar enfriar.

3.3.5. GLICINA-HCl, pH 3

Solución utilizada en los ensayos fluorométricos para lisar los cultivos bacterianos.

- Composición:

Glicina	0.1 M
HCl	24 mM

- Preparación: Mezclar 50 ml de una solución 0.2 M de glicina, 12 ml de una solución 0.2 M de HCl y agua destilada hasta un volumen final de 100 ml.

3.3.6. TAE × 50

Solución *stock*, concentrada 50 veces, utilizada en la preparación de geles de agarosa.

- Composición:

Tris	242 g
0.5 M EDTA, pH 8.0	100 ml
Acido acético glacial	57.1 ml
H ₂ O destilada	hasta 1 l

3.4. DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

3.4.1. PREPARACIÓN DE LOS STOCKS DE ANTIBIÓTICOS Y OTRAS SOLUCIONES

□ ANTIBIÓTICOS:

Todos los antibióticos utilizados se esterilizaron por filtración, mediante filtros estériles con un diámetro de poro de 0.22 μm .

- La ciprofloxacina y demás fluoroquinolonas se prepararon a una concentración *stock* de 1 mg/ml en NaOH 0.5 N. Se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegidas de la luz.
- La tetraciclina se preparó a una concentración *stock* de 25 mg/ml en 50 % (v/v) de agua y etanol. Se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y protegida de la luz.
- El cloranfenicol se preparó a una concentración *stock* de 20 mg/ml en etanol. Se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

□ COLORANTES:

- La acriflavina y el bromuro de etidio se prepararon a una concentración *stock* de 1 mg/ml en agua destilada estéril y se protegieron de la luz. Se conservaron a temperatura ambiente.

□ INHIBIDOR METABÓLICO:

- La reserpina se preparó en una solución al 50 % (v/v) de agua y metanol y a una concentración final de ácido acético del 1 %.

3.4.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (MIC)

La concentración mínima inhibitoria o MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) de cada antibiótico para cada cepa fue determinada según el método de la doble dilución en agar,

especificado por el NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) [69]. El método seguido fue el siguiente:

- ❑ Se realizó una suspensión bacteriana a partir de algunas colonias crecidas en agar sangre de un cultivo *overnight*, con una solución salina estéril (Ringer 1/4).
- ❑ La concentración de la suspensión se ajustó a 10^5 ufc/ml y se distribuyó con un replicador de Steer (figura 3.1) en placas de Müller-Hinton agar, suplementadas con un 5 % de sangre de caballo desfibrinada, con las concentraciones de antibiótico apropiadas. En los casos en que se utilizó reserpina conjuntamente con el antibiótico, ésta se añadió a una concentración final de 10 µg/ml.
- ❑ Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 20-24 horas, tras las cuales se realizó la lectura de los resultados.
- ❑ La MIC del antibiótico se definió como la mínima concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

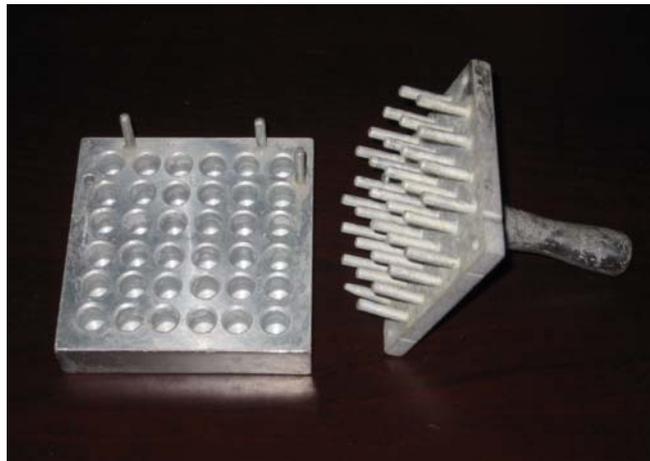


Fig. 3.1. Fotografía de un replicador de Steer, utilizado en las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias.

3.5. EXPERIMENTOS DE REFLUJO

3.5.1. ENSAYOS DE CRECIMIENTO E INHIBICIÓN DE *S. pneumoniae*

3.5.1.1. Curva de crecimiento

Se determinó la curva de crecimiento para todas las cepas de neumococo incluidas en el estudio. Para ello se siguió el siguiente procedimiento:

- A partir de cultivos *overnight* en placas de agar sangre, se realizaron suspensiones bacterianas en 100 ml de medio BHI, hasta una densidad óptica a 550 nm alrededor de 0.2-0.3.
- Los cultivos se incubaron a 37 °C y se fueron realizando medidas de densidad óptica a 550 nm, a intervalos de tiempo de una hora. Las distintas medidas de densidad óptica obtenidas se representaron frente al tiempo.
- Paralelamente, se sembraron placas de agar sangre de las alícuotas tomadas en cada instante, previa dilución de las mismas. Éstas se incubaron toda la noche a 37 °C, con un 5 % de CO₂.
- El recuento del número de colonias crecidas en las placas permitió establecer una correlación entre los valores de densidad óptica obtenidos y la concentración.

3.5.1.2. Ensayo de inhibición del crecimiento

Se siguió el protocolo descrito por Beyer *et al.* [70], con algunas modificaciones.

- A partir de un cultivo *overnight* en agar sangre, se realizó una suspensión bacteriana en 100 ml de medio BHI hasta una densidad óptica a 550 nm de aproximadamente 0.2-0.3.
- A esta suspensión se le añadió una concentración de ciprofloxacina de ¼ la concentración mínima inhibitoria.
- El cultivo se dividió en dos volúmenes iguales, a uno de los cuales se le añadió reserpina a una concentración final de 10 µg/ml.
- Ambos cultivos se incubaron a 37°C y se fueron realizando medidas paralelas de absorbancia a 550 nm, a intervalos de tiempo de una hora.

- Las distintas medidas de densidad óptica se representaron frente al tiempo.

3.5.1.3. Efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento bacteriano, en presencia y ausencia de reserpina

Se siguió el protocolo descrito por Beyer *et al.* [70], ligeramente modificado.

- A partir de un cultivo *overnight* en agar sangre, se realizó una suspensión bacteriana en 100 ml de medio BHI hasta una densidad óptica a 550 nm de aproximadamente 0.2-0.3.
- Esta suspensión se repartió en diez tubos con volúmenes iguales, a los cuales se les añadió concentraciones crecientes de ciprofloxacina. Para ello se tomó como valor más elevado el correspondiente a la MIC de la cepa y se realizaron diluciones a la mitad, hasta obtener un número aproximado de ocho concentraciones distintas. Se dejó en todos los casos un tubo sin añadir ciprofloxacina, como control positivo.
- De cada uno de estos tubos se traspasaron 5 ml a otros tubos nuevos y se les añadió reserpina a una concentración final de 10 µg/ml.
- Todos los tubos se incubaron a 37°C durante 7 horas, tras las cuales se realizaron las correspondientes medidas de densidad óptica a 550 nm.
- Los valores obtenidos se representaron gráficamente.

3.5.2. EXPERIMENTOS DE FLUORIMETRÍA EN *S. pneumoniae*

3.5.2.1. Medida de la acumulación de ciprofloxacina

La acumulación de ciprofloxacina determinada por fluorimetría fue determinada según el método descrito por Mortimer y Piddock [71], con algunas modificaciones. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Se sembró la bacteria en agar sangre durante toda una noche a 37 °C y un 5 % de CO₂.
- Parte de las colonias crecidas en la placa de agar sangre se resuspendió en 100 ml de BHI, incubándose a 37°C con un 5 % de CO₂, hasta una densidad óptica a 660 nm entre 0.5 y 0.7.

- ❑ Se centrifugó el cultivo a $10000 \times g$ y $4^\circ C$, durante 10 minutos.
- ❑ El sedimento se resuspendió en PBS a pH 7.5.
- ❑ Se volvió a centrifugar a $10000 \times g$ y $4^\circ C$, durante 10 minutos.
- ❑ El sedimento resultante se resuspendió con PBS a pH 7.5, concentrándolo 10 veces. Esta suspensión se mantuvo a $4^\circ C$ hasta su utilización.
- ❑ Se tomó una pequeña alícuota de la suspensión concentrada y se realizó un banco de diluciones. Seguidamente se sembraron 0.1 ml de cada dilución en placas de agar sangre, para determinar el número de unidades formadoras de colonia en el momento de la realización de los experimentos de acumulación.
- ❑ Previamente a la realización de los experimentos de acumulación, la suspensión se equilibró a $37^\circ C$ durante 10 minutos. Para algunos experimentos, la reserpina se añadió durante esta fase, a una concentración final de $10 \mu g/ml$.
- ❑ La ciprofloxacina se añadió a una concentración final de $10 \mu g/ml$, en todos los experimentos.
- ❑ Los tiempos de incubación del antibiótico fueron de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 minutos. En ocasiones, se realizaron únicamente dos medidas de acumulación: en el momento inicial, justo antes de añadir la ciprofloxacina (tiempo 0), y después de 5 minutos.
- ❑ Transcurrido el tiempo de incubación establecido, se tomaron alícuotas de 1 ml y se centrifugaron a $10000 \times g$ y $4^\circ C$, durante 1 minuto.
- ❑ El sedimento se lavó con PBS a pH 7.5, para conseguir un aumento de la retención celular del antibiótico. Se volvió a centrifugar y el sedimento se resuspendió en 1 ml de tampón glicina 0.1 M a pH 3, para conseguir la lisis celular. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante un tiempo no inferior a 2 horas, protegidas de la luz.
- ❑ Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a $10000 \times g$ y $4^\circ C$, para eliminar los restos celulares.
- ❑ Finalmente, la concentración de ciprofloxacina en el sobrenadante se determinó por fluorimetría (Fluorímetro Hitachi modelo F-2000). Las longitudes de excitación (λ_{ex}) y de emisión (λ_{em}) de la ciprofloxacina consideradas fueron, respectivamente, 279 y 447.
- ❑ A partir de los valores de fluorescencia obtenidos y de la curva de calibrado previamente establecida para las condiciones de trabajo, se determinó la concentración de antibiótico acumulada, expresada como ng de ciprofloxacina/ 10^9 ufc. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en al menos tres ocasiones distintas.

3.5.2.2. Análisis estadísticos

Se utilizó la *t* de *Student* de datos pareados para contrastar las hipótesis nulas de igualdad entre dos condiciones (ausencia y presencia de reserpina) y el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor entre varias medias poblacionales (comparación de todas las cepas entre sí). Los resultados se generaron con el programa estadístico SAS Enterprise Guide [97].

3.6. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

3.6.1. CRECIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS DE NEUMOCOCO

- Se procedió a la descongelación rápida de la cepa original en un baño termostático a 37 °C.
- Se inocularon 0.5-1.0 ml del tubo original en 10 ml de medio C+Y, precalentado a 37 °C.
- Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.4 (equivalente a 2×10^8 ufc/ml), se añadió glicerol estéril a una concentración final del 10 %.
- Se distribuyó en alícuotas de 0.5-1.0 ml y se congeló rápidamente en una mezcla de etanol-nieve carbónica.
- Las cepas se conservaron a -80 °C.

3.6.2. PREPARACIÓN DE CÉLULAS EN ESTADO DE COMPETENCIA

- De un tubo de stock congelado de una cepa determinada se añadieron 0.15 ml en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de C+Y y se introdujeron en un baño de agua con hielo, de manera que el baño empezara a calentarse hacia las 4 h de la madrugada a 37°C. Para ello se utilizó un temporizador.
- Por la mañana, se diluyó 0.1 ml del cultivo en 10 ml de medio C+Y+A precalentado a 37 °C y se prolongó la incubación hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.4 (equivalente a 2×10^8 ufc/ml). Llegados a este punto, se añadió glicerol estéril a una concentración final del 10 %.

- ❑ Se distribuyó en alícuotas de 0.5 ml y se congeló rápidamente en una mezcla de etanol-nieve carbónica.
- ❑ Las cepas en estado de competencia se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.3. PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN

- ❑ Se precalentó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ un tubo de ensayo con medio C+A.
- ❑ Se descongeló rápidamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ un tubo *eppendorf* con células en estado de competencia.
- ❑ Por cada 0.45 ml de medio C+A se añadieron 0.05 ml de cultivo competente. Además, se añadió DNA exógeno a una concentración final máxima de $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ y factor de competencia CSP1 o CSP2. En experimentos de transformación con cepas no capsuladas se utilizaron $10\text{ }\mu\text{l}$ de CSP $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ (100 ng/ml de concentración final), mientras que en experimentos con cepas capsuladas se utilizaron $10\text{ }\mu\text{l}$ de CSP $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ (1000 ng/ml de concentración final).
- ❑ La mezcla se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos sin agitación.
- ❑ Transcurrido este tiempo, se añadió 1 ml de medio C+Y+A precalentado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se incubó a esta temperatura durante un tiempo no inferior a 90 minutos, permitiendo así la expresión fenotípica del DNA incorporado.
- ❑ Posteriormente, para la selección de los transformantes, se sembraron $100\text{ }\mu\text{l}$ del cultivo en placas de agar C+Y, conteniendo el antibiótico adecuado a la concentración de selección requerida. En aquellos casos en que la eficiencia de transformación se esperaba muy baja, se centrifugó el contenido total del tubo durante 5 minutos a 7000 rpm, se resuspendió el sedimento en un pequeño volumen del sobrenadante y se sembró la suspensión resultante en las placas de agar C+Y.
- ❑ Cabe decir que, en cada experimento de transformación, se sembraron placas con los controles negativos y positivos correspondientes. Los controles negativos consistieron en la siembra de las cepas en estado de competencia en placas con medio C+Y, conteniendo el antibiótico. Los controles positivos consistieron en la siembra de estas cepas en placas con medio C+Y, libre de antibiótico.

3.7. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DNA

3.7.1. EXTRACCIÓN DE DNA CROMOSÓMICO

Se utilizaron, indistintamente, dos metodologías para la extracción de DNA cromosómico de las cepas de *S. pneumoniae*, a gran escala y a pequeña escala.

3.7.1.1. Extracción a gran escala

Se llevó a cabo una modificación del método de J. Majewski y P. Zawadzki [32].

- ❑ Se sembró una cepa de *S. pneumoniae* en 8 placas de agar sangre y se incubaron a 37 °C durante toda la noche.
- ❑ Se recogieron todas las colonias crecidas en las ocho placas de agar sangre y se resuspendieron en una solución a 50 mM de Tris-HCl y 10 mM de EDTA, a pH 8.0.
- ❑ Para conseguir la lisis celular, se añadieron 500 µl de lisozima 10 mg/ml y se añadieron 40 µl de RNAasa para digerir el RNA. Se incubó de 30 a 60 minutos en un baño a 37 °C.
- ❑ Para digerir las proteínas presentes se añadieron 150 µl de proteinasa K 100 mg/ml y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
- ❑ La lisis celular se llevó a cabo añadiendo 100 µl de lauril sarcosinato al 20 % (w/v), con una incubación de aproximada de 1 hora a 37 °C, hasta la clarificación de la suspensión.
- ❑ Se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico y una tercera con cloroformo:isoamílico. Entre etapa y etapa se centrifugó a 10000 rpm durante 15-20 minutos, extrayendo la fase superior acuosa.
- ❑ Se precipitó el DNA añadiendo un volumen 1/10 de acetato de sodio 3 M a pH 4.8 y un volumen de isopropanol, mezclando cuidadosamente y dejándolo 20 minutos a -80 °C.
- ❑ La obtención del DNA fue por centrifugación a 10000 rpm, durante 15 minutos.
- ❑ El DNA precipitado se lavó con etanol frío al 70 %, para eliminar el exceso de sales, y se volvió a centrifugar a 10000 rpm durante 5 minutos.
- ❑ Se extrajo el etanol y se dejó secar el DNA en la estufa a 37 °C.
- ❑ Una vez seco, el DNA se dejó disolviendo toda la noche en 500 µl de agua estéril.
- ❑ Se determinó la concentración del DNA espectrofotométricamente (ver apartado 3.8.1).

3.7.1.2. Extracción a pequeña escala

- ❑ Se sembró la cepa de *S. pneumoniae* en 10 ml de medio C+Y. La incubación se inició a última hora de la tarde, poniendo el cultivo en un baño con agua y hielo. A este baño se le acopló un temporizador para que a partir de las 4 de la madrugada empezara a calentar a 37 °C. De esta manera se evitó la lisis del cultivo por una incubación prolongada a 37 °C.
- ❑ A la mañana siguiente se enfrió el cultivo en hielo durante unos 5 minutos y se centrifugó 5 minutos a 10000 rpm y 4 °C.
- ❑ El sedimento se resuspendió con 0.4 ml de tampón de Morrison (ver apartado 3.3.2), evitando formar demasiada espuma. Se pasó a un tubo *ependorf* y se incubó a 37 °C hasta su lisis completa.
- ❑ A los cultivos lisados se les añadió proteinasa K a una concentración final de 100-200 µg/ml y se incubó de 30 a 60 minutos a 37 °C.
- ❑ Se realizaron dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico y una tercera con cloroformo:isoamílico (24:1). Entre etapa y etapa se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos, extrayendo la fase superior.
- ❑ Se precipitó el DNA añadiendo un volumen 1/10 de acetato de sodio 3 M a pH 4.8 y dos volúmenes de etanol al 96 %, mezclando cuidadosamente. Se dejó 20 minutos a -80 °C en aquellos casos en que no se vió el DNA precipitado.
- ❑ La obtención del DNA fue por centrifugación a 10000 rpm y 4 °C, durante 10 minutos.
- ❑ El DNA precipitado se lavó con etanol frío al 70 %, para eliminar el exceso de sales y se volvió a centrifugar a 10000 rpm y 4 °C, durante 5 minutos.
- ❑ Se extrajo el etanol y se dejó secar el DNA en la estufa a 37 °C.
- ❑ Una vez seco, el DNA se dejó disolviendo toda la noche en 100 µl de agua estéril.
- ❑ Se determinaron la concentración y la pureza del DNA espectrofotométricamente.

3.7.2. EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO

Para el aislamiento de DNA plasmídico se siguió una modificación del método descrito por Feliciello y Chinali [72].

- ❑ Se hizo crecer la cepa de *E. coli* durante 18 h a 37°C en medio LB, con el antibiótico adecuado.

- Seguidamente, se centrifugó el cultivo bacteriano a $8000 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante.
- Para lavar el *pellet*, se resuspendió el sedimento con 0.5 ml de solución STE fría y se centrifugó de nuevo a $4^\circ C$ durante 5 minutos.
- El sobrenadante se aspiró completamente y se resuspendieron las células en 125 μl de solución I fría.
- Se añadió a la mezcla 250 μl de solución II y se homogeneizó la muestra agitando varias veces el tubo por inversión.
- Posteriormente, se incubó en hielo unos cinco minutos para permitir la lisis celular y, transcurrido este tiempo, se añadieron 375 μl de solución III. La mezcla se agitó vigorosamente por inversión y se incubó en hielo durante 10 min.
- El lisado celular se centrifugó durante 10 minutos a $10000 \times g$ y $4^\circ C$ y el sobrenadante resultante se transfirió a un tubo *eppendorf* nuevo estéril, procurando no arrastrar el sedimento.
- El DNA plasmídico se precipitó añadiendo 350 μl de isopropanol y se centrifugó a temperatura ambiente durante 5 min. Una vez sedimentado, se dejó secar el DNA en la estufa a $37^\circ C$.
- Para eliminar el RNA presente, se incubó la mezcla en presencia de 125 μl de RNAasa 10 mg/ml en solución TE y se incubó 15 minutos a $37^\circ C$.
- Seguidamente, se volvió a precipitar el DNA plasmídico añadiendo 150 μl de isopropanol al 88 % y 0.2 M de acetato potásico y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a $10000 \times g$ a temperatura ambiente durante 5 minutos, se dejó secar el sedimento y se resuspendió en 40 μl de agua destilada estéril.
- Opcionalmente, y según el grado de pureza deseado, se fenolizó en este punto el DNA plasmídico obtenido.

STE		Solución II	
NaCl	0.1 M	NaOH	0.2 M
Tris-HCl, pH 8.0	10 mM	SDS	1 %
EDTA, pH 8.0	1 mM		
Solución I		Solución III	
Glucosa	0.9 g	Acetato potásico	4 M
Tris-HCl, pH 8.0	25 mM	Ácido acético	2 M
EDTA, pH 8.0	10 mM		

3.8. TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN, MANIPULACIÓN Y VISUALIZACIÓN DEL DNA

3.8.1. CUANTIFICACIÓN DE DNA

La concentración de DNA se determinó mediante un espectrofotómetro, *modelo UV/Vis Spectrometer UV2*, de la casa ATI UNICAM. Se midió la densidad óptica del DNA (o de una dilución del mismo en agua) a 260 nm y a 280 nm, con una cubeta de cuarzo. Se estimó el valor de la concentración considerando que un valor de densidad óptica igual a 1, a 260 nm, equivale a 50 µg/ml de DNA. Asimismo, se determinó el grado de pureza del DNA, teniendo en cuenta la relación entre las densidades ópticas a 260 nm y 280 nm. Así pues, los cálculos realizados fueron los siguientes:

Concentración estimada (µg/ml) = $50 \times \text{DO (260 nm)} \times \text{factor de dilución}$

Pureza del DNA = $\text{DO (260 nm)} / \text{DO (280 nm)}$, valor aceptable entre 1.8 y 1.9.

3.8.2. PRECIPITACIÓN DE DNA

Se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.* [73], con alguna modificación:

- ❑ Se añadieron 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M a pH 4.8 y 2 volúmenes de etanol absoluto frío.
- ❑ Se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h ó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos.
- ❑ Posteriormente, se centrifugó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $10000 \times g$ durante 20-30 minutos.
- ❑ Se lavó el sedimento con etanol al 70 % frío.
- ❑ Posteriormente, se secó en una estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada o solución TE.

3.8.3. FENOLIZACIÓN

Método utilizado en ciertos casos para purificar el DNA. El protocolo seguido fue el descrito por Sambrook *et al.* [73].

3.8.4. PURIFICACIÓN PRODUCTOS DE PCR

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se purificaron con el kit de la casa comercial Qiagen, *MinElute PCR Purification Kit*, con referencia 28004. Este método de purificación permitió obtener fragmentos de DNA altamente concentrados.

3.8.5. DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción utilizadas fueron suministradas por *New England Biolabs* y se utilizaron según las indicaciones del fabricante. Por lo general, las digestiones enzimáticas se llevaron a cabo como se describe a continuación:

- ❑ El contenido total de cada digestión fue de 50 μ l e incluyó:
 - 1 μ l de enzima (aproximadamente, 10 unidades)
 - 5 μ l de tampón recomendado por el fabricante
 - 25 μ l de producto de PCR purificado
 - Agua de MilliQ estéril hasta 50 μ l
- ❑ Las digestiones se incubaron toda la noche a 37 °C.
- ❑ Finalmente, las enzimas se inactivaron a 65 °C durante 10-20 minutos.

3.8.6. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

Los fragmentos de DNA digeridos con enzimas de restricción, se purificaron antes de ser utilizados en posteriores reacciones enzimáticas. Para ello, se utilizó el kit de la casa comercial Qiagen, *MinElute Reaction Cleanup* (Ref. 28204). Esta purificación se llevó a cabo para asegurar la eficiencia de ligación de estos productos.

3.8.7. LIGACIÓN DE MOLÉCULAS DE DNA

Se utilizó la enzima ligasa suministrada por Fermentas y se utilizó según las instrucciones del fabricante. Normalmente, se añadió 1 μ l de DNA ligasa a un volumen total de 50 μ l.

3.8.8. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA

Para visualizar y recuperar fragmentos de DNA de manera rutinaria se utilizó el método de electroforesis en geles de agarosa, según el procedimiento descrito por Sambrock *et al.* [73].

Normalmente, los geles se prepararon a una concentración de agarosa del 1 % en tampón TAE \times 1. La agarosa utilizada fue de baja densidad de carga, para evitar la distorsión de la migración del DNA. El DNA se visualizó incorporando bromuro de etidio al gel a una concentración final de 0.5 mg/ml e iluminándolo con luz ultravioleta en un transiluminador. Las muestras de DNA a analizar se mezclaron en proporción 1:5 (v/v) con solución transportadora que contenía azul de bromofenol 0.25 %, xilen-cyanol 0.25 % y glicerol 30 %. El patrón utilizado para identificar el tamaño de las muestras de DNA analizadas fue el *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder* de Fermentas (figura 3.2).

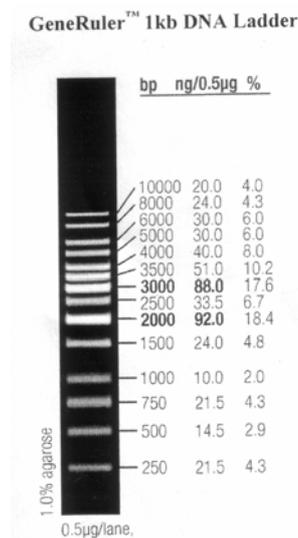


Fig. 3.2. Patrón utilizado en la identificación de fragmentos de DNA: *Gene Ruler 1 Kb DNA Ladder*.

3.9. DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES

Se realizaron extracciones de DNA de todas las cepas de *S. pneumoniae* y se amplificaron por PCR regiones que contenían la QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) de los cuatro genes diana de las fluoroquinolonas: *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. En la tabla 3.6 se muestran los oligonucleótidos utilizados. Posteriormente a la purificación y preparación de los amplificadores obtenidos mediante PCR, se llevaron las muestras al Servicio de Secuenciación de los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Barcelona. La determinación de la secuencia de estas regiones se llevó a cabo de manera automática con deoxinucleótidos fluorescentes, con el *ABI PRISM BigDye Terminator Sequencing Ready Reaction Kit*.

Tabla 3.6. Relación de oligonucleótidos empleados en la amplificación de las QRDR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* [74].

Gen amplificado	Nombre del <i>primer</i>	<i>Primer</i>
<i>gyrA</i>	GyrA-D	5'-CCGTCGCATTCTTTACG -3'
	GyrA-R	5'-AGTTGCTCCATTAACCA -3'
<i>gyrB</i>	GyrB-D	5'- TGC GCGTGAAGTCACACGTA-3'
	GyrB-R	5'-GCATCGGTCATCAAAACGAG -3'
<i>parC</i>	ParC-D	5'- TGGGTTGAAGCCGGTTCA-3'
	ParC-R	5'-CAAGACCGTTGGTTCTTTC -3'
<i>parE</i>	ParE-D	5'-CCAATCTAAGAATCCTG -3'
	ParE-R	5'- GCAATATAGACATGACC-3'

3.10. INACTIVACIÓN DEL GEN *pmrA* EN *S. pneumoniae*.

Estrategia PLM (*PCR Ligation Mutagenesis*)

En la inactivación del gen *pmrA* de *S. pneumoniae* se aplicó una técnica desarrollada por Peter C. Y. Lau *et al.* [75], que permite la inactivación de genes con distintos propósitos. Este método recibe el nombre de PLM (*PCR ligation mutagenesis*) y consiste, en primer lugar, en la identificación de la secuencia del gen diana que se quiere inactivar (en este caso,

pmrA) y de las regiones adyacentes. Posteriormente, se crea una construcción mutagénica, constituida por dos fragmentos flanqueantes al gen diana y un cassette de resistencia a algún antibiótico, mediante la ligación de estos tres fragmentos. Finalmente, se procede a la incorporación de esta construcción en el genoma de una cepa de *S. pneumoniae*, vía transformación y recombinación homóloga.

3.10.1. ANÁLISIS GENÓMICO PARA LA DETECCIÓN DE LUGARES DE RESTRICCIÓN POCO FRECUENTES EN *S. pneumoniae*

Se realizó un análisis de los sitios de restricción menos frecuentes en el cromosoma de la cepa R6 de *S. pneumoniae*, a partir de la secuencia disponible en la base de datos del GenBank (Tabla XI). Para ello se utilizó el programa de análisis de restricción: http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/enzyme_cuttingtool. La elección de dos sitios de restricción poco frecuentes se realizó por la posibilidad de aplicación del método en la inactivación de otros genes de *S. pneumoniae*, ya que los oligonucleótidos diseñados para amplificar el cassette presente en la construcción mutagénica (en nuestro caso un cassette de resistencia a cloranfenicol, *cat*) pueden ser utilizados en otras construcciones usando las mismas dianas de restricción.

3.10.2. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES FLANQUEANTES AL GEN Y DEL CASSETTE *cat*

- A partir de la secuencia de *S. pneumoniae* y la localización del gen *pmrA*, se determinaron las parejas de oligonucleótidos PmrA-P1/PmrA-P2 y PmrA-P3/PmrA-P4 (tabla 3.7) para amplificar, mediante PCR, las regiones flanqueantes del gen *pmrA* del DNA de R6, considerando las regiones que aparecen en la figura 3.3. Asimismo, se amplificó el cassette de resistencia a cloranfenicol con los *primers* Cat-PA y Cat-PB (tabla 3.7), según el esquema de la figura 3.4.

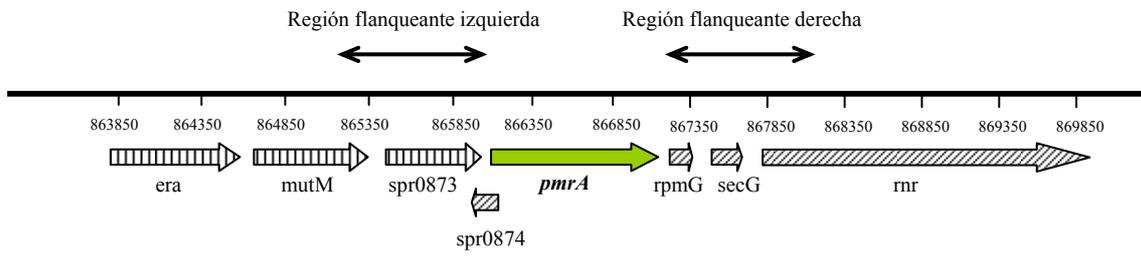


Fig. 3.3. Regiones consideradas en el contexto genómico de *S. pneumoniae* para el diseño de los oligonucleótidos de las regiones flanqueantes del gen *pmrA*.

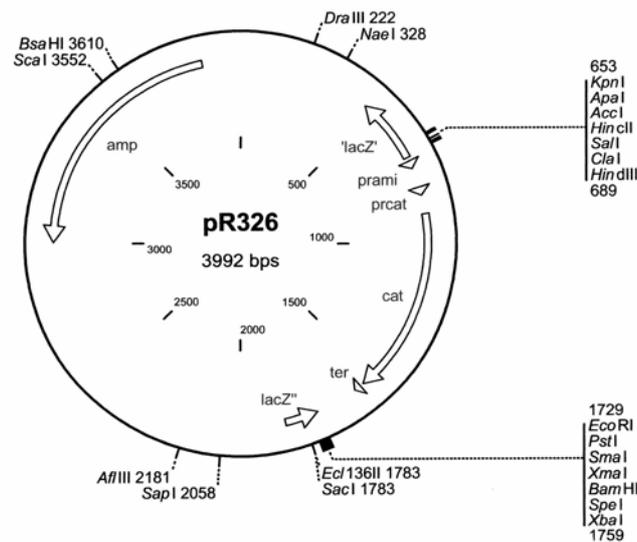


Fig. 3.4. Regiones consideradas en el diseño de los oligonucleótidos para amplificar el cassette *cat* del plásmido pR326. Se amplificó el marcador de resistencia a cloranfenicol junto con la región promotora (*prami*), necesaria para la expresión de *cat* en *S. pneumoniae*.

Tabla 3.7. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las regiones flanqueantes del gen *pmrA* (PmrA-P1 a PmrA-P4) y el cassette *cat* (Cat-PA y Cat-PB).

<i>Primer</i>	Secuencia de nucleótidos	Región amplificada (pb)	Numeración asignada
PmrA-P1	5'-GCGGATGGAGGGCAAGTATTTTT-3'	1301	I
PmrA-P2	5'-CGAGGCGCGCCATAAAAGGTACAACCAA-3'		
Cat-PA	5'-ACGGCGCGCCAATTGTAATACGACTCAC-3'	1000	II
Cat-PB	5'-CTAACGCGGCCGCTTAGTGACATTAGAA-3'		
PmrA-P3	5'-GTTCTGCGGCCGCAGGTCAATTTGGCTA-3'	1394	III
PmrA-P4	5'-CCTTCCATATCCTTTTGAGACGGA-3'		

Las regiones subrayadas contienen las dianas de restricción *AscI* (GG[^]CGCGCC) y *NoI* (GC[^]GGCCGC). Los nucleótidos en sombra corresponden a cambios de bases realizados en la secuencia de nucleótidos.

- El contenido total de cada reacción de PCR fue de 50 µl e incluyó:
 - 1 µl de DNA 50 ng/µl (50 ng finales)
 - 0.25 µl de Taq polimerasa 5 u/µl (1.25 u/reacción)
 - 5 µl de tampón 10 × (concentración final 1 ×)
 - 5 µl de dNTPs 2000 µM (concentración final 200 µM)
 - 5 µl de MgCl₂ 25 mM (concentración final 2.5 mM)
 - 0.5 µl de cada oligonucleótido 100 µM (concentración final 1 µM)
 - Agua de MilliQ estéril hasta 50 µl

- Las condiciones de los ciclos de la PCR utilizadas en todos los casos fueron las siguientes:

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
94 °C	5 '	1
94 °C	45 ''	30
55 °C	45 ''	
72 °C	2 '	
72 °C	10 '	1

3.10.3. GENERACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN MUTAGÉNICA

Tras la amplificación de los fragmentos I, II y III, se digirió cada uno de ellos con la enzima o las enzimas de restricción correspondientes. Después de la inactivación enzimática y la purificación de los fragmentos, según se describe en el apartado 3.9.5, se realizó una ligación independiente de los mismos, para comprobar la eficiencia de las digestiones. Tras esta verificación, se realizó la ligación conjunta de las secuencias I, II y III y se comprobó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %.

3.10.4. TRANSFORMACIÓN Y RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

Una vez conseguida la construcción I+II+III (figura 3.5), se procedió a transformar la cepa deseada de *S. pneumoniae* según el protocolo descrito en el apartado 3.6.3.

Los transformantes conseguidos, seleccionados en placas de medio C+Y con cloranfenicol, se confirmaron mediante PCR. El procedimiento seguido fue el siguiente:

- ❑ Se seleccionaron los distintos transformantes y se sembraron, uno a uno, en placas de agar sangre con cloranfenicol.
- ❑ Estos transformantes se hicieron crecer en medio BHI con cloranfenicol hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm entre 0.5 y 0.7.
- ❑ Transcurrido este tiempo, los transformantes se congelaron rápidamente en alícuotas de 1 ml (en una mezcla de nieve carbónica-etanol), añadiendo glicerol hasta un 10 % de concentración final. Parte de los cultivos crecidos en cloranfenicol se utilizó para la extracción de DNA.

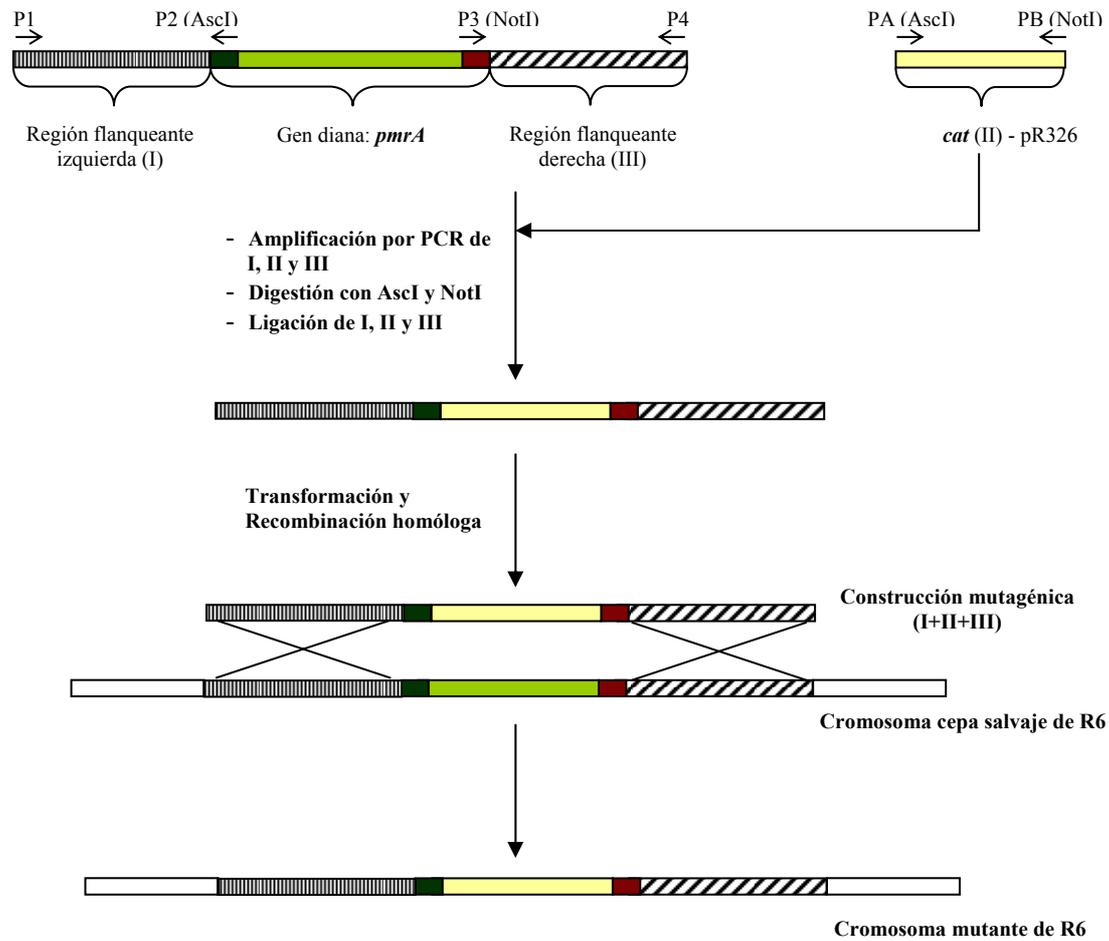


Fig. 3.5. Esquema de la estrategia de mutagénesis de ligación mediante PCR.

- Se comprobó mediante PCR la validez de los transformantes, para asegurar la presencia de la construcción mutagénica en ellos. Se siguió el procedimiento descrito por Alessandra Polissi *et al.* [76], en la extracción rápida de DNA de los transformantes:
 - Se centrifugó 1 ml del cultivo crecido en medio BHI con cloranfenicol, durante 5 min.
 - Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 µl de agua destilada estéril.
 - Se hirvieron las muestras durante 5 min y se utilizaron 4 µl para llevar a cabo las PCRs de comprobación.

- Las PCRs que se realizaron fueron tres, cada una con las siguientes parejas de oligonucleótidos:
 1. PmrA-P1 / PmrA-P4 (amplificación de la construcción I+II+III)
 2. PmrA-P1 / Cat-PB (amplificación del fragmento de ligación I + II)
 3. Cat-PA / PmrA-P4 (amplificación del fragmento de ligación II + III)
- Los condiciones de los ciclos de las PCRs en este caso se modificaron ligeramente, aumentando a 3.5 minutos el tiempo de elongación.

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
94 °C	5 ´	1
94 °C	45 ´´	
55 °C	45 ´´	30
72 °C	3.5 ´	
72 °C	10 ´	1

3.11. COMPARACIÓN Y ALINEACIÓN DE SECUENCIAS

En la actualidad existen varios métodos o algoritmos para la búsqueda de secuencias, los cuales se resumen en dos grupos fundamentales: los métodos formales y los métodos aproximativos. Los métodos formales posibilitan la realización de búsquedas complejas que permiten determinar coincidencias exactas, multiplicidades, inserciones y deleciones, pero llevan más tiempo para su realización a menos que se use maquinaria especializada o se busque en una base de datos pequeña. Por otra parte, los métodos aproximativos también permiten el mismo tipo de determinaciones, pero no garantizan encontrar las mejores comparaciones y pueden perder algunas similitudes significativas. Sus resultados requieren una interpretación más detenida antes de aceptarlos, pero son mucho más rápidos y a menudo proporcionan resultados satisfactorios. Los más utilizados son FASTA y BLAST, ambos basados en la realización de análisis comparativos entre secuencias. Estos dos algoritmos emplean distintos enfoques estadísticos al momento de comparar secuencias y sus diferencias estriban principalmente en velocidad y precisión.

En este trabajo se ha utilizado el algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) en la comparación y búsqueda de secuencias homólogas. La principal característica del BLAST es su velocidad, pudiendo tomar pocos minutos cualquier búsqueda en todas las bases de datos.

La alineación de las secuencias proteicas de las bombas de reflujos de bacterias Gram positivas con las proteínas homólogas encontradas en cepas del género *Streptococcus* se realizó mediante el programa de alineación de secuencias *ClustalW Alignment, Maxvecto 6.5 Oxford Molecular*. Los parámetros fijados en la alineación de las secuencias fueron los establecidos por defecto en el programa.

3.12. MICROARRAYS DE DNA.

TÉCNICA FAIM (*Fitness Analysis of Insertional Mutants*)

El método denominado FAIM consiste, a grandes rasgos, en crear una librería de mutantes mediante inserciones de transposones en una bacteria determinada y, posteriormente, someter la librería obtenida a una determinada condición de selección. En nuestro caso la librería creada se sometió a dosis subletales de ciprofloxacina, la fluoroquinolona de estudio. En estas condiciones, algunos mutantes insercionales con sensibilidad aumentada al antibiótico (por ejemplo, aquellos donde la disrupción se encuentre en un transportador de múltiples antibióticos) puede que mueran o dejen de crecer. Si un mutante insercional muere en presencia del antibiótico, este clon también desaparecerá de la librería después de la exposición al antibiótico. Este cambio podrá observarse uniendo el DNA de las regiones flanqueantes de las inserciones del transposón de la librería original con un fluorocromo de un color y el DNA de la librería sometida al antibiótico con otro fluorocromo de otro color, e hibridando las dos muestras a un *microarray* que contenga una representación de los genes de la bacteria.

3.12.1. CREACIÓN DE UNA LIBRERÍA GENÓMICA

Se creó una librería genómica a partir de la cepa salvaje de *E. coli* MG1655 mediante una estrategia transposómica. Esta técnica consiste en crear un complejo estable en ausencia de Mg^{2+} , denominado transposom, con un transposón y una transposasa, e incorporarlo en células bacterianas por electroporación. Una vez en el interior celular, se activa en presencia de Mg^{2+} y el transposón se inserta aleatoriamente en el DNA genómico del huésped. En la figura 3.6 se muestra un esquema del método utilizado.

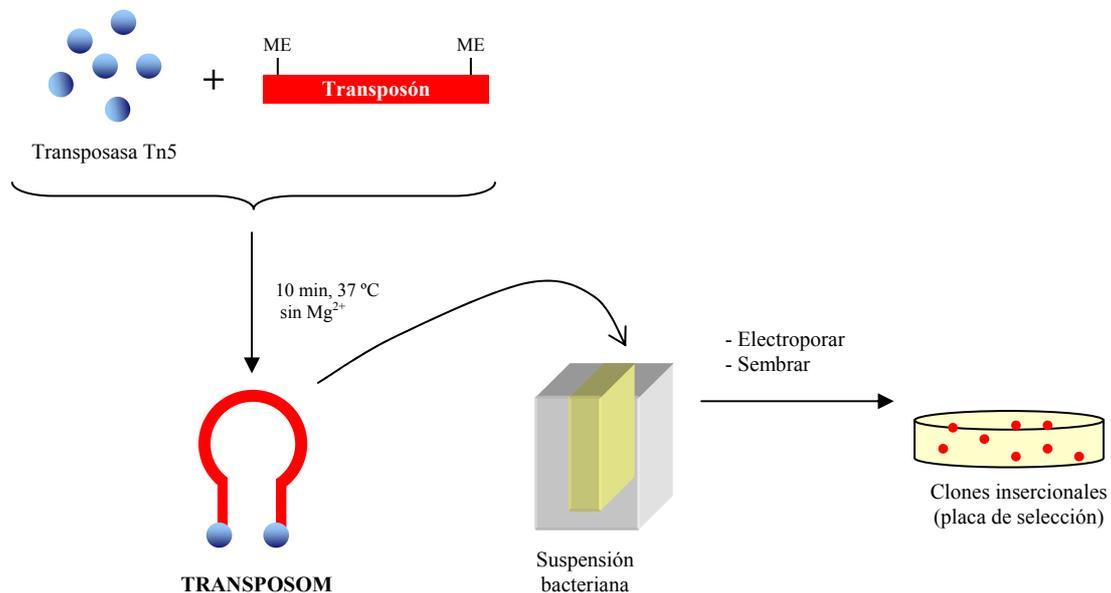


Fig. 3.6. Proceso de creación de la librería genómica utilizando la estrategia transposómica. La enzima transposasa se une a las secuencias ME (*mosaic end*) de los extremos del transposón, para formar un transposom. El transposom, una vez insertado, rompe aleatoriamente los enlaces fosfodiéster del DNA diana. Finalmente, la transposasa cataliza la unión covalente de los extremos 3'-OH del transposón y los extremos 5-fosforilados del DNA diana.

Para crear el transposom se utilizó un transposón que contenía un cassette (denominado Ω) de resistencia a estreptomicina y espectinomicina (figura 3.7). Las secuencias de los extremos del transposón corresponden a secuencias de reconocimiento de la transposasa Tn5 (denominadas *mosaic end* o ME); éstas son iguales e invertidas. Gracias a

ello, las regiones flanqueantes al transposón pueden secuenciarse utilizando *primers* homólogos a sus extremos.

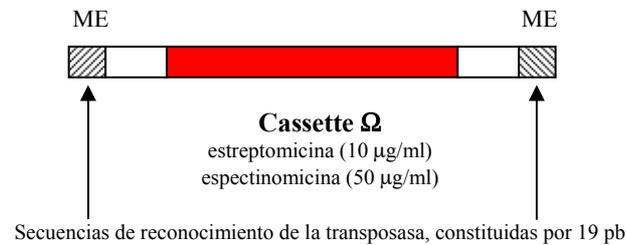


Fig. 3.7. Esquema del transposón utilizado para generar la librería de mutantes

La transposasa Tn5 utilizada fue suministrada por la compañía Epicentre (www.epicentre.com). Esta enzima se une a las secuencias ME (*mosaic end*) de 19 bp, de los extremos del transposón, para formar el transposom. El complejo obtenido (el transposom), se electroporó en células electrocompetentes de *E. coli* MG1655. El transposom, una vez insertado en el genoma bacteriano, rompe aleatoriamente los enlaces fosfodiéster del DNA diana y la transposasa cataliza la unión covalente de los extremos 3'-OH del transposón y los extremos fosforilados del DNA diana.

Tras la electroporación, se seleccionaron los clones insercionales en placas con estreptomicina y espectinomicina. La librería resultante, que recibió el nombre de librería TnΩ, constó de aproximadamente 40000 clones independientes. El número de inserciones totales se estimó considerando el tamaño del genoma de *E. coli* (4.6 Mpb) y el número de clones seleccionados. Esto teóricamente correspondió a una inserción cada 120 pb, que debería cubrir todos los genes del cromosoma de la bacteria. Este criterio es el que se utiliza generalmente para estimar la complejidad de una librería genómica.

3.12.2. CONDICIONES DE SELECCIÓN DE LA LIBRERÍA GENÓMICA

La condición de selección consistió en someter la librería Tn Ω a dosis subletales de ciprofloxacina. Previamente, sin embargo, se determinó la concentración de antibiótico óptima que permitiera la selección de determinados mutantes insercionales distintos a los de la librería original e implicara unas condiciones de crecimiento suficientemente distintas como para diferenciar el cultivo sometido a ciprofloxacina de la librería original. El procedimiento fue el siguiente:

- ❑ Se determinó la MIC de ciprofloxacina para la librería genómica creada.
- ❑ Se incubó en 100 ml de medio LB una suspensión bacteriana de la librería de *E.coli* en agitación a 37 °C, hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.3.
- ❑ El cultivo se diluyó hasta alcanzar una concentración aproximada de $7 \cdot 10^5$ ufc/ml.
- ❑ Se repartieron 20 ml del cultivo diluido en cuatro *erlenmeyers* de 200 ml de capacidad.
- ❑ En cada *erlenmeyer* se añadió una concentración de ciprofloxacina distinta:
 - 0 μ g/ml de ciprofloxacina
 - 1/10 el valor de la MIC de ciprofloxacina
 - 1/5 el valor de la MIC de ciprofloxacina
 - 1/2 el valor de la MIC de ciprofloxacina
- ❑ Se incubaron los distintos matraces a 37 °C y en agitación y se fueron midiendo las densidades ópticas a 600 nm de los cultivos, cada 30 minutos, durante 3-4 horas.

3.12.3. EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

- ❑ Se partió de un cultivo de la librería genómica de 300 ml (en medio LB) a una densidad óptica a 600 nm de 0.01.
- ❑ Se distribuyeron a partes iguales los 300 ml del cultivo en dos *erlenmeyers* de 500 ml de capacidad.
- ❑ En cada *erlenmeyer* se añadió una concentración de ciprofloxacina distinta:
 - 0 μ g/ml de ciprofloxacina
 - 1/5 el valor de la MIC de ciprofloxacina

- ❑ Se incubaron los dos cultivos en agitación a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 1.
- ❑ Los cultivos se centrifugaron y se resuspendieron en 10 ml de tampón TE.
- ❑ Se añadieron 600 µl de sarcosil al 10 % y 60 µl de proteinasa K (partiendo de un *stock* a 20 mg/ml) y se incubó a 37 °C durante aproximadamente 45 minutos.
- ❑ Transcurrido este tiempo, se añadieron 2 ml de cloruro sódico saturado y 1.6 ml de CTAB/NaCl (previamente calentado a 65 °C). Se mezcló vigorosamente y se incubó a 65 °C durante 10 minutos.
- ❑ Se añadieron volúmenes iguales de fenol:cloroformo:isoamílico y se mezcló por inversión.
- ❑ Seguidamente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos y se transfirió la fase superior a un tubo nuevo.
- ❑ Para precipitar el DNA se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol.
- ❑ El DNA obtenido se transfirió, con la ayuda de una pipeta Pasteur, a un tubo con 1 ml de etanol al 70 %.
- ❑ Volvió a precipitarse el DNA genómico durante 5 minutos a 4000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
- ❑ Se dejó secar el DNA a temperatura ambiente durante 10 minutos y se resuspendió en 0.5 ml de agua, dejándolo a 50 °C durante aproximadamente 1 hora.
- ❑ Se añadió 5 µl de RNasa 20 mg/ml y se dejó actuar durante 2 h a 50 °C o bien toda la noche a temperatura ambiente.
- ❑ El DNA se purificó realizando dos extracciones con fenol:cloroformo:isoamílico.
- ❑ Finalmente, se estimó la concentración y la pureza del DNA espectrofotométricamente.

Tampón TE

Tris-HCl pH 7.6 10 mM

EDTA 1 mM

Solución CTAB/NaCl

CTAB 10 % (v/v)

NaCl 0.7 M

3.12.4. OBTENCIÓN DE LA SONDA DE DNA

Generación de cadenas sencillas de DNA (ssDNA)

Se llevó a cabo una PCR lineal para la generación de fragmentos de DNA de cadena sencilla de aproximadamente 300 pb. El *primer* utilizado en esta reacción de PCR se marcó con biotina en el extremo 5'. La biotinización es una reacción bioquímica que permite unir biotina a una gran variedad de moléculas, en este caso a DNA. Debido al pequeño tamaño de esta proteína, la adición de biotina no modifica drásticamente las propiedades de la molécula a la cual se une y no varía tampoco la especificidad o la temperatura de hibridación del oligonucleótido marcado.

La concentración de DNA genómico de la librería Tn Ω fue de 1 mg/ml y la relación molar DNA genómico-*primer* biotilado fue de 300:1. El contenido total de cada reacción de PCR fue de 100 μ l e incluyó:

- 80 μ l de DNA genómico (1 mg/ml)
- 4 μ l de Taq polimerasa Eppendorf HotMaster
- 10 μ l de tampón Eppendorf HotMaster \times 10
- 4 μ l de dNTPs 10 mM
- 0.8 μ l de *primer* biotilado (*OmegaOut65 primer*) (10 pmol/ μ l)
- Agua de MilliQ estéril hasta 100 μ l

Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las que se indican a continuación:

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
94 °C	5 '	1
94 °C	30 ''	15
60 °C	20 '	

La mayoría de fragmentos que se obtuvieron fueron de un tamaño aproximado de 300 pb, gracias a las condiciones establecidas en la PCR. En ellas no se dejó un tiempo de

elongación a 72 °C, para que la Taq no pudiera leer fragmentos muy largos de DNA. Por otra parte, se utilizó un único *primer*, ya que en los extremos del transposón las secuencias son iguales e invertidas.

Recuperación de los fragmentos de ssDNA biotinizados

Para la recuperación de los fragmentos de ssDNA de la mezcla de reacción, se utilizó una solución denominada *Dynabeads M-270 Streptavidin*, con *beads* (pequeñas bolitas) de estreptavidina. Estas bolitas son esferas uniformes de poliestireno y magnéticas (contienen magnetita (Fe₃O₄)), con una monocapa de estreptavidina covalentemente unida a la superficie hidrofílica de las esferas. Debido a la gran afinidad biotina-estreptavidina, los *Dynabeads* permitieron capturar los fragmentos de ssDNA amplificados y separarlos del resto de componentes de la reacción. La separación de estos fragmentos una vez unidos a las pequeñas esferas de estreptavidina se realizó mediante un soporte magnético (con capacidad para seis tubos *ependorf*). El procedimiento seguido constó de varias etapas:

- ❑ Se mezcló la solución de *Dynabeads* pipeteando, ya que las pequeñas esferas de estreptavidina tienden a sedimentar.
- ❑ Se tomó una alícuota de 15 µl y se transfirió a un tubo *ependorf* de 1.5 ml de capacidad. Seguidamente se añadieron 100 µl de tampón B&W × 1 y se mezcló bien con la pipeta.
- ❑ El tubo se situó en un soporte magnético durante 2 minutos para recuperar los *Dynabeads*. Después se repitió el lavado, se extrajo la solución y se resuspendieron los *beads* en 5 µl de tampón B&W × 1.
- ❑ Seguidamente se añadieron 100 µl de tampón B&W × 2 a los 100 µl de la reacción de PCR (concentración final de tampón B&W × 1) y se añadieron los 200 µl de la mezcla resultante a los *Dynabeads* lavados.
- ❑ Se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- ❑ Se situó el tubo en el soporte magnético durante 2 minutos y se extrajo la solución, procurando no arrastrar los *beads* con el ssDNA fijado.
- ❑ Se añadieron 200 µl de tampón B&W × 1, se resuspendió, se situó de nuevo en el soporte magnético durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.

- Nuevamente se añadieron 200 µl de tampón B&W × 1, se resuspendió y se transfirió la mezcla a un tubo nuevo. Se situó entonces en el soporte magnético durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- Seguidamente se lavaron los *beads* con 200 µl de formamida al 50 %, cinco veces, eliminando en cada lavado el sobrenadante.
- Finalmente, se realizaron cinco lavados con 200 µl de agua, para eliminar restos de formamida y se resuspendieron los *beads* en 20 µl de agua.

Tampón B&W × 2

Tris-HCl pH 7.5	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	2 M

Comprobación del ssDNA

Se hizo necesario comprobar que los fragmentos de ssDNA (amplificados y recuperados con los *beads*) estuvieran libres de DNA genómico. Para ello se realizaron dos PCRs, utilizando *primers* específicos para la amplificación de genes esenciales y genes no esenciales [77]. Los mutantes con inserciones del transposón en genes esenciales desaparecieron al crear la librería genómica (no fueron capaces de crecer), por lo tanto, la amplificación de genes esenciales del DNA correspondiente a la librería creada y sometida a dos condiciones de crecimiento distintas, debería ser negativa. En cambio, en la PCR de genes no esenciales se deberían observar fragmentos amplificados en ambas condiciones. Cabe destacar que en estas reacciones se utilizó como DNA control la cepa salvaje, que mostró fragmentos amplificados tanto de genes esenciales como no esenciales.

Se utilizó 1.5 µl de ssDNA (recuperado en los *beads*) como cadena molde. Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las que se indican a continuación:

Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
94 °C	5 ´	1
94 °C	30 ´´	
54 °C	30 ´´	30
68 °C	20 ´	

Marcaje fluorescente de la sonda de DNA

El marcaje del DNA diana se realizó con los colorantes fluorescentes de la casa comercial Molecular Probes, Alexa Fluor 555 (equivalente al marcador fluorescente Cy3) y Alexa Fluor 647 (equivalente al marcador fluorescente Cy5). Esta fase de marcaje, llamada *Dye conjugation*, vino precedida por otras etapas:

1) *Poliadenilación del ssDNA*

Una vez recuperado el ssDNA, se llevó a cabo la incorporación de una cadena de adeninas mediante una transferasa terminal, tal y como muestra la figura 3.8.

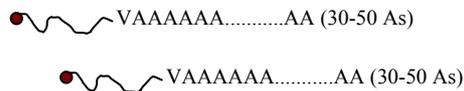


Fig. 3.8. Esquema del proceso de poliadenilación (A, adenina; V, aminoácido T, C o G)

La reacción de poliadenilación se llevó a cabo en un volumen final de 50 µl e incluyó:

- 20 µl de ssDNA (en los *beads*)
- 5 µl de CoCl₂ 2.5 mM
- 5 µl de tampón 10 × (NEB buffer #4)
- 1 µl de dATP 100 µM
- 1 µl de transferasa terminal (TdT, 20 U/µl)
- 18 µl de agua de MilliQ estéril

2) *Incorporación mediante PCR de aminoalil dUTP (aa-dUTP)*

El ssDNA poliadenilado se modificó mediante PCR con la incorporación de dUTP aminoalil. Por otra parte, la longitud de los oligonucleótidos utilizados fue de 27 nucleótidos, para amplificar únicamente un número determinado de adeninas de la cadena poliadenilada. Uno de los *primers* de la reacción de PCR fue ligeramente distinto para el ssDNA procedente de la librería original y el ssDNA de la librería sometida a 1/5 de la MIC, para evitar que los ssDNA de los dos cultivos hibridaran entre sí. El otro primer utilizado, TnOut, amplificó el ssDNA a partir de las regiones repetidas más externas del transposón. La relación entre aa-dUTP y dTTP fue 3:2.

El contenido total de cada reacción de PCR fue de 100 µl e incluyó:

- 2 µl de ssDNA poliadenilado
- 2 µl de Taq polimerasa CLP
- 10 µl de tampón 10 ×
- 3 µl de MgCl₂ 50 mM
- 6 µl de aa-dUTP 2 mM
- 8 µl de dTTP 1 mM
- 2 µl de dATP 10 mM
- 2 µl de dCTP 10 mM
- 2 µl de dGTP 10 mM
- 1 µl de *primer* TATV 3/5
- 1 µl de *primer* TnOutA 3/5
- Agua de MilliQ estéril hasta 100 µl

Las condiciones de la PCR utilizadas fueron las que se indican a continuación:

<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Número de ciclos</i>
94 °C	5 ´	1
95 °C	10 ´´	
47 °C	10 ´´	25
68 °C	10 ´	

3) *Purificación y concentración del DNA diana*

Previamente al marcaje de las sondas de DNA obtenidas tras el método aminoalil, éstas se purificaron con el kit de Promega *Wizard SV Gel and PCR Clean-up system* (Ref. A9281). Una vez purificadas las muestras, se tomó una alícuota para la determinación espectrofotométrica de la concentración de DNA. Seguidamente se precipitó el DNA con acetato sódico 0.3 M y 3 volúmenes de etanol absoluto y se dejó un tiempo no inferior a 15 minutos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm y se lavó con etanol frío al 80%. El *pellet* resultante se dejó secar al aire completamente y se resuspendió con agua para conseguir una concentración del DNA de 1 $\mu\text{g/ml}$.

4) *Marcaje del DNA diana con moléculas fluorescentes (Dye conjugation)*

El proceso seguido para el marcaje del DNA diana fue el siguiente:

- Se desnaturalizaron 5 μl del DNA diana a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos y se puso en hielo inmediatamente después.
- Se resuspendieron con 2 μl de DMSO los colorantes fluorescentes deshidratados y se mezclaron con la ayuda de un vórtex. Los colorantes fluorescentes utilizados fueron Alexa Fluor 555 y Alexa Fluor 647.
- Al DNA diana se le añadieron 3 μl de tampón de unión (bicarbonato sódico) y se mezcló con el colorante correspondiente resuspendido en DMSO.
- Se incubó el DNA con el marcador fluorescente en la oscuridad durante 1 hora.
- Por cada 10 μl de reacción se añadieron 90 μl de agua y se procedió a la purificación del DNA marcado fluorescentemente, utilizando el kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up system* de Promega.
- Se precipitó el DNA marcado con acetato sódico 0.3 M y 3 volúmenes de etanol absoluto y se dejó un tiempo no inferior a 15 minutos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó 15 minutos a 10000 rpm y se lavó con etanol frío al 80 %. El *pellet* resultante se dejó secar al aire completamente y se resuspendió con 12 μl de agua.

3.12.5. HIBRIDACIÓN DE LA SONDA DE DNA EN EL *MICROARRAY*

El proceso de hibridación de las muestras de DNA marcadas fluorescentemente fue el siguiente:

- ❑ El DNA diana ya marcado fluorescentemente se desnaturalizó a 95 °C durante 3 minutos y se puso en hielo inmediatamente después.
- ❑ Se dejó enfriar la muestra como mínimo un minuto antes de centrifugar brevemente la muestra para recuperar todo el DNA diana.
- ❑ Seguidamente se añadieron 50 µl de tampón de hibridación al DNA diana (volumen total de 60 µl).
- ❑ Se combinaron cantidades iguales de las dianas marcadas con Cy3 y Cy5 (volumen total de 120 µl).
- ❑ La mezcla de hibridación resultante se depositó sobre el centro del *microarray*, evitando que se formaran burbujas. Se selló el marco con una especie de plástico adherente que se depositó cuidadosamente encima de la muestra.
- ❑ Se situó el *microarray* en una cámara de hibridación a 42 °C, protegido de la luz y se dejó durante toda una noche.

Lavado y secado del *microarray*

Por último, se lavó y secó el *microarray*, antes de proceder a la lectura de los resultados con un escáner. Este proceso constó de las siguientes etapas:

- ❑ Se distribuyeron 45 ml de las soluciones A, B y C en tubos cónicos protegidos con papel de aluminio y se precalentaron a 30 °C.
- ❑ El *microarray* se extrajo del horno de hibridación y, cuidadosamente, se retiró la cubierta de plástico que fijaba la mezcla de hibridación al chip. Éste se sumergió en el tubo que contenía la solución de lavado A y se dejó en el horno de rotación a 30 °C durante 5 minutos.
- ❑ Esta operación se repitió sumergiendo el *microarray* en el tubo con la solución de lavado B y se dejó en el horno de rotación a 30 °C durante 5 minutos.
- ❑ El último lavado se realizó durante 5 minutos a 30 °C en la solución C.

- Tras los lavados, se secó el chip introduciéndolo en un tubo vacío cónico que se centrifugó a temperatura ambiente durante dos minutos a 2000 rpm.

Solución A

SSC 20 ×	25 ml
SDS 10 %	2.5 ml
Agua destilada	hasta 250 ml

Solución B

SSC 20 ×	12.5 ml
Agua destilada	hasta 250 ml

Solución C

SSC 20 ×	1.25 ml
Agua destilada	hasta 250 ml

3.12.6. CARACTERÍSTICAS DEL *MICROARRAY* UTILIZADO

El *microarray* utilizado en la aplicación de la técnica FAIM fue el *MWG Biotech E. coli Start-Up array*. Este chip contiene dos repeticiones de 96 de oligonucleótidos de 50 nt, correspondientes al genoma de la cepa de *E. coli* K12, incluyendo un oligonucleótido control de *Arabidopsis* (que corresponde a un gen de *Arabidopsis thaliana*), para confirmar que la hibridación se realiza con éxito. Concretamente, consta de 60 genes regulados y 32 no regulados, que constituirían un experimento para detectar genes que codifican para proteínas *heat-shock*. En este *microarray* un gen está generalmente representado por un oligonucleótido específico. Varias secuencias de genes pueden estar cubiertas por un oligonucleótido común si éstos contienen polimorfismos o son altamente homólogos por ser miembros de la misma familia genética. Por otro lado, un gen puede estar representado por más de un oligonucleótido si, por ejemplo, los oligonucleótidos son homólogos a regiones específicas de distintas isoformas del gen.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS EN *S. pneumoniae*

Planteamiento experimental

La sensibilidad de las bacterias a los antibióticos varía como consecuencia de la aparición de genes de resistencias y la posterior selección de las cepas que los expresan. Esta resistencia puede deberse a distintos factores, como son la incapacidad del antibiótico de atravesar las envueltas celulares, alteraciones en las dianas específicas del antibiótico, la capacidad del microorganismo de expulsar el antibiótico, o la producción, por parte de la bacteria, de enzimas capaces de inactivar la sustancia antimicrobiana.

A pesar de la disponibilidad de numerosos antibióticos y de los distintos mecanismos de acción, la selección de un antimicrobiano con una buena eficacia clínica no resulta sencilla. Además, la diversidad de organismos causantes de infecciones y la emergencia de cepas de interés clínico resistentes a los antibióticos complican la selección apropiada del agente antimicrobiano. Es por ello que se requiere del desarrollo de nuevos procedimientos profilácticos y terapéuticos para dar solución a los problemas impuestos por la aparición de la resistencia bacteriana [78;79].

S. pneumoniae permanece como causa mayoritaria de infecciones adquiridas en el ámbito extrahospitalario, incluyendo neumonía, bacteremia y meningitis, y conlleva un elevado porcentaje de morbilidad y mortalidad en humanos, afectando principalmente a adultos y niños [74;80-83;101]. En el pasado, el tratamiento de las infecciones neumocócicas era relativamente sencillo debido a la elevada sensibilidad de *S. pneumoniae* a la penicilina. Sin embargo, la frecuencia de aislamiento de neumococos resistentes a distintos antibióticos se ha incrementado notablemente. Este incremento es de distribución cosmopolita, de modo que la resistencia a los antibióticos en *S. pneumoniae* constituye un problema de salud pública de nivel general. El principal mecanismo de resistencia a la penicilina es la producción de proteínas de unión a la penicilina alteradas, que dan lugar a resistencias cruzadas a otros tipos de antibióticos β -lactámicos, incluyendo incluso los carbapenems y cefalosporinas de tercera generación. En España, se detectó por primera vez la resistencia a penicilina en *S. pneumoniae*

en 1979 y, desde entonces, se ha descrito un aumento de la incidencia de cepas con resistencia a penicilina y a otros antibióticos no relacionados. La creciente prevalencia de la resistencia de *S. pneumoniae* a estos antibióticos ha llevado a la utilización de otros agentes antimicrobianos como las fluoroquinolonas. Esta clase de antibióticos es una de las terapias antimicrobianas más utilizadas en la actualidad en hospitales y en el ámbito extrahospitalario.

En este apartado se determinaron los patrones de sensibilidad antibiótica de las cepas clínicas de *S. pneumoniae*.

Resultados y Discusión

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de distintos antibióticos en las cepas de *S. pneumoniae*, por el método de la doble dilución en agar descrito en el apartado 3.4.2 de material y métodos. En la figura 4.1 se muestra una foto de una placa de agar sangre con distintas cepas de neumococo, sembradas utilizando un replicador de Steer.

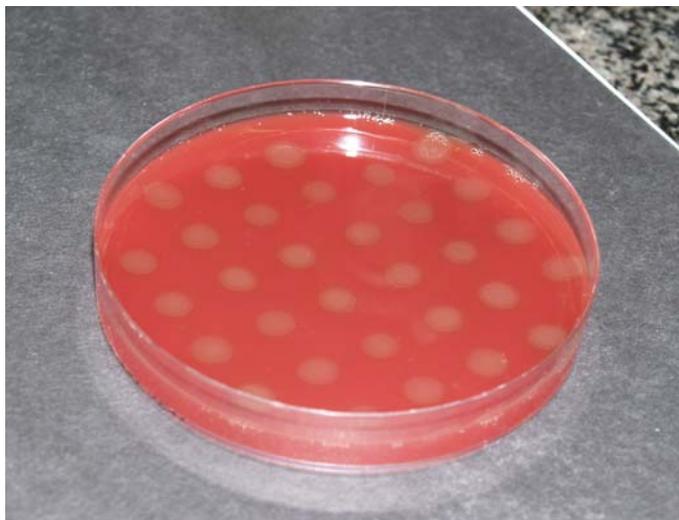


Fig. 4.1. Siembra en agar sangre de cepas de *S. pneumoniae*, mediante un replicador de Steer.

Con el fin de establecer un patrón de sensibilidad de las cepas objeto del estudio, se escogieron antibióticos pertenecientes a tres grupos distintos de antimicrobianos: inhibidores de la síntesis proteica (cloranfenicol y tetraciclina), inhibidores de la síntesis del

peptidoglicano (penicilina) e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (fluoroquinolonas: ciprofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina y gemifloxacina). Los resultados se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de *S. pneumoniae*, determinadas por el método la doble dilución en agar.

CEPA	ANTIBIÓTICO / MIC (µg/ml)							
	PEN	TET	CHL	CIP	LEV	GAT	MOX	GEM
R6	0.03	0.13	1	0.5	1	0.25	0.12	0.03
841	1	64	8	64	64	8	8	0.5
850	1	64	16	64	64	8	4	0.5
1643	2	64	2	32	16	4	2	0.25
2205	1	0.25	2	4	2	0.5	0.25	0.03
2375	2	32	16	8	4	1	0.25	0.06
2459	0.5	64	2	64	16	4	2	0.12
3073	0.25	0.5	4	8	2	1	0.25	0.03
4371	2	0.25	2	64	32	8	4	0.5
5558	0.5	0.25	2	32	16	4	4	0.5

MIC, concentración mínima inhibitoria. PEN, penicilina; TET, tetraciclina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; GAT, gatifloxacina; MOX, moxifloxacina; GEM, gemifloxacina.

El NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) establece para cada microorganismo unos criterios de sensibilidad frente a distintos antibióticos [69;85]. Los puntos de corte determinados por el NCCLS para *S. pneumoniae* y tomados como referencia se muestran en la tabla 4.2.

Los valores de corte para la ciprofloxacina no están disponibles, de modo que se tomó el valor de MIC \geq 4 como referencia, a partir del cual la cepa puede considerarse resistente, tal y como lo han considerado distintos autores [38;86]. Por otro lado, únicamente se pudo tener acceso al límite inferior de corte (rango de sensibilidad) para la gemifloxacina.

Tabla 4.2. Puntos de corte establecidos por el NCCLS para *S. pneumoniae*.

ANTIBIÓTICO	Puntos de corte (µg/ml)		
	S	I	R
Penicilina	≤0.06	0.12-1	≥8
Tetraciclina	≤2	4	≥8
Cloranfenicol	≤4	-	≥8
Gemifloxacina	≤0.12	ND	ND
Levofloxacina	≤2	4	≥8
Gatifloxacina	≤1	2	≥4
Moxifloxacina	≤1	2	≥4

S, cepa sensible; I, cepa con resistencia intermedia; R, cepa resistente. ND, valores no disponibles.

Estos valores permitieron clasificar las cepas de neumococo en sensibles (S), de resistencia intermedia (I) o resistentes (R), tal y como se muestra en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Patrón de resistencia de las cepas de *S. pneumoniae* frente a los distintos antibióticos ensayados.

CEPA	ANTIBIÓTICO							
	PEN	TET	CHL	CIP	LEV	GAT	MOX	GEM
R6	S	S	S	S	S	S	S	S
841	I	R	R	R	R	R	R	ND
850	I	R	R	R	R	R	R	ND
1643	R	R	S	R	R	R	I	ND
2205	I	S	S	R	S	S	S	S
2375	R	R	R	R	I	S	S	S
2459	I	R	S	R	R	R	I	S
3073	I	S	S	R	S	S	S	S
4371	R	S	S	R	R	R	R	ND
5558	I	S	S	R	R	R	R	ND

PEN, penicilina; TET, tetraciclina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; GAT, gatifloxacina; MOX, moxifloxacina; GEM, gemifloxacina. S, cepa sensible; I, cepa con resistencia intermedia; R, cepa resistente. ND, criterio de clasificación no disponible.

La cepa de *S. pneumoniae* R6 es una cepa de laboratorio que no ha estado sometida a una presión selectiva de los antibióticos y que, por tanto, presenta un patrón de sensibilidad

destacado. Es por ello que se tomó como referencia en todos los ensayos realizados en este trabajo. En este ensayo en concreto, los valores de las MICs en R6 permitieron confirmar su sensibilidad a los distintos antibióticos además de servir como control en la determinación de las MICs de las otras cepas.

El patrón de sensibilidad de los aislados clínicos fue claramente distinto al que presentó R6. En primer lugar, la sensibilidad frente a penicilina de las cepas clínicas de *S. pneumoniae* estudiadas fue reducida, especialmente en las cepas 1643, 2375 y 4371. Las cepas 841, 850 y 2205 mostraron sensibilidad intermedia, aunque presentaron un valor de MIC de 1.0 µg/ml, muy próximo a considerarse resistente. El resto de cepas también presentaron resistencia intermedia, de manera que ninguna de las cepas fue completamente sensible a la penicilina. Como se ha comentado con anterioridad, el principal mecanismo de resistencia a la penicilina en *S. pneumoniae* es la producción de proteínas de unión a la penicilina alteradas, que pueden dar lugar a resistencias cruzadas.

Cinco de las nueve cepas clínicas estudiadas fueron resistentes a la tetraciclina. La tetraciclina es un agente bacteriostático que inhibe la síntesis proteica inhibiendo el enlace del aminoacil tRNA a la subunidad ribosomal 30S de la bacteria. Los valores de las MICs más elevados y claramente diferenciados del resto fueron los correspondientes a las cepas 841, 850, 2375 y 2459. El resto de cepas se mostraron sensibles frente a este antibiótico. En general, la resistencia a tetraciclina se atribuye a una permeabilidad reducida o a la inactivación del antibiótico en el interior celular.

El cloranfenicol es otro antibiótico que actúa a nivel ribosomal, interfiriendo en la acción de la peptidiltransferasa y bloqueando, por lo tanto, la unión de los aminoácidos a la cadena peptídica presente en la subunidad 50S. Únicamente tres de las cepas estudiadas presentaron resistencia elevada al cloranfenicol, 841, 850 y 2375, también resistentes a tetraciclina. La resistencia frente a este antibacteriano se debe a la inactivación del mismo por parte de una enzima acetiltransferasa.

La actividad de las fluoroquinolonas ensayadas fue variable entre las distintas cepas. Todas ellas fueron resistentes a ciprofloxacina (fluoroquinolona de segunda generación) y presentaron menor resistencia a las fluoroquinolonas de tercera generación levofloxacina,

gatifloxacina y moxifloxacina, posteriores a la ciprofloxacina y con mayor actividad frente a la mayoría de patógenos respiratorios. Esta clase de antibióticos actúa inhibiendo la síntesis del DNA debido al bloqueo de la enzima DNA girasa y/o la topoisomerasa IV. Como consecuencia de este bloqueo se induce la respuesta SOS y se provocan otros efectos pleiotrópicos como la filamentación, que conducen a la bacteria a la muerte celular. Cabe destacar la elevada resistencia a ciprofloxacina y levofloxacina de las cepas 841, 850, 1643, 2459, 4371 y 5558, con valores de $MIC \geq 16 \mu\text{g/ml}$. Estas cepas fueron las que presentaron también mayor resistencia a gatifloxacina y moxifloxacina, y, en general, al resto de antibióticos.

4.2. TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS ENTRE ESPECIES DEL GÉNERO *Streptococcus*

Planteamiento experimental

Tal y como se ha expuesto con anterioridad, un tratamiento efectivo de las infecciones neumocócicas hasta hace unos años se basaba en el uso de antibióticos β -lactámicos, pero con la aparición de resistencias, su utilización está en estos momentos cada vez más restringida. Sin embargo, el uso extensivo de las fluoroquinolonas como alternativa a los β -lactámicos ha dado lugar también a la aparición de resistencias bacterianas a estos antibióticos. En investigaciones recientes se apuntaba como origen de esta resistencia en *S. pneumoniae* la adquisición de genes alterados de las dianas de las quinolonas. Los resultados de dichas investigaciones afirman la posibilidad de intercambio de dichos genes entre *S. pneumoniae* y otras especies de estreptococos orales y demuestran que la resistencia a quinolonas en *S. pneumoniae* puede ser transferida horizontalmente por otros estreptococos, pertenecientes al grupo *viridans* [74;80]. Los estreptococos del grupo *viridans* constituyen un grupo heterogéneo de estreptococos típicamente α -hemolíticos. La mayoría son comensales de la boca y del tracto respiratorio superior y tienen un nivel bajo de patogenicidad. Muchas especies de este grupo son difíciles de diferenciar por rasgos fenotípicos, siendo las más importantes a nivel clínico *S. sanguis*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. salivarius* y *S. anginosus*.

El objetivo que nos planteamos a continuación fue el de determinar las concentraciones mínimas inhibitorias de los estreptococos del grupo *viridans* incluidos en este trabajo (apartado 3.4.2) y seleccionar aquellos que presentaran un nivel de resistencia a ciprofloxacina más elevado. Con las cepas seleccionadas se quiso poner de manifiesto, mediante transformación genética, la posible transferencia horizontal de genes de resistencia de estos estreptococos a *S. pneumoniae*.

Resultados y Discusión

Se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, ciprofloxacina y levofloxacina de las cepas de *Streptococcus* del grupo *viridans*, según el método de la doble dilución en agar. Los resultados se muestran en la tabla 4.4.

Tabla 4.4. Concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas de *Streptococcus* del grupo *viridans*, determinadas por el método de la doble dilución en agar.

CEPA	ANTIBIÓTICO / MIC (µg/ml)				
	PEN	TET	CHL	CIP	LEV
CECT 804	0.03	0.13	2	0.25	1
237	4	0.13	4	8	4
181731-1	8	16	8	32	16
181731-2	1	1	2	32	16
181731-3	0.25	2	2	64	16
121	0.03	2	4	64	1

PEN, penicilina; TET, tetraciclina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina.

Como puede observarse, todas las cepas presentaron resistencia a ciprofloxacina elevada, en especial las cepas 181731-1, 181731-2, 181731-3 y 121, siendo las cepas 181731-3 y 121 las de un nivel de resistencia superior (MIC = 64 µg/ml). En este caso, la cepa procedente de la CECT 804 se tomó como cepa de referencia, dado que presentaba un patrón de sensibilidad frente a todos los antibióticos estudiados.

Se realizaron experimentos de transformación con DNA procedente de las cepas más resistentes del grupo *viridans* (181731-3 y 121). Para ello se realizaron extracciones de DNA cromosómico de estas cepas, que fueron posteriormente utilizados en experimentos de transformación con la cepa salvaje de *S. pneumoniae* R6, sensible a ciprofloxacina. En estos experimentos se obtuvieron transformantes de R6 de elevado nivel de resistencia, seleccionando para una concentración de ciprofloxacina de 8 µg/ml. Las concentraciones mínimas inhibitorias de los transformantes obtenidos fueron de 32 µg/ml en ambos casos. Estos experimentos realizados corroboran resultados ya publicados [80;87], en los que se apunta la posibilidad de transferencia de genes de resistencia a las fluoroquinolonas en *S. pneumoniae* por parte de estreptococos del grupo *viridans*, que podrían servir como reservorio y fuente de diseminación de genes de resistencia a las fluoroquinolonas.

Una vez determinada la posible transferencia horizontal de genes de resistencia a ciprofloxacina por parte de cepas de estreptococos del grupo *viridans* a *S. pneumoniae*, se procedió al estudio de los mecanismos de resistencia a fluoroquinolonas en las cepas clínicas de *S. pneumoniae*.

4.3. DETERMINACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LOS GENES DIANA DE LAS FLUOROQUINOLONAS

Planteamiento experimental

El estudio de sensibilidad microbiana de las cepas clínicas de *S. pneumoniae* a los distintos antibióticos, realizado en el apartado 4.1, permitió observar un nivel elevado de resistencia a las fluoroquinolonas, factor preocupante, teniendo en cuenta que representan la actual alternativa terapéutica a la utilización de los antibióticos β-lactámicos.

Por tanto, el siguiente objetivo planteado fue profundizar en el estudio de los mecanismos de resistencia de las cepas de neumococo a las fluoroquinolonas. La ciprofloxacina fue el antibiótico elegido en este estudio, por ser la fluoroquinolona más utilizada desde 1987 y la que ha ejercido una mayor presión de selección en *S. pneumoniae*

[86]. Por otra parte, este antibiótico proporciona un marcador valioso de evaluación de la actual y potencial emergencia de la resistencia a fluoroquinolonas en esta especie.

El principal mecanismo de resistencia de *S. pneumoniae* a las fluoroquinolonas se debe a mutaciones en las principales dianas de acción de estos antibióticos: DNA girasa y topoisomerasa IV. La DNA girasa es un complejo tetramérico constituido por las subunidades GyrA y Gyr B, que cataliza el superenrollamiento negativo (dependiente de ATP) del DNA y está involucrado en la replicación del DNA, la recombinación y la transcripción. La topoisomerasa IV es un complejo también tetramérico constituido por las subunidades ParC y ParE, homólogas a GyrA y GyrB, respectivamente [37;87]. Según estudios genéticos, las mutaciones que dan lugar a la resistencia a las fluoroquinolonas se han identificado mayoritariamente en una región discreta de los genes *parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB*, denominada región determinante de la resistencia a quinolonas o QRDR (*Quinolone Resistance Determining Region*) [37]. En general, niveles bajos de resistencia son debidos a mutaciones en la topoisomerasa IV, concretamente en *parC*, considerada diana principal de las quinolonas en *S. pneumoniae* [58;84;88]. Por otro lado, niveles de resistencia más elevados implican mutaciones también en *gyrA*, segunda diana de acción de las quinolonas. Así pues, las alteraciones de una única diana generalmente dan lugar a niveles bajos de resistencia, mientras que se obtienen altos niveles de resistencia sólo cuando ambas dianas presentan mutaciones (DNA girasa y topoisomerasa IV).

El objetivo planteado fue el análisis de la secuencia de la región QRDR de las cepas resistentes de *S. pneumoniae* para determinar si la resistencia a ciprofloxacina era debida a algún tipo de mutación en los genes diana de las fluoroquinolonas. Para ello se llevó a cabo un estudio comparativo entre las regiones QRDR de las cepas de neumococo resistentes a ciprofloxacina y las correspondientes a la cepa sensible de referencia R6.

Resultados y Discusión

Se realizaron extracciones de DNA de todas las cepas de neumococo y se amplificaron por PCR aquellas regiones que contenían las QRDR de los cuatro genes diana de las fluoroquinolonas. La posición de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* en el genoma

bacteriano de la cepa R6, así como su tamaño y el número de aminoácidos de las proteínas correspondientes, se muestran en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Posición de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* en el genoma de R6 y tamaño correspondiente del gen y la proteína.

Gen	Posición en el genoma de R6		Tamaño del gen (pb)	N° de residuos (aa)
	Inicio	Fin		
<i>gyr A</i>	1095463	1097931	2469	822
<i>gyr B</i>	715818	717764	1947	648
<i>par C</i>	752250	754721	2472	826
<i>par E</i>	749887	751830	1944	647

Los *primers* utilizados en la amplificación por PCR de las regiones que contienen la QRDR de los distintos genes se muestran en el apartado de material y métodos 3.9. En la tabla 4.6 se detallan la posición del amplificado y el tamaño correspondiente. Como puede observarse, las regiones amplificadas corresponden a secciones de aproximadamente 350 pb.

Tabla 4.6. Posición de la región amplificada que contiene la QRDR de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE* y tamaño correspondiente.

Gen amplificado	Nombre del oligonucleótido	Región amplificada	Tamaño (pb)
<i>gyrA</i>	GyrA-D	129-510	382
	GyrA-R		
<i>gyrB</i>	GyrB-D	1188-1521	334
	GyrB-R		
<i>parC</i>	ParC-D	104-469	366
	ParC-R		
<i>parE</i>	ParE-D	2511-2867	357
	ParE-R		

Una vez recuperados y purificados los productos amplificados por PCR, se determinaron las secuencias de DNA, y se dedujeron las secuencias de aminoácidos correspondientes de los fragmentos de los genes amplificados que incluían las QRDRs de los genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* y *parE*. En las figuras 4.2, 4.3 y 4.4 se muestran los resultados

SPN R6	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAG	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	447
SPN 841	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAG	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 850	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAG	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 1643	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAG	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 2205	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAG	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 2375	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAT	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 2459	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAT	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 3073	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAT	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 4371	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAT	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN 5558	GAAATTGCAGGCTACCTTCTTCAGGATATCGAGAAA	AAT	ACAGTTCCTTTTGCATGGAACTTTGACGATACGGAG	
SPN R6	E I A G Y L L Q D I E K	K	T V P F A W N F D D T E	149
			N (2375, 2459, 3073, 4371, 5558)	
SPN R6	AAAGAACCAACG			459
SPN 841	AAAGAACCAACG			
SPN 850	AAAGAACCAACG			
SPN 1643	AAAGAACCAACG			
SPN 2205	AAAGAACCAACG			
SPN 2375	AAAGAACCAACG			
SPN 2459	AAAGAACCAACG			
SPN 3073	AAAGAACCAACG			
SPN 4371	AAAGAACCAACG			
SPN 5558	AAAGAACCAACG			
SPN R6	K E P T			153

Fig. 4.2. Secuencia de nucleótidos de la región QRDR del gen *parC* de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas. En negrita están señalados los aminoácidos correspondientes y destacados los cambios de nucleótidos que conllevaron un cambio de aminoácido.

ParE

SPN R6	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	1189
SPN 841	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 850	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 1643	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 2205	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 2375	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 2459	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 3073	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 4371	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN 5558	GATAAGGGCTTGTGTCTGGGAAATTGACCCAGCCCAATCTAAGAATCCTGCTAAGAATGAACTCTAT	
SPN R6	D K G L L S G K L T P A Q S K N P A K N E L Y	430

SPN R6	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	1359
SPN 841	CTAGTTGAGGGG AAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 850	CTAGTTGAGGGG AAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 1643	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 2205	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 2375	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 2459	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 3073	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 4371	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN 5558	CTAGTTGAGGGG GAC TCTGCCGGTGGTCTGCCAAACAAGGTCGTGACCGCAAGTCCAGGCTATTCTAC	
SPN R6	L V E G D S A G G S A K Q G R D R K F Q A I L	453
	N (841, 850)	
SPN R6	CTCTTCGTGGTAAGGTT ATC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	1429
SPN 841	CTCTTCGTGGTAAGGTT ATC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 850	CTCTTCGTGGTAAGGTT ATC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 1643	CTCTTCGTGGTAAGGTT ATC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 2205	CTCTTCGTGGTAAGGTT GTC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 2375	CTCTTCGTGGTAAGGTT GTC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 2459	CTCTTCGTGGTAAGGTT GTC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 3073	CTCTTCGTGGTAAGGTT GTC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 4371	CTCTTCGTGGTAAGGTT GTC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN 5558	CTCTTCGTGGTAAGGTT GTC AATACAGCCAAGGCCAAGATGGCGGATATCCTCAAAAATGAAGAGATCAA	
SPN R6	P L R G K V I N T A K A K M A D I L K N E E I	476
	V (2205, 2375, 2459, 3073, 4371, 5558)	

Fig. 4.3. Secuencia de nucleótidos de la región QRDR del gen *parE* de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas. En negrita están señalados los aminoácidos correspondientes y destacados los cambios de nucleótidos que conllevaron un cambio de aminoácido.

GyrA

SPN R6	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	248
SPN 841	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	
SPN 850	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	
SPN 1643	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	
SPN 2205	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	
SPN 2375	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	
SPN 2459	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TTC TCTATT	
SPN 3073	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAC CACCCACACGGGGAT TCC TCTATT	
SPN 4371	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAT CACCCACACGGGGAT TTC TCTATT	
SPN 5558	AAACCCCATAAAAAATCTGCTCGTATTACAGGGGATGTCATGGGTAAA TAT CACCCACACGGGGAT TTC TCTATT	
SPN R6	K P H K K S A R I T G D V M G K Y H P H G D S S I	83
	(4371, 5558, 2459) F	

SPN R6	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	323
SPN 841	TATAAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 850	TATAAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 1643	TATAAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 2205	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 2375	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 2459	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 3073	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 4371	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN 5558	TATGAA	GCCATGGTCCGTATGGCTCAATGGTGGAGCTACCGTTACATGCTTGTAGATGGTCATGGGAATTTTGGT	
SPN R6	Y E A M V R M A Q W W S Y R Y M L V D G H G N F G		108
	A (841, 850, 1643)		
SPN R6	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG	395	
SPN 841	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 850	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 1643	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 2205	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 2375	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 2459	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 3073	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 4371	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN 5558	TCCATGGATGGAGATAGTGTGCCGCTCAACGTTATACCGAGGCACGTATGAGCAAGATTGCTCTGGAAATG		
SPN R6	S M D G D S A A A Q R Y T E A R M S K I A L E M		132
SPN R6	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG	464	
SPN 841	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 850	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 1643	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 2205	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 2375	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 2459	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 3073	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 4371	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN 5558	CTTCGTGATATCAACAAAAATACAGTTGATTTTCGTTGATAACTATGATGCCAATGAACGGGAACCCCTTG		
SPN R6	L R D I N K N T V D F V D N Y D A N E R E P L		155

Fig. 4.4. Secuencia de nucleótidos de la región QRDR del gen *gyrA* de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas. En negrita están señalados los aminoácidos correspondientes y destacados los cambios de nucleótidos que conllevaron un cambio de aminoácido y una mutación silenciosa.

Tras la comparación de las secuencias obtenidas de las distintas cepas de *S. pneumoniae* con la cepa de referencia R6, se realizó una tabla resumen de las mutaciones

detectadas en los genes *gyrA*, *parC* y *parE* junto con los valores de concentraciones mínimas inhibitorias de ciprofloxacina (tabla 4.7).

Tabla 4.7. Mutaciones detectadas en los genes *gyrA*, *parC* y *parE* y valores de MIC de ciprofloxacina de las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas.

CEPA	Mutaciones detectadas en la QRDR			MIC-CIP (µg/ml)
	<i>parC</i>	<i>parE</i>	<i>gyrA</i>	
R6	Ninguna	Ninguna	Ninguna	0.5
841	S-79-F	D-435-N	E-85-K	64
850	S-79-F	D-435-N	E-85-K	64
1643	S-79-F	Ninguna	E-85-K	32
2205	S-79-F	<u>I-460-V</u>	Ninguna	4
2375	<u>K-137-N</u>	<u>I-460-V</u>	Ninguna	8
2459	S-79-F, <u>K-137-N</u>	<u>I-460-V</u>	S-81-F	64
3073	<u>K-137-N</u>	<u>I-460-V</u>	Ninguna	8
4371	S-79-Y, <u>K-137-N</u>	<u>I-460-V</u>	S-81-F, Y-75	64
5558	S-79-Y, <u>K-137-N</u>	<u>I-460-V</u>	S-81-F, Y-75	32

Aminoácidos: D, ácido aspártico; E, ácido glutámico; F, fenilalanina; I, isoleucina; K, lisina; N, asparagina; S, serina; V, valina; Y, tirosina. Las mutaciones subrayadas corresponden a polimorfismos. Y-75 indica una mutación silenciosa (cambio TAC por TAT). QRDR, *Quinolone Resistance Determining Region*. MIC, concentración mínima inhibitoria. CIP, ciprofloxacina.

Las secuencias obtenidas para las distintas cepas se compararon y fueron coincidentes con las determinadas por la Unidad de Genética Bacteriana del Instituto de Salud Carlos III de Majadahonda (Madrid).

Las mutaciones subrayadas en la tabla 4.7 (K-137-N e I-460-V) no afectan a la resistencia a ciprofloxacina, ya que son polimorfismos encontrados tanto en cepas sensibles como en cepas resistentes [38;59;88]. Por otra parte, el aminoácido tirosina en la posición 75 de la región QRDR del gen *gyrA* presenta una mutación silenciosa (cambio TAC por TAT). Ninguna de las cepas estudiadas presentó mutaciones en el fragmento amplificado *gyrB*.

Como puede observarse, las cepas con elevada resistencia a ciprofloxacina, con un valor de concentración mínima inhibitoria superior o igual a 32 µg/ml (cepas 841, 850, 1643, 2459, 4371 y 5558), presentaron mutaciones tanto en *parC* como en *gyrA* y, en algunos casos,

mutaciones adicionales en *parE*. Este es el caso de las cepas 841 y 850, que además presentaron mutaciones idénticas entre sí. Al igual que las cepas 841 y 850, las cepas 4371 y 5558, pertenecientes ambas al grupo capsular 9V, presentaron mutaciones idénticas. En *parC*, en la posición 79, se dio una sustitución de una serina por una tirosina y en la posición 137, una sustitución de una lisina por una asparagina. En *gyrA*, en la posición 81, se observó un cambio de una serina por una fenilalanina y en la posición 75, una mutación silenciosa (TAC → TAT). Finalmente, en *parE* se encontró un polimorfismo I460V (ATC → GTC).

En la cepa 2205, que presentó un valor de concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacina de 8 µg/ml, se detectaron mutaciones en *parC* y en *parE*, pero no mutaciones adicionales en *gyrA*, hecho que explicaría un nivel de resistencia menor que el de las cepas con ambas mutaciones.

Los resultados obtenidos hasta el momento corroboran estudios previos realizados en este mismo campo [58;84;88;89], en los que se muestra que los niveles bajos de resistencia a ciprofloxacina son debidos a mutaciones en *parC*, mientras que niveles de resistencia más elevados tienen lugar con la adquisición de mutaciones adicionales en *gyrA*.

Sin embargo, hay que destacar los resultados obtenidos en las cepas 2375 y 3073, que presentaron únicamente cambios K-137-N en *parC* y I-460-V en *parE*, es decir, polimorfismos genéticos no implicados en la resistencia a fluoroquinolonas. Pese a no tener ninguna mutación asociada a la resistencia a ciprofloxacina, ambas cepas presentaron un nivel de resistencia destacable (MIC=8 µg/ml). Por lo tanto, puede afirmarse que la resistencia a ciprofloxacina de estas dos cepas no es atribuible a mutaciones en las dianas principales de las fluoroquinolonas y que podría deberse a otro mecanismo de resistencia como la acción de una bomba de reflujo.

4.4. ESTIMACIÓN DE LA IMPLICACIÓN DEL REFLUJO EN LA RESISTENCIA A CIPROFLOXACINA

4.4.1. SUSCEPTIBILIDAD MICROBIANA A LOS ANTIBIÓTICOS Y A OTROS COMPUESTOS

Planteamiento experimental

Recientemente se ha descrito un segundo mecanismo de resistencia en *S. pneumoniae* como causa de niveles bajos de resistencia: las bombas de reflujo [62;63;90-92]. En principio, el reflujo puede permitir la supervivencia bacteriana en un breve periodo de tiempo que después lleva a la bacteria a una adaptación de la resistencia a fluoroquinolonas, a través de mutaciones en las dianas del antibiótico [70]. Así pues, existen dos principales mecanismos de resistencia a quinolonas mediados cromosómicamente: alteraciones en la diana de las quinolonas y disminución de la acumulación de antibiótico dentro de la bacteria debido a una sobreexpresión de los sistemas de reflujo activo.

Las proteínas de reflujo transportan compuestos estructuralmente diversos fuera de la bacteria, incluyendo antibióticos como las fluoroquinolonas y cationes tóxicos como el bromuro de etidio, previniendo su acumulación intracelular. Las actividades de muchas de estas bombas pueden ser inhibidas por diferentes sustancias como el alcaloide reserpina y el CCCP, compuestos que, desgraciadamente, no pueden utilizarse en la práctica clínica debido a su alta toxicidad.

En *S. pneumoniae* se ha descrito la presencia de una bomba de reflujo de 12 segmentos transmembranales (12-TMS) dependiente de protones, perteneciente a la MFS (*major facilitator superfamily*) y denominada PmrA [56]. La expresión de este transportador aumenta la resistencia a las fluoroquinolonas ciprofloxacina y norfloxacina, así como a bromuro de etidio y acriflavina, presumiblemente debido a su sobreexpresión [62;63;90;91].

Con el objetivo último de determinar si la resistencia a ciprofloxacina en las cepas 2375 y 3073, o parte de la resistencia a ciprofloxacina en el resto de cepas de *S. pneumoniae* estudiadas, podía atribuirse a la acción de una bomba de reflujo, se determinaron las

concentraciones mínimas inhibitorias del antibiótico en presencia y ausencia del inhibidor reserpina. Asimismo, se determinó el valor de la concentración mínima inhibitoria de distintos compuestos reconocidos como sustratos de bombas de reflujo: tetraciclina, cloranfenicol, acriflavina y bromuro de etidio, también en presencia y ausencia de reserpina.

Resultados y Discusión

Los resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias de distintos antimicrobianos en las cepas de *S. pneumoniae*, en presencia y ausencia del inhibidor metabólico reserpina, se presentan en la tabla 4.8. La concentración de reserpina utilizada en todos los casos fue de 10 µg/ml, valor muy por debajo de la MIC de este compuesto en las cepas estudiadas. Este valor es el que se utiliza generalmente en este tipo de ensayos [52;56;70;93-96].

Tabla 4.8. Concentraciones mínimas inhibitorias en presencia y ausencia de reserpina, expresadas en µg/ml y determinadas por el método de la doble dilución en agar en las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas.

CEPA	ANTIBIÓTICO / MIC (µg/ml)									
	CIP	CIP + R	EBR	EBR + R	ACR	ACR + R	TET	TET + R	CHL	CHL + R
R6	0.5	0.5	2	0.5	2	1	0.12	0.12	1	1
841	64	32	4	0.25	4	1	4	2	8	8
850	64	16	2	0.12	4	1	8	4	16	16
1643	32	16	2	0.12	16	0.5	1	0.5	2	2
2205	4	2	8	0.5	8	1	1	1	2	2
2375	8	2	16	0.5	32	1	8	2	16	8
2459	64	32	16	0.5	4	0.5	2	2	2	2
3073	8	1	16	0.5	32	1	0.25	0.06	4	2
4371	64	16	8	0.25	4	0.25	2	1	2	1
5558	32	16	8	0.25	4	0.5	2	2	2	2

CIP, ciprofloxacina; EBR, bromuro de etidio; ACR, acriflavina; TET, tetraciclina; CHL, cloranfenicol; R, reserpina (10 µg/ml).

Si se comparan los valores de MIC en presencia y en ausencia de reserpina de cada una de las sustancias por separado, puede observarse que en determinados casos el valor de la MIC en presencia de reserpina disminuye considerablemente (la cepa se hace más susceptible), indicando la posible actuación de una bomba de reflujo inhibible por reserpina [62;91].

Para poder evaluar la importancia de estas diferencias entre los valores de las MICs en presencia y en ausencia de reserpina, se calculó la diferencia entre los logaritmos en base 2 de las dos parejas de valores (con y sin reserpina) (tabla 4.9). Una diferencia de 3 indicará una diferencia de tres órdenes de dilución entre un valor y otro; del mismo modo, una diferencia de 0 indicará que los valores de las MICs del compuesto antimicrobiano, en presencia y ausencia de reserpina, son iguales. Cabe tener en cuenta que se consideró que una diferencia de 2 o superior en la resistencia a ciprofloxacina era indicativa de la presencia de un sistema de reflujo activo.

Tabla 4.9. Diferencias en los logaritmos en base 2 de las MICs a distintos productos con y sin reserpina, en las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas.

CEPA	ANTIBIÓTICO				
	CIP	EBR	ACR	TET	CHL
R6	0	2	1	0	0
841	1	4	2	1	0
850	2	4	2	1	0
1643	1	4	5	1	0
2205	1	4	3	0	0
2375	2	5	5	2	1
2459	1	5	3	0	0
3073	3	5	5	2	1
4371	2	5	4	1	1
5558	1	5	3	0	0

CIP, ciprofloxacina; EBR, bromuro de etidio; ACR, acriflavina; TET, tetraciclina; CHL, cloranfenicol.

Tomando como referencia el antibiótico de estudio, la ciprofloxacina, las diferencias más destacables se encontraron en las cepas de *S. pneumoniae* 850, 2375, 3073 y 4371. Por lo

que se refiere a las cepas 850 y 4371, cuya resistencia a ciprofloxacina es muy elevada, el descenso del valor de la MIC en presencia de reserpina fue de dos diluciones (diferencia de logaritmos igual a 2), hecho que llevó a pensar en la eventual cooperación de una bomba de reflujo en su elevada resistencia. El efecto de la reserpina observado en las cepas 841 y 850, ambas con igual serotipo capsular, fue la disminución de la resistencia a ciprofloxacina de un nivel de dilución en la cepa 841 y de dos en el caso de la cepa 850. Lo mismo sucedió con las cepas 4371 y 5558.

Por otra parte, el valor de la MIC de ciprofloxacina en presencia de reserpina en las cepas 2375 y 3073 disminuye 2 y 3 factores de dilución, respectivamente, de manera que, descartadas las mutaciones de las dianas principales de las quinolonas en estas cepas, se concluyó que la resistencia a ciprofloxacina podría ser debida a un mecanismo de reflujo. Un aumento en el reflujo normalmente se asocia a pequeños incrementos en el valor de la MIC de la fluoroquinolona, comparado con la MIC de este agente en una cepa que contenga mutaciones en las enzimas diana [62]. En el caso de las cepas 2375 y 3073, ambas son claramente resistentes a ciprofloxacina (MIC=8 µg/ml) y no presentaron mutaciones en las QRDRs de las dianas de las fluoroquinolonas asociadas a la resistencia. Por otra parte, se demuestra que la reserpina es capaz de reducir ostensiblemente la MIC de la quinolona, indicando la presencia de un posible sistema activo de reflujo.

El resto de cepas de neumococo presentaron distintos valores de concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacina y efectos menos relevantes en presencia de reserpina, lo cual hace pensar que en estas cepas las bombas de reflujo no ejercen su acción.

Por otra parte, las MICs de bromuro de etidio y acriflavina, en presencia y ausencia de reserpina, reafirman que estos compuestos son sustratos de alguna bomba de reflujo inhibible por reserpina. Es más, en el caso del bromuro de etidio, la presencia del inhibidor reserpina hace disminuir considerablemente el valor de la MIC, obteniéndose en distintos casos valores superiores a 4 en el valor de la diferencia de logaritmos (tabla 4.9). En el caso de la tetraciclina y cloranfenicol las diferencias no son destacables, a excepción de la disminución de la MIC de tetraciclina en presencia de reserpina en 2375 y 3073, sugiriendo de nuevo la acción de una bomba de reflujo en estas cepas.

4.4.2. ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO

Planteamiento experimental

Con el fin de verificar y contrastar la información que proporcionó la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias en el apartado anterior, se procedió a la aplicación de otra metodología. Concretamente, se desarrolló un ensayo basado en el estudio de L.R. Peterson *et al.* [70], para la estimación del reflujo en cepas de *S. pneumoniae*, midiendo el efecto de la reserpina en presencia de ciprofloxacina. Las concentraciones de ciprofloxacina utilizadas en este ensayo fueron cuatro veces inferiores al valor de la MIC para cada cepa.

El ensayo de inhibición del crecimiento se realizó para la cepa R6 y las cepas clínicas resistentes 2375 y 3073, que supuestamente presentaron resistencia a ciprofloxacina debido únicamente a un mecanismo de reflujo. Asimismo, se realizó este tipo de ensayo con la cepa 4371, que, pese a tener mutaciones en las dianas principales de las fluoroquinolonas, presentó un comportamiento indicativo de la contribución de una posible bomba de reflujo en la elevada resistencia a ciprofloxacina.

Resultados y Discusión

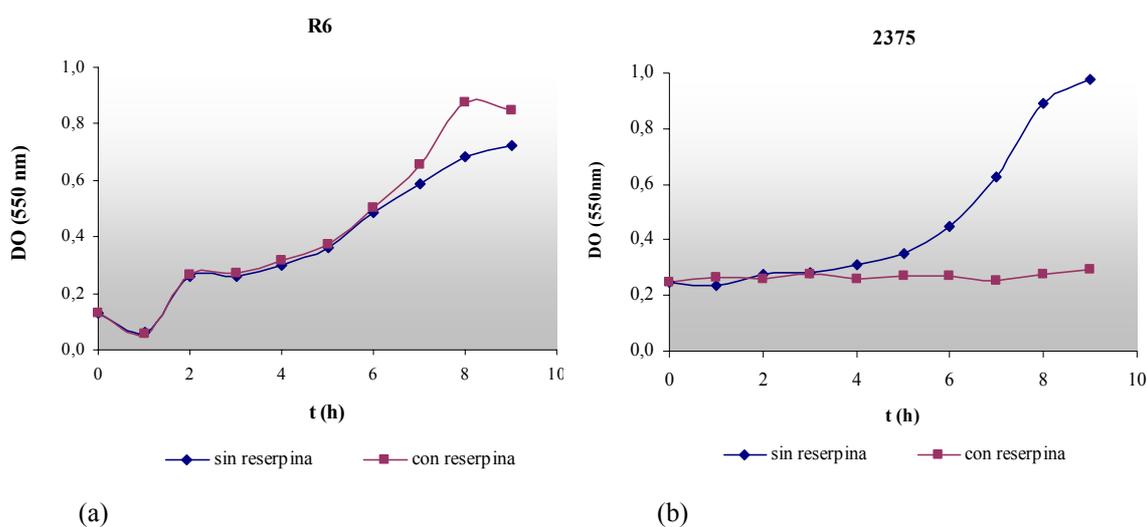
Los ensayos de inhibición del crecimiento utilizando reserpina conjuntamente con el agente antibacteriano se llevaron a cabo para detectar la actuación de un sistema de reflujo susceptible a reserpina. Los resultados obtenidos para las cepas R6, 4371, 2375 y 3073, según el método descrito, se muestran en la tabla 4.10.

Tabla 4.10. Efecto de la reserpina en el crecimiento de las cepas R6, 2375, 3073 y 4371, en presencia de ciprofloxacina a 1/4 del valor de la MIC.

t (h)	DO (550 nm)							
	R6		4371		2375		3073	
	- R	+ R	- R	+ R	- R	+ R	- R	+ R
0	0.130	0.130	0.262	0.262	0.247	0.247	0.213	0.213
1	0.064	0.059	0.262	0.262	0.237	0.266	0.221	0.220
2	0.262	0.265	0.262	0.274	0.277	0.260	0.226	0.232
3	0.262	0.273	0.270	0.270	0.280	0.273	0.266	0.226
4	0.300	0.314	0.280	0.261	0.313	0.261	0.324	0.243
5	0.360	0.371	0.348	0.267	0.350	0.270	0.329	0.257
6	0.486	0.504	0.416	0.273	0.447	0.270	0.425	0.270
7	0.588	0.654	0.561	0.267	0.624	0.255	0.501	0.275
8	0.685	0.873	0.705	0.260	0.890	0.273	0.730	0.280
9	0.722	0.850	0.825	0.256	0.976	0.292	0.890	0.285

DO, densidad óptica; R, reserpina (10 µg/ml).

En la figura 4.5 se muestran las representaciones gráficas de los valores que aparecen en la tabla 4.10.



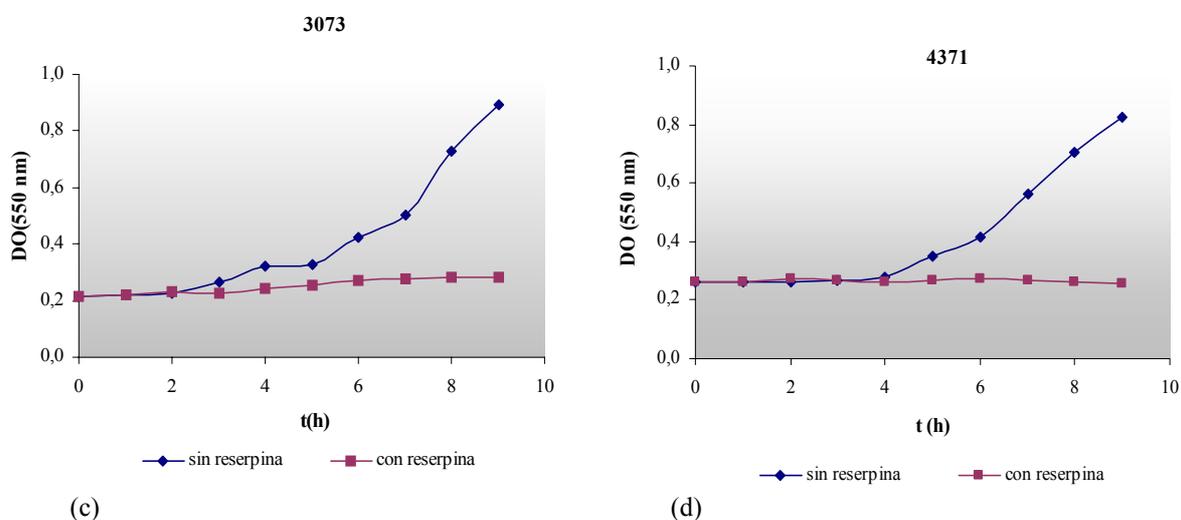


Fig 4.5. Representación de las curvas de inhibición del crecimiento de cepas de *S. pneumoniae* a una concentración de 1/4 el valor de la MIC de ciprofloxacina, en presencia y ausencia de reserpina. (a) Cepa R6. (b) Cepa 2375. (c) Cepa 3073. (d) Cepa 4371.

Como puede apreciarse en las gráficas presentadas, el comportamiento de las cepas 2375, 4371 y 3073 en presencia de reserpina fue muy parecido. El crecimiento de las cepas en presencia únicamente del antibiótico fue ligeramente más lento de lo habitual, si tenemos en cuenta sus habituales curvas de crecimiento. Sin embargo, al añadir la reserpina en los cultivos, las cepas fueron incapaces de crecer. Esto se explicaría por el efecto de la reserpina en la inhibición de la expulsión de ciprofloxacina por una bomba de reflujo y la consecuente acumulación del antibiótico en el interior celular.

La cepa R6, a diferencia de las otras tres cepas, no presentó grandes diferencias en el crecimiento a concentraciones subletales del antibiótico, en presencia y ausencia de reserpina. Esto se debe a que es una cepa sensible a ciprofloxacina, en la que no actúa ningún mecanismo de reflujo. Por lo tanto, el efecto de la reserpina tampoco fue observable.

4.4.3. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE CIPROFLOXACINA EN EL CRECIMIENTO BACTERIANO, EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE RESERPINA

Planteamiento experimental

Se desarrolló un ensayo en paralelo al ensayo descrito con anterioridad en el apartado 4.4.2, con el fin de evaluar el efecto de la concentración de ciprofloxacina, en presencia y ausencia de reserpina, en el crecimiento de las cepas de *S. pneumoniae* que presentaron resistencia debida a un mecanismo de refugio. Este ensayo se realizó también para las cepas de *S. pneumoniae* R6 y las cepas clínicas resistentes 2375, 3073 y 4371.

Resultados y Discusión

Los resultados de los ensayos realizados con las cepas R6, 2375, 3073 y 4371 se muestran en las tablas 4.11, 4.12, 4.13 y 4.14. En ellas se presentan los valores de densidad óptica a 550 nm de los cultivos incubados a distintas concentraciones de ciprofloxacina, en presencia y ausencia de reserpina (a 10 µg/ml de concentración final).

Tabla 4.11. Efecto de la concentración de ciprofloxacina en presencia y ausencia de reserpina en el crecimiento de la cepa R6.

[CIP] (µg/ml)	DO ₅₅₀ (R6)	
	Sin reserpina	Con reserpina
0.00	0.487	0.454
0.01	0.473	0.442
0.02	0.451	0.433
0.03	0.439	0.425
0.06	0.426	0.414
0.13	0.322	0.288
0.25	0.304	0.275
0.50	0.261	0.257
1.00	0.257	0.253

DO₅₅₀, densidad óptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina.

Tabla 4.12. Efecto de la concentración de ciprofloxacina en presencia y ausencia de reserpina en el crecimiento de la cepa 2375.

[CIP] ($\mu\text{g/ml}$)	DO_{550} (2375)	
	Sin reserpina	Con reserpina
0.00	0.485	0.405
0.06	0.473	0.356
0.13	0.465	0.315
0.25	0.423	0.287
0.50	0.419	0.282
1.00	0.321	0.249
2.00	0.310	0.245
4.00	0.262	0.248
8.00	0.253	0.248

DO_{550} , densidad óptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina.

Tabla 4.13. Efecto de la concentración de ciprofloxacina en presencia y ausencia de reserpina en el crecimiento de la cepa 3073.

[CIP] ($\mu\text{g/ml}$)	DO_{550} (3073)	
	Sin reserpina	Con reserpina
0.00	0.463	0.413
0.06	0.460	0.357
0.13	0.452	0.352
0.25	0.435	0.300
0.50	0.407	0.250
1.00	0.334	0.235
2.00	0.284	0.230
4.00	0.234	0.230
8.00	0.220	0.217

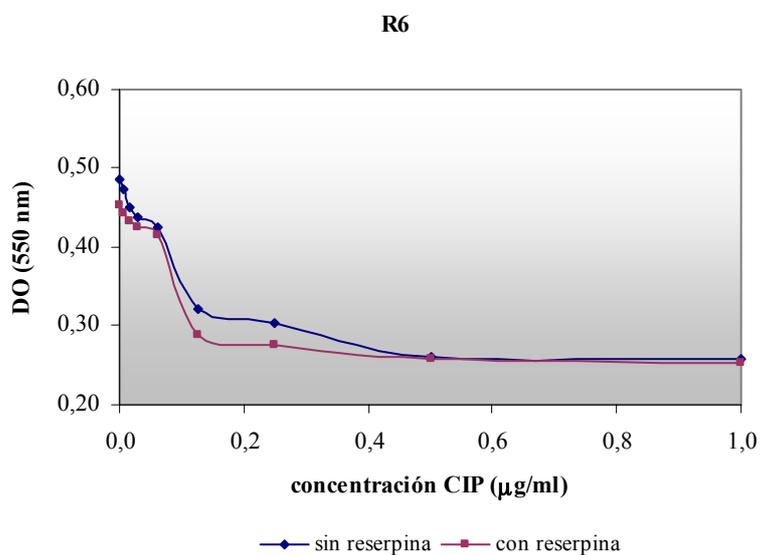
DO_{550} , densidad óptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina.

Tabla 4.14. Efecto de la concentración de ciprofloxacina en presencia y ausencia de reserpina en el crecimiento de la cepa 4371.

[CIP] ($\mu\text{g/ml}$)	DO ₅₅₀ (4371)	
	Sin reserpina	Con reserpina
0.00	0.430	0.332
0.25	0.415	0.264
0.50	0.408	0.247
1.00	0.420	0.245
2.00	0.411	0.255
4.00	0.339	0.254
8.00	0.300	0.245
1.00	0.261	0.230
32.00	0.240	0.240
64.00	0.220	0.219

DO₅₅₀, densidad óptica a 550 nm; CIP, ciprofloxacina.

Las representaciones gráficas correspondientes se muestran en las figuras 4.6, 4.7, 4.8 y 4.9, en las que pueden apreciarse los valores de densidad óptica en el crecimiento de las cepas a distintas concentraciones de ciprofloxacina, en presencia y ausencia de reserpina.

**Fig 4.6.** Representación del efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento de la cepa de *S. pneumoniae* R6, en presencia y ausencia de reserpina.

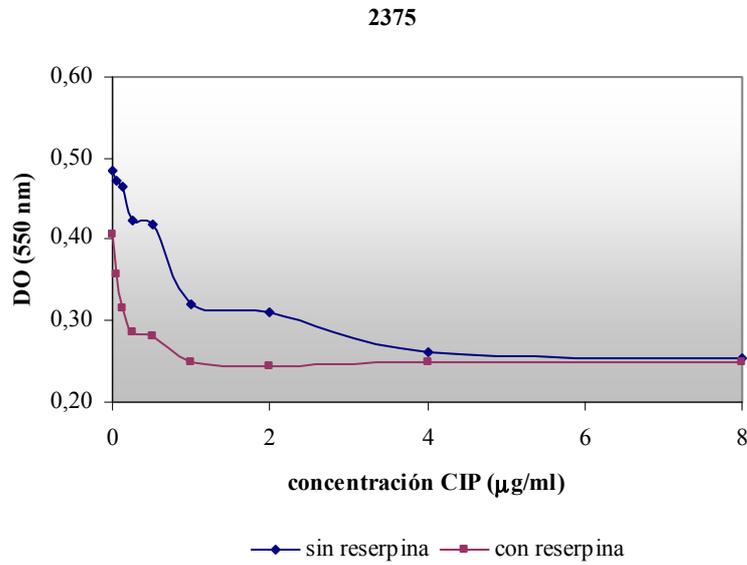


Fig 4.7. Representación del efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento de la cepa de *S. pneumoniae* 2375, en presencia y ausencia de reserpina.

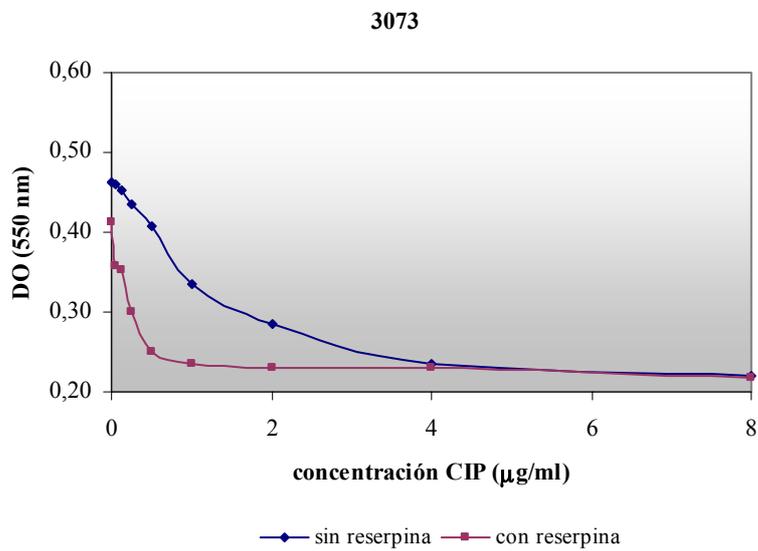


Fig 4.8. Representación del efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento de la cepa de *S. pneumoniae* 3073, en presencia y ausencia de reserpina.

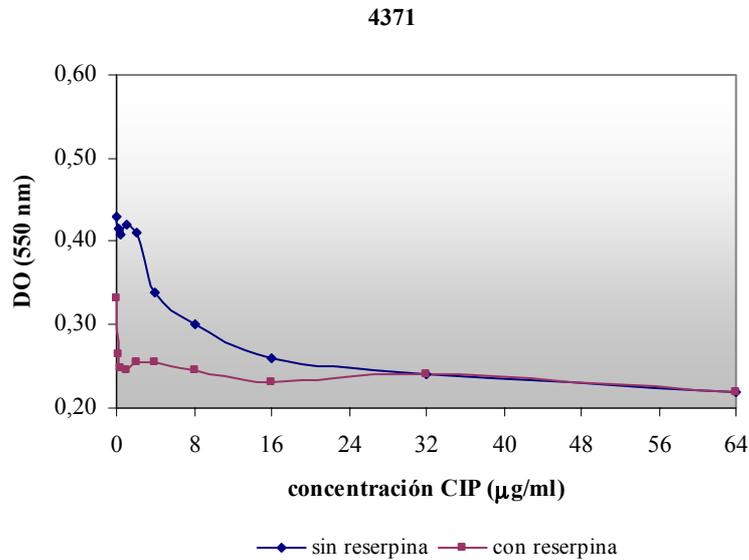


Fig 4.9. Representación del efecto de la concentración de ciprofloxacina en el crecimiento de la cepa de *S. pneumoniae* 4371, en presencia y ausencia de reserpina.

En las gráficas representadas puede observarse que los valores de densidad óptica en ausencia de reserpina son, en todos los casos, superiores a los valores en presencia del inhibidor. Aun así, el efecto conjunto de la reserpina y la ciprofloxacina en la cepa R6 no es destacable, comparado con el crecimiento de la cepa en ausencia de reserpina.

En las gráficas correspondientes a las cepas 2375, 3073 y 4371 se observa que, a concentraciones muy inferiores al valor de la MIC, cuanto menor es la concentración del antibiótico, mayor es la diferencia apreciable entre las dos condiciones estudiadas. Sin embargo, estas diferencias llegan a reducirse ligeramente a concentraciones de ciprofloxacina próximas a cero. En general, en 2375, 3073 y 4371 se observa una disminución del crecimiento en presencia de reserpina a concentraciones bajas del antibiótico, hecho que nuevamente sugiere la acción de una bomba de reflujo.

4.4.4. EXPERIMENTOS DE FLUORIMETRÍA

Planteamiento experimental

Se pretendió evaluar la contribución a la resistencia a ciprofloxacina por parte de una bomba de reflujo de manera cuantitativa, mediante la aplicación de un método fluorimétrico. Este método consistió en la determinación de la concentración de ciprofloxacina acumulada en cada cepa, según el método descrito por Mortimer y Piddock [62;71]. La concentración de fluoroquinolona acumulada se determinó tanto en presencia como en ausencia del inhibidor reserpina. El objetivo principal de este estudio fue caracterizar los mecanismos de resistencia a ciprofloxacina en las cepas de *S. pneumoniae* con elevados valores de MIC y que no presentaban mutaciones en las regiones QRDR de *parC*, *parE*, *gyrA* o *gyrB* (cepas 2375 y 3073). Eventualmente se realizaron también ensayos de acumulación de ciprofloxacina en la cepa 4371, que presentó un perfil de resistencia distinto.

Resultados y Discusión

Las lecturas de fluorescencia para cada una de las cepas estudiadas en los ensayos de fluorimetría se realizaron justo al inicio del experimento y después de 5 minutos. Previamente, sin embargo, se estuvieron llevando a cabo ensayos en los que la toma de muestras se realizaba a intervalos de tiempo muy pequeños durante un total de 20 minutos. En estos ensayos se observó que el valor máximo de acumulación del antibiótico tenía lugar a tiempos muy cortos (inferiores a los 5 minutos), de manera que se optó por realizar únicamente dos medidas, la primera en el instante inicial y la segunda, transcurridos 5 minutos desde el inicio del ensayo.

Tal y como se describe en el apartado de material y métodos 3.5.2, todos los experimentos se realizaron como mínimo en tres ocasiones independientes y por duplicado y se determinaron los valores medios de la cantidad de ciprofloxacina acumulada en cada cepa y las desviaciones estándar correspondientes.

La tabla 4.15 muestra los resultados promedio de los ensayos de fluorimetría realizados, junto con los valores de desviación estándar obtenidos.

Tabla 4.15. Valores promedio de acumulación de ciprofloxacina y su correspondiente desviación estándar, obtenidos de un mínimo de tres ensayos fluorimétricos independientes en cepas de *S. pneumoniae*.

CEPA	Promedio de CIP acumulada (ng CIP/ 10 ⁹ ufc)		Desviaciones estándar de los valores promedio de CIP acumulada	
	Sin reserpina	Con reserpina	Sin reserpina	Con reserpina
R6	131.26	123.42	15.32	17.03
2375	81.71	120.93	25.66	46.25
3073	117.55	141.78	29.59	24.42
4371	93.70	115.02	29.13	36.56

CIP, ciprofloxacina.

En la figura 4.10 están representados los valores promedio de acumulación de ciprofloxacina de cada cepa y su desviación estándar correspondiente. Como puede apreciarse, los valores de acumulación del antibiótico en presencia del inhibidor reserpina (a una concentración final de 10 µg/ml) fueron ligeramente superiores a los correspondientes en ausencia de reserpina para las cepas 2375, 3073 y 4371, en especial para la cepa 2375.

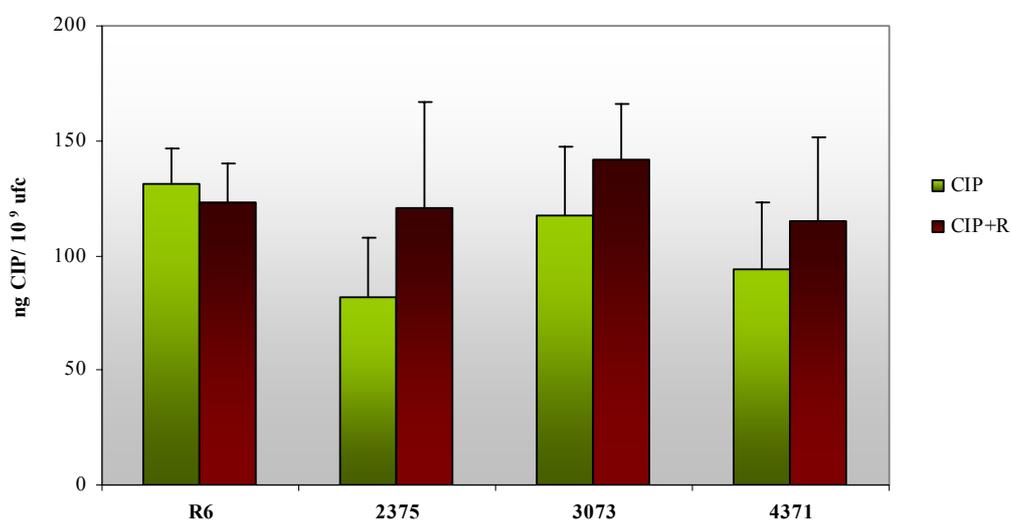


Fig. 4.10. Acumulación de ciprofloxacina en cepas de *S. pneumoniae*, en presencia y ausencia de reserpina.

De la figura 4.10 mostrada se hicieron tres análisis distintos. En primer lugar, se comparó la acumulación de ciprofloxacina entre las distintas cepas y, en especial, entre las cepas capsuladas y la cepa no capsulada R6. Las barras en verde muestran el nivel de acumulación de ciprofloxacina en cada una de las cepas. Como puede observarse, este valor es muy variable entre cepas, no encontrándose una tendencia que indique, como podría pensarse a priori, que R6 acumula claramente más antibiótico que las cepas no capsuladas. De hecho, no existen evidencias en la literatura que demuestren que la presencia de la cápsula impida o restrinja la entrada de compuestos antimicrobianos en el neumococo. Es más, algunos autores consideran que no hay ninguna relación ni interferencia entre la cápsula de *S. pneumoniae* y los antibióticos.

En segundo lugar, se evaluaron las diferencias individuales entre la acumulación de ciprofloxacina en presencia y ausencia del inhibidor reserpina, en cada una de las cepas. Según los resultados representados en la figura 4.10, existieron ligeras diferencias entre los valores de acumulación con y sin reserpina en las cepas 2375, 3073 y 4371, siendo la acumulación en presencia de reserpina un poco superior. En estos casos, la reserpina inhibiría una posible bomba de reflujo, evitando el bombeo del antibiótico hacia el exterior y aumentando con ello la concentración intracelular de ciprofloxacina. Para evaluar si las diferencias obtenidas eran significativas, se realizó un análisis estadístico con los datos experimentales. En este análisis se compararon los valores de acumulación obtenidos tras la exposición a la ciprofloxacina (CIP) y los valores de acumulación obtenidos tras la exposición conjunta a la ciprofloxacina y al inhibidor reserpina (CIP+R) en cada una de las cepas. El test estadístico utilizado fue la *t* de *Student* de datos pareados de dos colas y los resultados se generaron con el programa estadístico SAS Enterprise Guide [97]. Para ello se consideraron los valores de ciprofloxacina acumulada (expresada en ng de CIP/10⁹ ufc) en las condiciones CIP y CIP+R. La hipótesis considerada en el análisis estadístico fue que el promedio de la diferencia entre ambas condiciones fuera cero. El nivel de significación fue $P < 0.05$. Un valor inferior a 0.05 indicaría que las diferencias entre las condiciones CIP y CIP+R fueron significativas, de manera que podría estar actuando una bomba de reflujo. Para valores de *P* superiores a 0.05, las diferencias se consideraron no significativas, indicando que no hubo un efecto claro del inhibidor en la acumulación de ciprofloxacina y descartando la actuación de una bomba de reflujo. Los resultados correspondientes a este análisis se muestran en la tabla 4.16.

Tabla 4.16. Resultados del análisis estadístico *t-Student* entre las condiciones CIP y CIP+R. Los datos obtenidos para cada cepa se muestran ordenados según el valor de P obtenido.

CEPA	Acumulación (ng CIP / 10 ⁹ ufc)			N	M	D.E.	t	P
	CIP	CIP+R	Diferencia					
2375	111.07	165.27	54.20	3	39.22	25.79	2.63	0.119
	63.55	72.99	9.44					
	70.51	124.54	54.03					
3073	150.99	148.00	-2.99	3	34.50	26.92	2.22	0.157
	106.87	114.86	7.99					
	94.78	162.49	67.71					
R6	135.26	136.50	1.24	3	- 7.84	8.16	-1.66	0.238
	144.18	129.60	-14.58					
	114.34	104.16	-10.18					
4371	114.44	78.92	-35.51	4	41.37	58.83	1.41	0.254
	50.66	116.01	65.36					
	102.16	100.25	-1.91					
	107.56	164.90	57.34					

CIP, ciprofloxacina; R, reserpina; N, número de observaciones realizadas; M, media de las diferencias; D. E., desviación estándar; t, valor de la t de *Student* de datos pareados; P, valor de probabilidad.

Según los datos obtenidos, el valor de P en cada uno de los casos fue superior a 0.05. Por lo tanto, no pudo concluirse que las diferencias entre las condiciones CIP y CIP+R fueran estadísticamente significativas en ninguna de las cepas estudiadas. Cabe anotar que los valores más pequeños de P correspondieron a las cepas 2375 y 3073, aunque el valor de desviación estándar en estos casos fue considerable, indicando la variabilidad de los resultados. Las diferencias en las cepas R6 y 4371 estuvieron lejos de considerarse significativas, siendo la desviación estándar en esta última muy elevada. Por otro lado, de los datos experimentales obtenidos para las distintas cepas, únicamente se observaron valores del mismo signo en las diferencias entre las dos condiciones en la cepa 2375.

Finalmente, se evaluaron estadísticamente las diferencias de acumulación de ciprofloxacina entre las condiciones CIP y CIP+R entre las distintas cepas (unas con otras), mediante el análisis de la varianza ANOVA. A diferencia del test *t* de *Student*, aplicado para evaluar las diferencias entre dos condiciones, el análisis de la varianza de un factor o ANOVA permitió comparar las diferencias entre grupos o cepas. Los resultados se generaron con el

programa estadístico SAS Enterprise Guide [97]. No se detectaron diferencias significativas entre las cepas, siendo el valor de P de 0.469. Por lo tanto, no pudo decirse que el comportamiento de alguna de las cepas fuera claramente distinto al del resto. En resumen, los análisis estadísticos de los resultados no mostraron diferencias significativas entre las dos condiciones consideradas ni tampoco entre cepas. Así pues, no se pudo demostrar mediante este método fluorimétrico la posible acción de una bomba de reflujo en las cepas 2375 y 3073, aunque los métodos anteriormente realizados sugirieron lo contrario.

En apartados anteriores se había observado que la reserpina tenía un claro efecto en la sensibilidad de las cepas consideradas, reduciendo la MIC de ciprofloxacina en dos o tres órdenes de dilución. Estos resultados se confirmaron con los ensayos de inhibición del crecimiento, donde la reserpina también tuvo un efecto marcado. Sin embargo, la reserpina no tuvo un efecto significativo en la acumulación de ciprofloxacina en las cepas clínicas incluidas en este ensayo. Así pues, pese a observarse una ligera tendencia, los resultados no pudieron considerarse concluyentes, ya que ninguna de las cepas mostró una evidencia clara de la presencia de un mecanismo de reflujo. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores, sin que se haya dado una explicación satisfactoria a los mismos [62]. En estos estudios se muestra cómo la utilización conjunta de una fluoroquinolona y reserpina hace disminuir el valor de la MIC del antibiótico, mientras que apenas se observa un aumento en la acumulación de la fluoroquinolona, determinada fluorimétricamente. Esto podría responder a distintos motivos. En primer lugar, las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando cantidades importantes de ciprofloxacina, en ocasiones muy por encima del rango de concentraciones activo de la fluoroquinolona, ya que la cantidad más pequeña de antibiótico que puede detectarse mediante este método es aproximadamente de 100 ng (aunque dependerá de la fluoroquinolona utilizada). Por otra parte, también se requirió la utilización de un número de células muy elevado, que complicó la realización de los experimentos. Además, se observó que la cantidad de antibiótico acumulado dependió en gran medida de la fase de crecimiento de la bacteria, siendo muy difícil la reproducibilidad de los resultados. Por lo tanto, el método fluorimétrico aplicado, pese a que se ha utilizado con éxito en distintas bacterias Gram negativas [71;102], no parece ser útil en la bacteria Gram positiva *S. pneumoniae*.

4.5. INACTIVACIÓN DEL GEN *pmrA* EN *S. pneumoniae*

Planteamiento experimental

La presencia en *S. pneumoniae* del transportador PmrA aumenta la resistencia a fluoroquinolonas, especialmente a ciprofloxacina, a bromuro de etidio y a acriflavina. Este mecanismo de resistencia a ciprofloxacina en *S. pneumoniae* debido al reflujo se ha detectado en tres casos distintos: en cepas salvajes, donde contribuye a la disminución de la susceptibilidad intrínseca de este patógeno a las fluoroquinolonas; en cepas seleccionadas por resistencia a bromuro de etidio y en mutantes espontáneos de bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas, seleccionados *in vitro* [93]. Se ha detectado, además, que este mecanismo es una de las causas prevalentes de la resistencia clínica de las cepas de *S. pneumoniae* a las fluoroquinolonas. Gill, Brenwald *et al.* [56] identificaron en un porcentaje elevado de aislados clínicos una reducida sensibilidad a ciprofloxacina y norfloxacina con un fenotipo de reflujo sensible a reserpina y consistente con la sobreexpresión de PmrA. Posteriormente, sin embargo, se han realizado estudios en los que se demuestra la existencia de otra u otras bombas de reflujo en *S. pneumoniae* distintas de PmrA, sensibles también al inhibidor reserpina pero aun no caracterizadas [64;93].

En nuestro trabajo, se desarrolló la estrategia PLM con el fin de inactivar el gen *pmrA* y establecer el grado de implicación de la bomba de reflujo PmrA en la resistencia a ciprofloxacina en las cepas 2375 y 3073, carentes de mutaciones implicadas en la resistencia en las regiones QRDR de las dianas DNA girasa y topoisomerasa IV. Este método consistió, a grandes rasgos, en la incorporación, mediante recombinación homóloga, de una construcción mutagénica (constituida por dos fragmentos flanqueantes al gen *pmrA* y un cassette de resistencia a cloranfenicol) en el genoma de una cepa de *S. pneumoniae*, dando como resultado transformantes del gen *pmrA* inactivado. El proceso seguido se detalla en el apartado 3.10 de material y métodos.

Teniendo en cuenta que un aumento en el reflujo normalmente lleva a pequeños incrementos en el valor de la MIC de la fluoroquinolona, se pretendió comprobar si los elevados niveles de resistencia que presentaron estas las cepas 2375 y 3073 podían atribuirse o

no a PmrA. Por eso se hizo necesario inactivar este gen en las cepas de estudio y analizar el comportamiento fenotípico de los transformantes obtenidos con el gen deleciónado.

Resultados y Discusión

Los pasos secuenciales seguidos en la aplicación experimental del método PLM fueron los siguientes:

Inicialmente se estudió la secuencia de la región del gen diana *pmrA* y se consideraron las regiones flanqueantes del mismo (figura 4.11). La longitud de las regiones flanqueantes consideradas fue superior a 1000 nucleótidos, ya que existen evidencias de que cuanto mayor es la longitud de las regiones flanqueantes que forman parte de la construcción mutagénica final, mayor es la eficiencia de transformación [75].

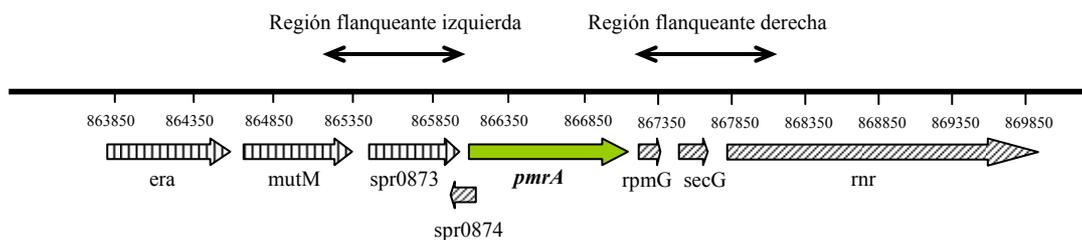


Fig. 4.11. Regiones consideradas en el contexto genómico de *S. pneumoniae* para la posterior amplificación de las regiones flanqueantes del gen *pmrA*.

El cassette escogido para la construcción final fue el cassette de resistencia *cat* del vector pR326. Este plásmido lleva dos marcadores: uno de resistencia a ampicilina y otro de resistencia a cloranfenicol [76]. Este vector no es capaz de replicarse en *S. pneumoniae*, pero el cassette que confiere resistencia a cloranfenicol (*cat*) está bajo el control de un promotor neumocócico, *amiA*, que permite su expresión en *S. pneumoniae* (figura 4.12).

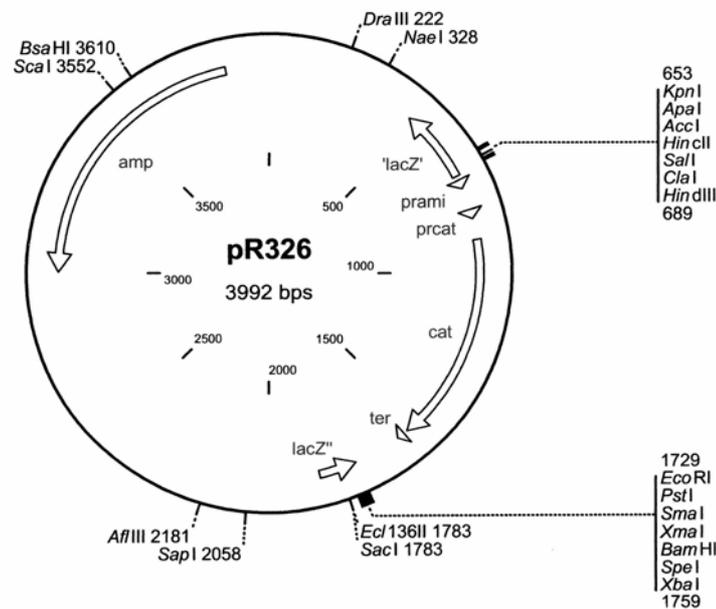


Fig. 4.12. Vector pR326 que contiene el cassette de cloranfenicol *cat*, que formará parte de la construcción final. Este cassette es capaz de expresarse en *S. pneumoniae*, gracias al promotor neumocócico *amiA*.

Se procedió a la extracción del DNA cromosómico de la cepa de *S. pneumoniae* R6, a partir del cual se llevaría a cabo la amplificación de las regiones flanqueantes del gen *pmrA*. Paralelamente, se extrajo el plásmido pR326 de la cepa de *E. coli* LE392, a partir del cual se realizaría la amplificación del cassette *cat*, contenido en el plásmido.

4.5.1. ANÁLISIS GENÓMICO PARA LA DETECCIÓN DE LUGARES DE RESTRICCIÓN POCO FRECUENTES EN *S. pneumoniae*

Una vez consideradas las dos regiones flanqueantes del gen *pmrA* y el cassette adecuado, se procedió a la amplificación de los tres fragmentos por PCR. Antes del diseño de los oligonucleótidos, se hizo un análisis de los sitios de restricción menos frecuentes en el cromosoma de *S. pneumoniae* R6, a partir de la secuencia disponible en la base de datos del GenBank (Referencia AE007317). Se utilizó el programa de análisis de restricción: http://www.genscript.com/cgi-bin/tools/enzyme_cuttingtool y se seleccionaron las dianas de restricción menos frecuentes en el genoma de R6. Los resultados de este análisis se muestran

en la tabla 4.17. Este análisis permitió asegurar que las secuencias diana de las enzimas de restricción seleccionadas no estuvieran contenidas en el gen *pmrA*. Además, la elección de dos sitios de restricción poco frecuentes permite la posibilidad de aplicar el método en la inactivación de otros genes de *S. pneumoniae*, ya que los oligonucleótidos diseñados para amplificar el cassette presente en la construcción mutagénica (en nuestro caso un cassette de resistencia a cloranfenicol, *cat*) pueden ser utilizados en otras construcciones usando las mismas dianas de restricción.

Tabla 4.17. Dianas de restricción seleccionadas en el método PLM. Frecuencia de corte y posición de los sitios de restricción en el genoma de *S. pneumoniae* R6.

Enzima	Secuencia	Frecuencia	Posición / Lugar de corte
<i>AscI</i>	5'-GG [^] CGCGCC-3'	2	35562 / 35564
			1396937 / 1396939
<i>NotI</i>	5'-GC [^] GGCCGC-3'	1	874217 / 874219

Las dianas de restricción seleccionadas fueron *AscI* y *NotI*, enzimas disponibles habitualmente en las casas comerciales.

4.5.2. AMPLIFICACIÓN DE LAS REGIONES FLANQUEANTES AL GEN Y DEL CASSETTE *cat*

Los *primers* de las regiones flanqueantes al gen diana (fragmentos I y III) y los que amplificaron el marcador de resistencia *cat* (fragmento II), contuvieron las dianas de restricción *AscI* y *NotI*, tal y como puede apreciarse en la figura 4.13.

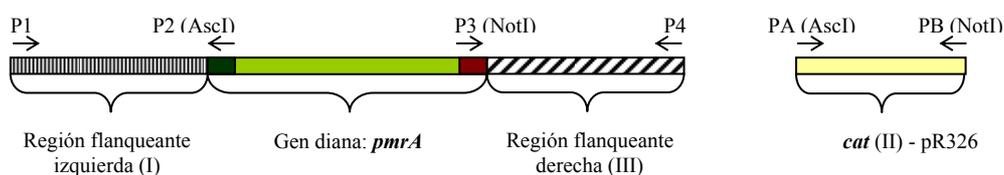


Fig. 4.13. Esquema de la localización de las regiones amplificadas por PCR, con los enzimas de restricción considerados en cada fragmento.

A partir de la secuencia de *S. pneumoniae* y la localización del gen *pmrA* (Ref. Gene ID: 933710) se determinaron las parejas de *primers* PmrA-P1/PmrA-P2 y PmrA-P3/PmrA-P4, para amplificar las regiones flanqueantes del gen *pmrA*. Asimismo, se amplificó el cassette de resistencia a cloranfenicol con los *primers* Cat-PA y Cat-PB (tabla 3.7 del apartado 3.10), a partir de la secuencia de nucleótidos del vector pR326 (figura 4.14).

```

1   GGAAATTGTA AACGTTAATA TTTTGTAA   ATTCGCGTTA AATTTTTGTT AAATCAGCTC
61  ATTTTTTAAC CAATAGGCCG AAATCGGCAA AATCCCTTAT AAATCAAAAG AATAGACCGA
121 GATAGGGTTG AGTGTTGTTC CAGTTTGGA  CAAGAGTCCA CTATTAAGA  ACCTGGACTC
181 CAACGTCAAA GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC
241 CTAATCAAGT TTTTGGGGT  CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC CTAAGGGGAG
301 CCCCCGATTT AGAGCTTGAC  GGGGAAAGCC GGCGAACGTG GCGAGAAAGG AAGGGAAAGAA
361 AGCGAAAGGA GCGGGCGCTA GGGCGCTGGC AAGTGTAGCG GTCACGCTGC GCGTAACCAC
421 CACACCCGCC GCGCTTAATG CGCCGCTACA GGGCGCGTCG CGCCATTCGC CATTGAGGCT
481 GCGCAACTGT TGGGAAGGGC GATCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA
541 AGGGGGATGT GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAAACGCC GGGTTTTCCC AGTCACGACG
601 TTGTAACACG ACGGCCAGTG AATTGTAATA CGACTCACTA TAGGGCGAAT TGGGTACCGG
661 GCCCCCCTC  GAGGTCGACG GTATCGATAA GCTTGATGAA AATTTGTTTG ATTTTAAATG
721 GATAATGTGA TATAATGGTT CAACAAACGA AAATTGGATA AAGTGGGATA TTTTAAAT
781 ATATATTTAT GTTACAGTAA TATTGACTTT TAAAAAAGGA TTGATCTAA  TGAAGAAAGC
841 AGACAAGTAA GCCTCCTAAA TTCACTTTAG ATAAAAATTT AGGAGGCATA TCAAATGAAC
901 TTTAATAAAA TTGATTTAGA CAATTGGAAG AGAAAAGAGA TATTTAATCA TTATTTGAAC
961 CAACAAACGA CTTTTAGTAT AACCACAGAA ATTGATATTA GTGTTTTATA CCGAAACATA
1021 AAACAAGAAG GATATAAATT TTACCCTGCA TTTATTTTCT TAGTGACAAG GGTGATAAAG
1081 TCAAATACAG CTTTTAGAAC TGGTTACAAT AGCGACGGAG AGTTAGGTTA TTGGGATAAG
1141 TTTAGACCAC TTTATACAAT TTTTGTGGT  GTATCTAAAA CATTCTCTG  TATTTGGACT
1201 CCTGTAAAGA ATGACTTCAA AGAGTTTTAT GATTTATACC TTTCTGATGT AGAGAAATAT
1261 AATGGTTCCG GGAAATTGTT TCCCAAAACA CCTATACCTG AAAATGCTTT TTCTTTTCT
1321 ATTATTCAT  GGACTTCATT TACTGGGTTT AACTTAAATA TCAATAATA  TAGTAATTAC
1381 ATTTACCCA  TTATTACAGC AGGAAAATTC ATTAATAAAG GTAATTCAT  ATATTTACCG
1441 CTATCTTTAC AGGTACATCA TTCTGTTTGT GATGGTTATC ATGCAGGATT GTTTATGAAC
1501 TCTATTCAGG AATGTGACAG TAGGCCTAAT GACTGGCTTT TATAATATGA GATAATGCCG
1561 ACTGTACTTT TTACAGTCGG TTTCCTAATG TCACTAACCT GCCCCGTTAG TTGAAGAAGG
1621 TTTTATATT  ACAGCTCCAG ATCCATATCC TTCTTTTCT  GAACCGACTT CACTTTTTC
1681 GCTTCTTTAT TCCAATTGCT TTATTGACGT TGAGCCTCGG AACCCATCGA ATTCCTGCAG
1741 CCGGGGGGAT CCACTAGTTC TAGAGCGGCC GCCACCGCGG TGGAGCTCCA GCTTTTGTTC
1801 CCTTTAGTGA GGGTTAATTC CGAGCTTGCC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCCTGTGTG
1861 AAATTGTTAT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATAAGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC
1921 CTGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT
1981 CCAGTCGGGA AACCTGTGCT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACGCG CGGGGAGAGG
2041 CGGTTTGCGT ATTGGGGCGT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT
2101 TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC
2161 AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA
2221 AAAGCCGCG  TTGCTGCGT  TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCAGAAAAA
2281 TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCCTTTCC
2341 CCCTGGAAGC TCCTCGTGC  GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC
2401 CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG
2461 TTCGGTGTAG GTCGTTGCT  CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCGG  TTCAGCCCGA
2521 CCGCTGCGCC TATCCCGTA  ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC
2581 GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG CCGGTGCTAC
2641 AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG CTACACTAGA AGGACAGTAT TTGGTATCTG
2701 CGCTCTGTG  AAGCCAGTTA CTTTCGAAA  AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAACA
2761 AACACCCTG  GGTAGCCGTT GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA
2821 AAATGCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGCTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA
2881 CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT
2941 AAATTAATA  TGAAGTTTAA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG
3001 TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGCTATTTC  GTTCAATCCT
3061 AGTTGCCCTGA CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC
3121 CAGTGCTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA
3181 CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAA  TGGTCTGCA  ACTTTATCCG CCTCATCA

```

```

3241 GTCTATTAAT TGTGCGCGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA
3301 CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT
3361 CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC
3421 GGTTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGCAG TGTTTACTACT
3481 CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTTCTCT TACTGTCATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC
3541 TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG
3601 CTCTTGCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT
3661 CATCATTGGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC
3721 CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG
3781 CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC
3841 ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCTT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG
3901 TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTGA ATGTATTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT
3961 TCCGCGCACA TTTCCCGGAA AAGTGCCACC TG //

```

Fig. 4.14. Secuencia del vector pR326 con el cassette de resistencia a cloranfenicol *cat*, cedida por el Dr. D.A. Morrison (*Laboratory for Molecular Biology, University of Illinois at Chicago*). En amarillo se ha señalado la localización de los *primers* Cat-PA y Cat-PB, utilizados en la amplificación del cassette *cat*.

La localización de las parejas de oligonucleótidos utilizadas en la amplificación de los fragmentos I, II y III, aparece en la tabla 4.18.

Tabla 4.18. Localización de los oligonucleótidos PmrA-P1, PmrA-P2, PmrA-P3 a PmrA-P4 en el genoma de R6 y de Cat-PA y Cat-PB en el plásmido pR326.

Región considerada	Primer	Localización
<i>pmrA</i> (1200 pb) Localización en R6: 866211-867410	PmrA-P1	865013 - 865035 (23 nt)
	PmrA-P2	866286 - 866313 (28 nt)
	PmrA-P3	867286 - 867313 (28 nt)
	PmrA-P4	868656 - 868679 (24 nt)
<i>cat</i> (651 pb) Localización en pR326: 895-1545	Cat-PA	611 - 638 (28 nt)
	Cat-PB	1583-1610 (28 nt)

4.5.3. GENERACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN MUTAGÉNICA

Tras la amplificación de los fragmentos I, II y III, se digirió cada uno de ellos con la enzima o las enzimas de restricción correspondientes (*AscI* y *NotI*). Después de la purificación de los fragmentos, se realizó una ligación independiente de los mismos, para comprobar la eficiencia de las digestiones. Tras esta verificación, se realizó la ligación conjunta de las secuencias I, II y III, tal y como se muestra en la figura 4.15.

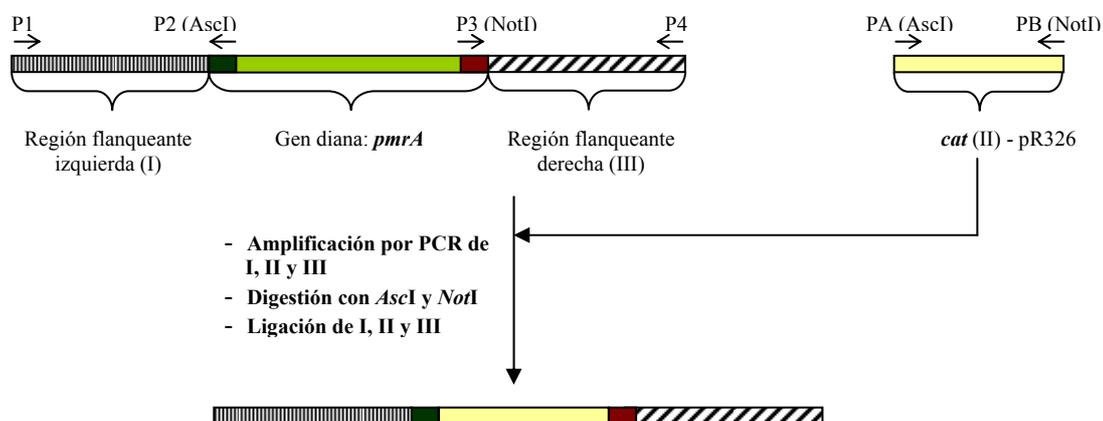


Fig. 4.15. Procedimiento seguido en la ligación de los fragmentos I, II y III.

La amplificación de los tres productos y las ligaciones realizadas que se obtuvieron se muestran en el gel de agarosa de la figura 4.16. Como puede observarse, los fragmentos I, II y III se digirieron eficientemente, como prueban los productos de las ligaciones independientes de cada uno de los fragmentos (carriles 5, 6 y 7). Por otra parte, el producto final deseado I+II+III, de 3695 pb, fue apenas visible, debido a la dificultad de este tipo de ligación trimolecular. Sin embargo, esto no resultó ser de vital importancia, ya que se necesitaron sólo pequeñas cantidades del producto de ligación para realizar los experimentos de transformación y que tuviera lugar la recombinación homóloga. Cabe anotar que no se realizó la purificación de la banda deseada de la mezcla de ligación, porque el único evento posible en el proceso de recombinación, tras la transformación y la selección de los transformantes en placas con cloranfenicol, es el esperado [75].

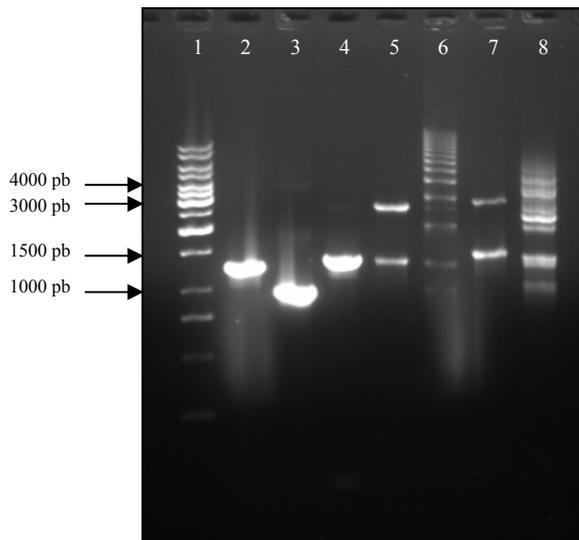


Fig. 4.16. Gel de agarosa al 1%.
 1, marcador Gene Ruler 1 Kb
 2, fragmento I (1301 pb)
 3, fragmento II (1000 pb)
 4, fragmento III (1394 pb)
 5, ligación I+I
 6, ligación II+II
 7, ligación III+III
 8, ligación I+II+III.

4.5.4. ESTRATEGIA PLM APLICADA A LA CEPA DE *S. pneumoniae* R6

Una vez comprobada su eficiencia, se purificó el producto final de la ligación y se utilizó como DNA exógeno en experimentos de transformación de la cepa R6. La figura 4.17 muestra un esquema del proceso de recombinación homóloga de la construcción mutagénica en el cromosoma de R6. El objetivo de trabajar inicialmente con R6, antes que con las cepas resistentes 2375 y 3073, fue el de validar el método desarrollado en una cepa altamente transformable.

Los transformantes de R6 obtenidos en la transformación de esta cepa en estado de competencia con DNA del producto de ligación, se seleccionaron en placas de cloranfenicol a una concentración de 2.5 µg/ml (concentración superior al valor de la MIC de R6). Tras 20 horas de crecimiento, se seleccionaron uno a uno 15 de los transformantes obtenidos y se volvieron a sembrar en placas con cloranfenicol, esta vez en agar sangre. Posteriormente, se incubaron en medio BHI y se congelaron.

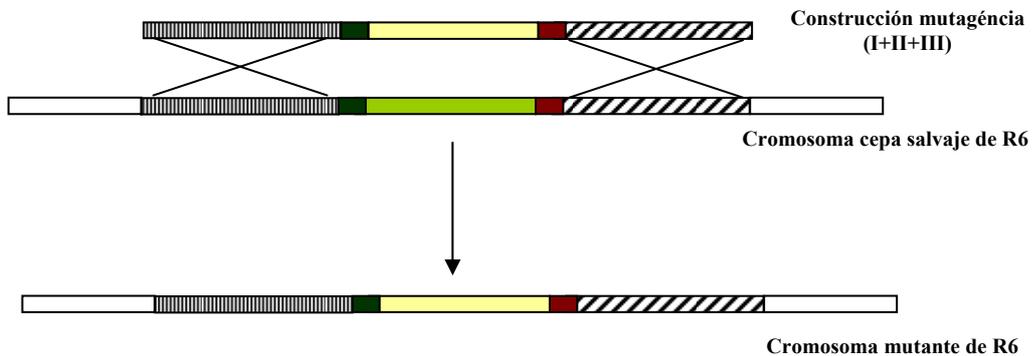


Fig. 4.17. Transformación y recombinación homóloga de la construcción mutagénica en el cromosoma de la cepa de *S. pneumoniae* R6.

En último término, se comprobaron mediante PCR cinco de los transformantes seleccionados. Para ello se utilizaron distintas combinaciones de *primers*: PmrA-P1/PmrA-P4, PmrA-P1/Cat-PB y Cat-PA/PmrA-P4. El tamaño esperado de las regiones amplificadas tras la recombinación homóloga fue el siguiente:

1. PmrA-P1/PmrA-P4: $I + II + III = 1301 + 1000 + 1394 = 3695$ pb
2. PmrA-P1/Cat-PB: $I + II = 1301 + 1000 = 2301$ pb
3. Cat-PA/PmrA-P4: $II + III = 1000 + 1394 = 2394$ pb

Se tomó como control en la PCR el DNA de la cepa R6, para la cual no se esperaba amplificación con las dos parejas de oligonucleótidos PmrA-P1/Cat-PB y Cat-PA/PmrA-P4 (que amplificarían fragmentos que contienen el cassette *cat*, no presente en R6). Por otro lado, el fragmento que cabría esperar con los *primers* PmrA-P1/PmrA-P4 en la cepa R6, es de 3895 pb ($I+pmrA+II$). Cabe destacar que las amplificaciones realizadas se hicieron inicialmente a partir de los lisados de cultivos líquidos de los transformantes y no a partir de extracciones de DNA. Sin embargo, debido a que en la PCR con los *primers* PmrA-P1/PmrA-P4 no se obtuvieron amplificadas, se optó por extraer DNA de cinco de los transformantes y repetir las amplificaciones. La figura 4.18 muestra los resultados obtenidos.

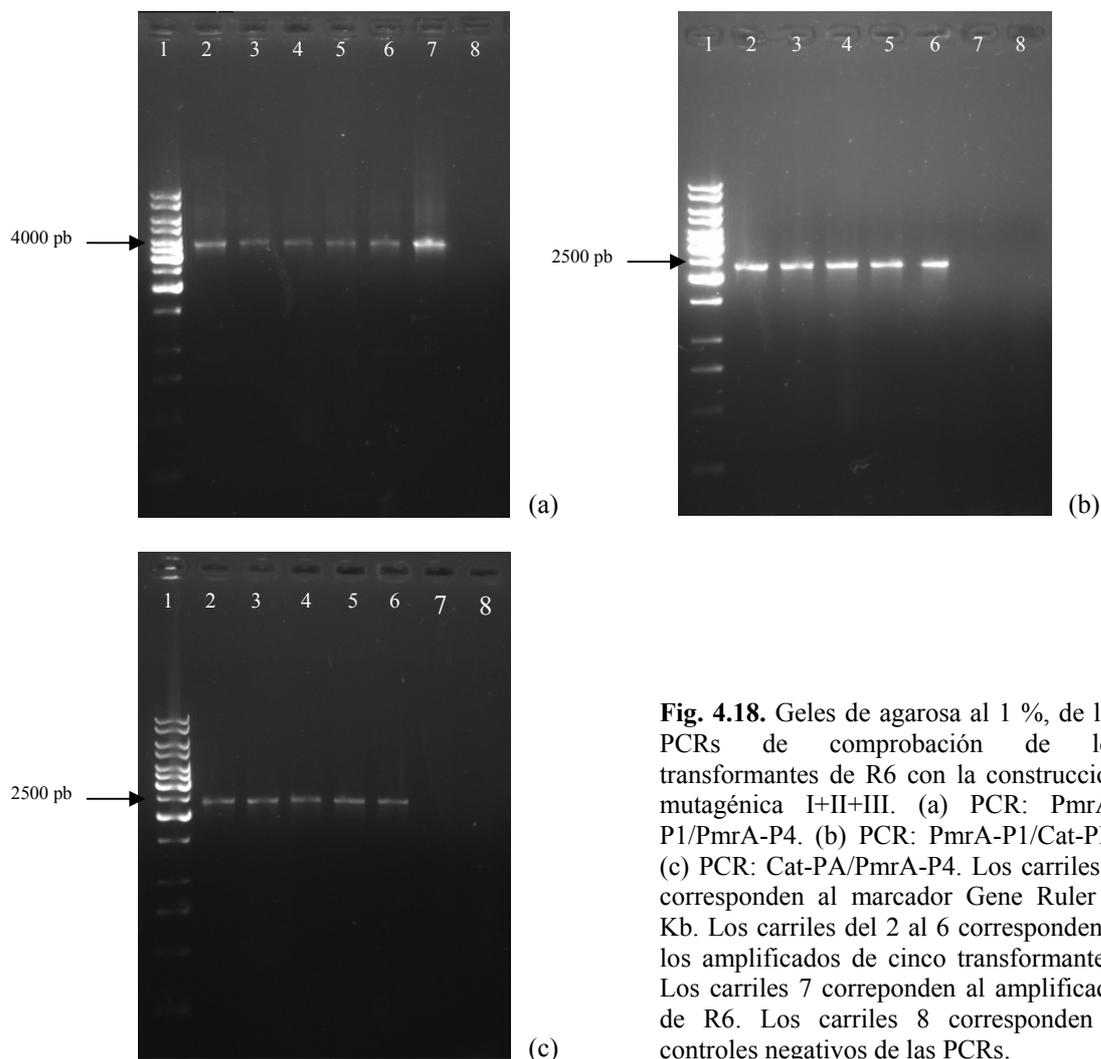


Fig. 4.18. Geles de agarosa al 1 %, de las PCRs de comprobación de los transformantes de R6 con la construcción mutagénica I+II+III. (a) PCR: PmrA-P1/PmrA-P4. (b) PCR: PmrA-P1/Cat-PB. (c) PCR: Cat-PA/PmrA-P4. Los carriles 1 corresponden al marcador Gene Ruler 1 Kb. Los carriles del 2 al 6 corresponden a los amplificados de cinco transformantes. Los carriles 7 corresponden al amplificado de R6. Los carriles 8 corresponden a controles negativos de las PCRs.

Como puede observarse en los geles de la figura 4.18, los amplificados obtenidos en cada una de las PCRs correspondientes a los transformantes y a la cepa R6, fueron del tamaño esperado. Se observa también que las PCRs con las dos parejas de oligonucleótidos PmrA-P1/Cat-PB y Cat-PA/PmrA-P4 (geles (b) y (c)) no produjeron ningún amplificado en R6 (carril 7), tal y como era de esperar.

4.5.5. TRANSFORMACIÓN DE LAS CEPAS DE *S. pneumoniae* 2375 Y 3073

Una vez comprobada la validez del método PLM con la cepa R6, se hicieron experimentos de transformación con las cepas resistentes a ciprofloxacina 2375 y 3073, para

inactivar el gen *pmrA* y estudiar el comportamiento de los transformantes seleccionados. En ambos casos, puesto que se trató de cepas capsulares, se realizaron experimentos de transformación independientes con los factores de competencia CSP1 y CSP2 [31]. Los resultados obtenidos fueron negativos, es decir, no se obtuvieron transformantes en las placas de selección con cloranfenicol para ninguna de las cepas, con ninguno de los dos factores de competencia. Las concentraciones de antibiótico consideradas fueron ligeramente superiores al valor de la MIC de cloranfenicol para las cepas 2375 y 3073.

Antes de descartar la posibilidad de transformar estas cepas con la construcción obtenida, se realizaron experimentos de transformación independientes con DNA procedente de una cepa de *S. pneumoniae* resistente a estreptomicina (cepa 6522, MIC (estreptomicina) > 300 µg/ml). Este marcador que confiere resistencia a estreptomicina es de elevada eficiencia, es decir, da lugar a un gran número de transformantes [31;34], por lo que sirvió para comprobar la eficiencia de transformación de las cepas resistentes de *S. pneumoniae*. Los experimentos de transformación correspondientes se realizaron de nuevo tanto con el factor de competencia CSP1 como el CSP2. La selección de los transformantes se hizo en placas de agar sangre con 200 µg/ml de estreptomicina, sin embargo, no se obtuvo ningún transformante. De hecho, existen trabajos en los que se indica la imposibilidad de transformar ciertas cepas capsuladas aun con la adición externa de CSP u otros factores [28;31].

4.5.6. TRANSFORMANTES DE R6 CON DNA DE LAS CEPAS 2375 Y 3073

Debido a la nula capacidad de transformación de las cepas 2375 y 3073, se decidió expresar el fenotipo de reflujo de éstas en la cepa R6, altamente transformable, y obtener transformantes de reflujo para inactivar el gen *pmrA* mediante el método PLM.

Una de las formas metodológicas para poder obtener mutantes con un fenotipo de reflujo sobreexpresado consiste en seleccionar mutantes espontáneos con bromuro de etidio, reconocido sustrato de las bombas de reflujo [90]. Así pues, asumiendo un cierto grado de paralelismo, se optó por llevar a cabo experimentos de transformación de la cepa de referencia R6 con el DNA procedente de las cepas 2375 y 3073, seleccionando con bromuro de etidio (concentraciones 4 y 8 µg/ml) y ciprofloxacina (concentraciones 1, 2 y 4 µg/ml), para que los transformantes de reflujo seleccionados, resistentes a bromuro de etidio, lo fueran también a

ciprofloxacina. En ambos casos, las concentraciones máximas de bromuro de etidio y ciprofloxacina consideradas fueron un nivel de dilución inferior a los valores de MIC de estas dos sustancias para las cepas 2375 y 3073.

En la tabla 4.19 se muestran los resultados correspondientes a los distintos experimentos de transformación realizados, seleccionando los transformantes de R6 en placas con agar C+Y conteniendo bromuro de etidio y ciprofloxacina. Como puede observarse, a las concentraciones máximas consideradas de bromuro de etidio (8 µg/ml) y de ciprofloxacina (4 µg/ml), únicamente se obtuvieron transformantes de R6 en las transformaciones realizadas con DNA de la cepa de *S. pneumoniae* 2375. Con DNA proveniente de la cepa 3073 únicamente se obtuvieron transformantes a una concentración máxima de bromuro de etidio de 4 µg/ml y de ciprofloxacina de 1 µg/ml. Por otra parte, las eficiencias de transformación observadas fueron superiores cuando el DNA donador provenía de la cepa 2375.

Tabla 4.19. Transformantes de reflujo de la cepa de *S. pneumoniae* R6, obtenidos en experimentos de transformación con DNA procedente de las cepas 2375 y 3073, seleccionando con bromuro de etidio y ciprofloxacina a distintas concentraciones.

Selección de los transformantes		DNA 2375 a R6	DNA 3073 a R6
EBR (µg/ml)	CIP (µg/ml)		
8	4	+	-
8	2	+	-
8	1	+	-
4	4	+	-
4	2	+	-
4	1	+	+

Signos: +, obtención de transformantes; -, no obtención de transformantes. EBR, bromuro de etidio; CIP, ciprofloxacina.

De los transformantes de reflujo obtenidos en cada caso, se seleccionaron y congelaron 15 de ellos. Cabe anotar que, en último término, se seleccionaron los transformantes de R6 con un fenotipo de reflujo más marcado, por ser más representativos de las características de resistencia de las cepas 2375 y 3073. Estos fueron:

- Transformantes de R6 con DNA de 2375, seleccionados a una concentración de 8 y 4 µg/ml de bromuro de etidio y ciprofloxacina, respectivamente. Nomenclatura utilizada: R6-T2375.
- Transformantes de R6 con DNA de 3073, seleccionados a una concentración de 4 y 1 µg/ml de bromuro de etidio y ciprofloxacina, respectivamente. Nomenclatura utilizada: R6-T3073.

Se determinaron las correspondientes MICs de ciprofloxacina y bromuro de etidio de los transformantes obtenidos, tal y como se muestra en la tabla 4.20.

Tabla 4.20. Concentraciones mínimas inhibitorias de ciprofloxacina y bromuro de etidio, en presencia y ausencia del inhibidor reserpina, de los transformantes de reflujo de *S. pneumoniae* R6, R6-T2375 y R6-T3073. Asimismo se incluyen las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas originales R6, 2375 y 3073.

CEPA	MICs (µg/ml)			
	CIP	CIP+R	EBR	EBR+R
R6	0.5	0.5	2	0.5
2375	8	2	16	0.5
R6-T2375	8	2	16	1
3073	8	1	16	0.5
R6-T3073	2	1	8	1

CIP, ciprofloxacina; EBR, bromuro de etidio; R, reserpina (10 µg/ml).

Como puede apreciarse, los transformantes de R6 con DNA de 2375 (R6-T2375) presentaron un nivel de resistencia igual al de la cepa 2375 (MIC=8 µg/ml). Por otra parte, el nivel de resistencia a ciprofloxacina obtenido en los transformantes de R6 con DNA de 3073 (R6-T3073) fue inferior al de la cepa 3073 (valores de MIC de 2 y 8, respectivamente). Aun así, R6 incrementó su MIC de 0.5 a 2, indicando la adquisición de un componente genético que confiere mayor resistencia a ciprofloxacina.

Realizado este análisis, se procedió a aplicar la estrategia PLM para la inactivación del gen *pmrA* en los transformantes R6-T2375 y R6-T3073.

4.5.7. ESTRATEGIA PLM APLICADA A LOS TRANSFORMANTES DE REFLUJO DE R6

Previamente a la inactivación del gen *pmrA* en R6-T2375 y R6-T3073, se hizo necesaria la determinación de las MICs de cloranfenicol correspondientes. Todos los transformantes presentaron una MIC de cloranfenicol de 2 µg/ml. Por lo tanto, la selección de los transformantes con el gen *pmrA* inactivado, se realizó a una concentración de cloranfenicol de 2.5 µg/ml. Por otra parte, para llevar a cabo las distintas transformaciones, se obtuvieron cultivos en estado de competencia de R6-T2375 y R6-T3073.

Posteriormente, se llevó a cabo el método PLM para inactivar *pmrA* en las cepas R6-T2375 y R6-T3073. El producto de ligación de los fragmentos I, II y III utilizado en los experimentos de transformación correspondientes aparece en la figura 4.19.

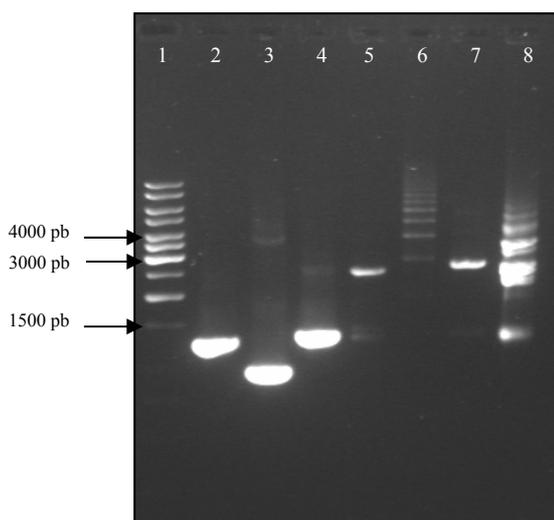


Fig. 4.19. Gel de agarosa al 1%.

- 1, marcador Gene Ruler 1 Kb
- 2, fragmento I
- 3, fragmento II
- 4, fragmento III
- 5, ligación I+I
- 6, ligación II+II
- 7, ligación III+III
- 8, ligación I+II+III.

De los transformantes obtenidos con el gen *pmrA* presumiblemente inactivado, se seleccionaron 15 de R6-T2375 (a los que se les asignó el nombre de R6-T2375-*pmrA*::*cat*) y 15 de R6-T3073 (R6-T3073-*pmrA*::*cat*). Estos transformantes se congelaron según está descrito en el apartado 2.9.4 de material y métodos.

Nuevamente, se comprobó mediante PCR la presencia de la construcción mutagénica I+II+III en cinco de los transformantes obtenidos de R6-T2375-*pmrA::cat* y de R6-T3073-*pmrA::cat*. Para ello, se utilizaron las distintas combinaciones de *primers* antes descritas: PmrA-P1/PmrA-P4, PmrA-P1/Cat-PB y Cat-PA/PmrA-P4. El tamaño de las regiones amplificadas esperado fue el siguiente:

1. PmrA-P1/PmrA-P4: $I + II + III = 1301 + 1000 + 1394 = 3695$ pb
2. PmrA-P1/Cat-PB: $I + II = 1301 + 1000 = 2301$ pb
3. Cat-PA/PmrA-P4: $II + III = 1000 + 1394 = 2394$ pb

El control considerado en cada PCR fue la cepa R6, para la cual no se esperaba amplificación con las dos parejas de *primers* PmrA-P1/Cat-PB y Cat-PA/PmrA-P4. El fragmento esperable en R6 con los *primers* PmrA-P1/PmrA-P4 fue de 3895 pb (I+*pmrA*+III). Las figuras 4.20 y 4.21 muestran los resultados obtenidos.

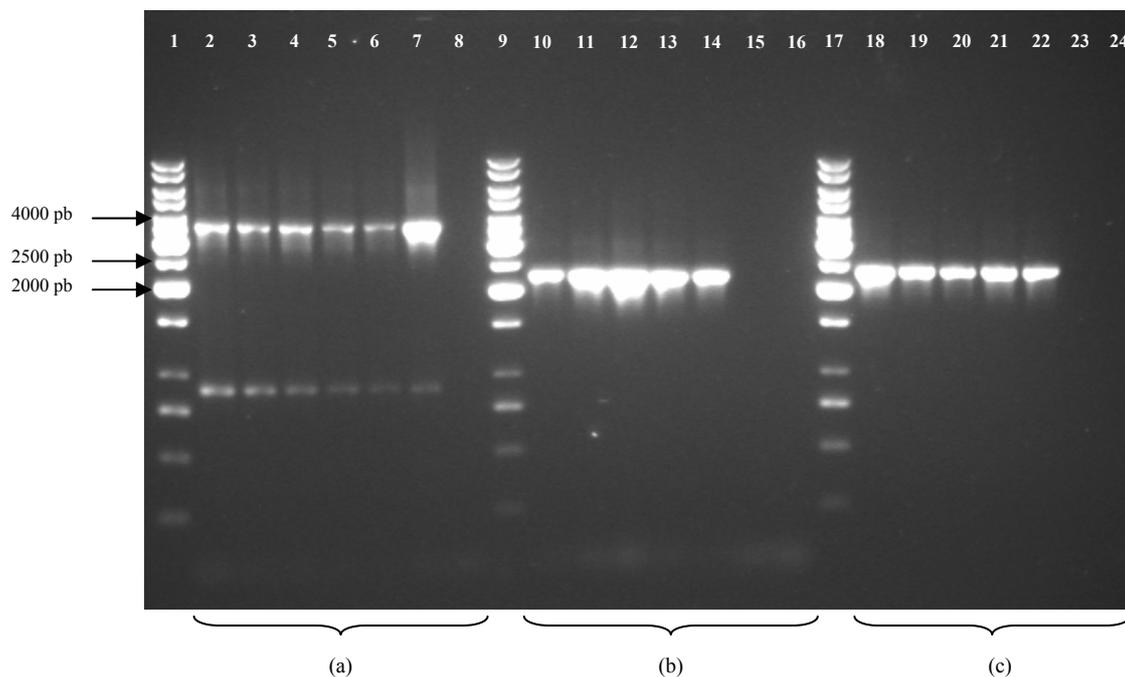


Fig. 4.20. Gel de agarosa al 1 %, de las PCRs de comprobación de cinco transformantes R6-T2375-*pmrA::cat*. Carriles 1, 9 y 17, GeneRuler 1 Kb. (a) PCR: PmrA-P1/PmrA-P4. (b) PCR: PmrA-P1/ Cat-PB. (c) PCR: Cat-PA/PmrA-P4. Los carriles 7, 15 y 23, corresponden a R6. Los carriles 8, 16 y 24, corresponden a controles negativos de las PCRs. Los carriles 2 a 6, 10 a 14 y 18 a 22, corresponden a los cinco transformantes seleccionados.

Los transformantes con el gen *pmrA* inactivado, R6-T2375-*pmrA::cat* y R6-T3073-*pmrA::cat*, en la amplificación mediante PCR con las parejas de oligonucleótidos PmrA-P1/Cat-PB y Cat-PA/PmrA-P4, dieron lugar a los fragmentos esperados de 2301 pb y 2394 pb, respectivamente (figuras 4.20 y 4.21). En cambio, en R6 no se obtuvo ningún amplificado, tal y como era de esperar, ya que la cepa original no presentaba la construcción mutagénica con el cassette de cloranfenicol. Por otro lado, los fragmentos amplificados con los oligonucleótidos PmrA-P1/PmrA-P4, tanto para R6 como para los transformantes, fueron de un tamaño entre 3500 y 4000 pb, que coincidiría con el tamaño del amplificado de la cepa original R6 (3895 pb) y de la construcción mutagénica (3695 pb).

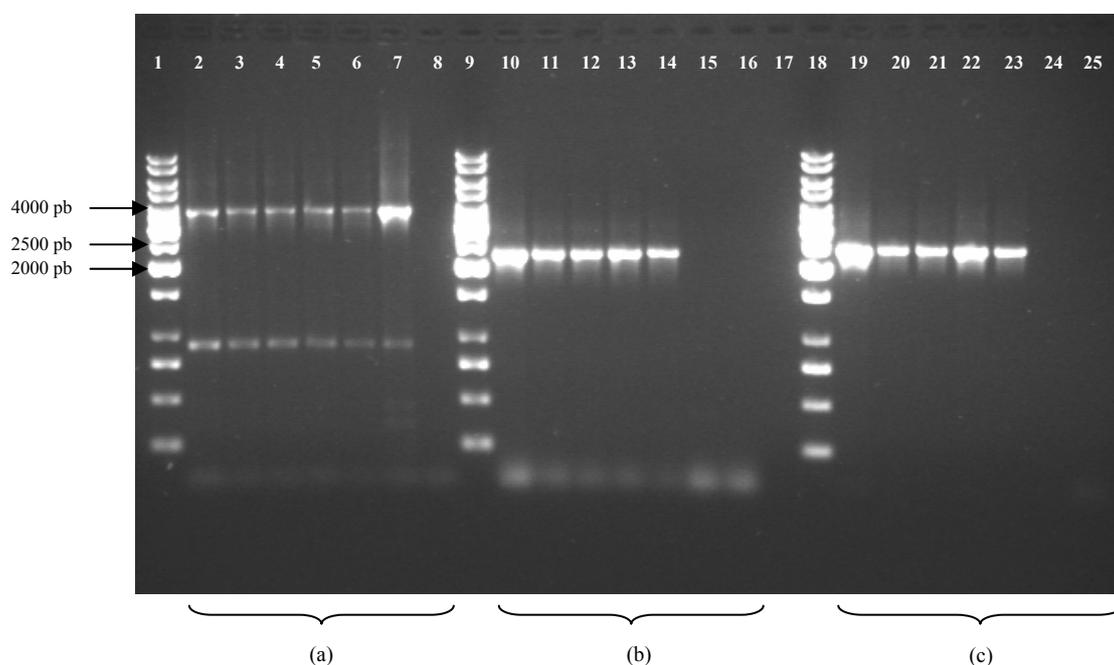


Fig. 4.21. Gel de agarosa al 1 %, de las PCRs de comprobación de cinco transformantes R6-T3073-*pmrA::cat*. Carriles 1, 9 y 18, GeneRuler 1 Kb. (a) PCR: PmrA-P1/PmrA-P4. (b) PCR: PmrA-P1/ Cat-PB. (c) PCR: Cat-PA/PmrA-P4. Los carriles 7, 15 y 24, corresponden a R6. Los carriles 8, 16 y 25, corresponden a controles negativos de las PCRs. Los carriles 2 a 6, 10 a 14 y 19 a 23, corresponden a los cinco transformantes seleccionados.

Por lo tanto, la verificación mediante PCR confirmó la obtención de transformantes con el gen *pmrA* inactivado.

Estudio fenotípico de los transformantes R6-T2375-*pmrA::cat* y R6-T3073-*pmrA::cat*

Se determinaron las MICs de los transformantes R6-T2375-*pmrA::cat* y R6-T3073-*pmrA::cat* a ciprofloxacina y a bromuro de etidio, en presencia y ausencia del inhibidor reserpina. Con ello se pretendió comprobar si el gen *pmrA*, una vez inactivado, era el responsable de la resistencia a ciprofloxacina en las cepas R6-T2375 y R6-T3073 (presumiblemente reflejo del comportamiento de 2375 y 3073). Los resultados se muestran en la tabla 4.21.

Tabla 4.21. Concentraciones mínimas inhibitorias de ciprofloxacina y bromuro de etidio, en presencia y ausencia del inhibidor reserpina, de los transformantes de reflujo de la cepa de *S. pneumoniae* R6, R6-T2375 y R6-T3073, y de los mutantes correspondientes con el gen *pmrA* inactivado, R6-T2375-*pmrA::cat* y R6-T3073-*pmrA::cat*, obtenidos mediante la estrategia PLM. Asimismo se incluyen las concentraciones mínimas inhibitorias de las cepas originales R6, 2375 y 3073.

CEPA	MICs (µg/ml)			
	CIP	CIP+R	EBR	EBR+R
R6	0.5	0.5	2	0.5
2375	8	2	16	0.5
R6-T2375	8	2	16	1
R6-T2375- <i>pmrA::cat</i>	8	2	16	1
3073	8	1	16	0.5
R6-T3073	2	1	8	1
R6-T3073- <i>pmrA::cat</i>	2	1	8	1

CIP, ciprofloxacina; EBR, bromuro de etidio; R, reserpina (10 µg/ml).

En la tabla 4.21 se observa que, en el caso de los transformantes de reflujo de la cepa R6 con la bomba de reflujo PmrA inactivada (R6-T2375-*pmrA::cat* y R6-T3073-*pmrA::cat*), el valor de la MIC de ciprofloxacina no disminuyó respecto al valor de las cepas originales (R6-T2375 y R6-T3073). Esto indica, en primer lugar, que el gen *pmrA* no parece estar implicado en la resistencia a ciprofloxacina. En segundo lugar, sugiere la presencia de otras bombas de reflujo en *S. pneumoniae* distintas de PmrA, implicadas en la resistencia a ciprofloxacina y a otros compuestos, e inhibibles por reserpina.

4.6. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS HOMÓLOGAS EN *S. pneumoniae* A BOMBAS DE REFLUJO DESCRITAS EN OTRAS BACTERIAS GRAM POSITIVAS

Planteamiento experimental

La inactivación del gen *pmrA* en las cepas de *S. pneumoniae* con fenotipo de reflujo, demostró que la bomba PmrA no estaba implicada en su resistencia a ciprofloxacina. Esto llevó a pensar en la posible acción de otra u otras bombas de reflujo en *S. pneumoniae*, no descritas hasta el momento. Llegados a este punto, se optó por buscar nuevas proteínas en *S. pneumoniae*, de función desconocida, que pudieran presentar una función similar a la bomba de reflujo PmrA.

Una aproximación a la búsqueda de nuevos genes consiste en realizar comparaciones de una secuencia conocida con las existentes en diferentes bancos de datos. En la actualidad, sólo en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) existen disponibles las secuencias de los genomas de al menos 363 microorganismos pertenecientes a diferentes especies bacterianas. De estas 363, 25 engloban secuencias que pertenecen a microorganismos del género *Streptococcus*. Aprovechando estas herramientas, se planteó como objetivo la búsqueda de proteínas homólogas en *S. pneumoniae* a otros transportadores anteriormente descritos en la bibliografía. Concretamente, se buscaron bombas de reflujo caracterizadas en bacterias Gram positivas que tuvieran como sustrato las fluoroquinolonas [53].

Las bombas consideradas fueron las proteínas de reflujo EmeA de *Enterococcus faecalis*, Blt y Bmr de *Bacillus subtilis* y NorA de *Staphylococcus aureus*, que se emplearon como secuencias “problema” en los análisis posteriores de comparación de secuencias. En la tabla 4.22 se muestran el tamaño de estas proteínas, la familia a la cual pertenecen, los distintos sustratos reconocidos en estos transportadores y la referencia de las secuencias correspondientes en el NCBI.

Tabla 4.22. Bombas de reflujo de las bacterias Gram positivas consideradas en el análisis de comparación de secuencias y sus características más relevantes.

Bacteria	Sistema de reflujo	Tamaño de la proteína (aa)	Familia	Sustrato	Referencia NCBI
<i>Bacillus subtilis</i>	Blt	400	MFS	AD, EBR, DO, FQ , RD, TPP	CAB14600
	Bmr	389	MFS	AD, EBR, DO, FQ , RD, SD, TPP	CAB14332
<i>Enterococcus faecalis</i>	EmeA	393	MFS	AC, CL, EBR, EM, FQ , NO	BAC11911
<i>Staphylococcus aureus</i>	NorA	388	MFS	FQ	AAB31949

MFS, *major facilitator superfamily*; AD, acridina; EBR, bromuro de etidio; DO, doxorubicina; FQ, fluoroquinolonas; NO, novobiocina; RD, rodamina; SD, espiromidina; TPP, tetrafenilfosfonio.

Resultados y discusión

Una vez seleccionadas las bombas de reflujo Blt, Bmr, EmeA y NorA se planteó como objetivo la comparación de sus secuencias con los genomas bacterianos de cuatro cepas de *S. pneumoniae* y una de *S. mitis*, también disponibles en la base de datos del NCBI. Se consideraron distintas cepas de *S. pneumoniae* y otra especie del género *Streptococcus* para poder comprobar si las regiones homólogas se encontraban conservadas dentro del género *Streptococcus*.

Las cepas que se emplearon en la alineación de secuencias fueron las que se muestran en la tabla 4.23. En ella también se muestran las principales características de estas cepas, así como el estado actual de secuenciación de cada una de ellas.

Tabla 4.23. Bacterias Gram positivas consideradas en el análisis de comparación de secuencias y sus características más relevantes.

Cepa	Características más relevantes	Estado de secuenciación del genoma
<i>S. pneumoniae</i> R6	No virulenta, No capsulada	Completo
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	Causante de neumonía, meningitis, otitis media	Completo
<i>S. pneumoniae</i> 23F	Virulenta. Aislado clínico, serotipo capsular 4	En progreso
<i>S. pneumoniae</i> 670-6B	Aislado del serotipo 6B	En progreso
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	Tipo de cepa que causa endocarditis	En progreso

Las secuencias completas de *S. pneumoniae* R6 y TIGR4 pueden encontrarse en la base de datos del NCBI bajo las siguientes referencias:

Cepa	Referencia secuencia	GenBank	Longitud (pb)	Nº de Proteínas
<i>S. pneumoniae</i> R6	NC 003098	AE 007317	2038615	2043
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	NC 003028	AE 005672	2160837	2094

Los centros de investigación que determinaron las secuencias y las páginas *web* correspondientes se muestran en la tabla 4.24.

Tabla 4.24. Referencia de los centros de investigación que han secuenciado las cepas de *Streptococcus* consideradas en el análisis de comparación de secuencias.

Cepa	Centro secuenciador	Página web
<i>S. pneumoniae</i> R6	Eli Lilly	http://www.streppneumoniae.com/SpR6.asp
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	The Institute for Genomic Research (TIGR)	http://www.tigr.org/tigr-scripts/CMR2/GenomePage3.spl?database=bsp
<i>S. pneumoniae</i> 23F	The Sanger Institute	http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pneumoniae/
<i>S. pneumoniae</i> 670-6B	The Institute for Genomic Research (TIGR)	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	The Institute for Genomic Research (TIGR)	http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html

La comparación de las cepas de *Streptococcus* consideradas y las proteínas de reflujos EmeA, Blt, Bmr y NorA se realizó en un análisis *tblastn* empleando el programa de comparación de secuencias *BLAST* (*Basic Local Alignment Tool*) del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi). El análisis *tblastn* compara la secuencia de una proteína frente a una o más secuencias de nucleótidos en la base de datos, traducidas dinámicamente en seis pautas de lectura, teniendo en cuenta las dos hebras.

El valor de E (*Expect value*) obtenido en cada análisis sirvió para considerar aquellas homologías que fueron significativas y descartar las que no lo fueron. E es un parámetro que describe el número de éxitos que se puede esperar por azar, teniendo en cuenta el tamaño de las secuencias comparadas. Cuanto más bajo sea el valor de E (o más cercano a 0), más significativo es. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las búsquedas con secuencias cortas pueden ser virtualmente idénticas y tener relativamente un valor elevado de E. Esto es porque el cálculo del valor de E también tiene en cuenta la longitud de la secuencia problema, ya que secuencias más cortas tienen una elevada probabilidad de ocurrir en la base de datos puramente por azar.

Inicialmente se realizó un análisis comparativo entre cada una de las bombas de reflujo y el genoma de la cepa R6. En estos análisis realizados, se encontraron homologías destacables de cada una de las proteínas (Bmr, Blt, EmeA y NorA) con la bomba PmrA de *S. pneumoniae*.

En la comparación de las bombas de reflujo Blt, Bmr y EmeA también se observaron homologías con otras regiones de *S. pneumoniae* que no correspondieron a PmrA. Con estas proteínas se decidió realizar la alineación de secuencias no sólo con R6, sino también con el resto de cepas de *Streptococcus* mencionadas en la tabla 4.24.

En la tabla 4.25 se muestran los resultados obtenidos en la alineación de secuencias mediante el programa BLAST y el nivel de homología de las distintas cepas de *Streptococcus* con la bomba de reflujo Blt de *B. subtilis*. Como puede observarse, no se encontró ninguna homología con la cepa 23F. Esto puede deberse a que el estado de secuenciación de su genoma es incompleto.

Tabla 4.25. Resultados de la alineación de la secuencia de aminoácidos de Blt de *B. subtilis* con las bacterias del género *Streptococcus* consideradas en el análisis de comparación de secuencias.

Cepa	Posición en la secuencia problema	E	Homología (%)	Posición en el genoma
<i>S. pneumoniae</i> R6	43-388	3E-7	41	1002308-1003321
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	43-389	7E-8	42	1045737-1045914
<i>S. pneumoniae</i> 23F	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 670-6B	43-381	1E-6	41	10714-9683 (contig 2099)
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	43-385	1E-6	41	15565-14540 (contig 1468)

Una vez realizado el análisis, se procedió a identificar la región homóloga a Blt en R6 que proporcionó el programa *BLAST*. Esta región correspondió a una proteína ya caracterizada e identificada como transportador ABC, implicada en el reflujo de antibióticos pertenecientes a la familia de los macrólidos.

Al igual que se realizó con BIt, se procedió a la alineación de secuencias de la bomba de reflujo Bmr de *B. subtilis* con las distintas cepas de *Streptococcus*. En la tabla 4.26 se muestran los resultados obtenidos. En este caso, no se encontraron homologías con las cepas 23F, 670-6B ni NCTC 12261, cuyos genomas no están secuenciados completamente.

Tabla 4.26. Resultados de la alineación de la secuencia de aminoácidos de Bmr de *B. subtilis* con las bacterias del género *Streptococcus* consideradas en el análisis de comparación de secuencias.

Cepa	Posición en la secuencia problema	E	Homología (%)	Posición en el genoma
<i>S. pneumoniae</i> R6	39-379	0.008	36	1426667-1425609
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	39-379	0.004	38	1492640-1491582
<i>S. pneumoniae</i> 23F	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 670-6B	-	-	-	-
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	-	-	-	-

Nuevamente, se procedió a identificar la región homóloga a Bmr en R6, que correspondió a una proteína ya caracterizada e identificada como transportador de oxalato (*oxIT*). Curiosamente, cuando se emplea este *oxIT* como secuencia “problema”, una de las proteínas homólogas en las cepas de *S. pneumoniae* R6 y TIGR4 resulta ser EmeA.

Finalmente, se realizó la alineación de secuencias de la bomba de reflujo EmeA de *E. faecalis* con las distintas cepas de *Streptococcus*. En la tabla 4.27 se muestran los resultados obtenidos. En este caso, tampoco se encontraron homologías con la cepa 23F, posiblemente debido a que la determinación de la secuencia de su genoma no es completa.

Tabla 4.27. Resultados de la alineación de la secuencia de aminoácidos de EmeA de *E. faecalis* con las bacterias del género *Streptococcus* consideradas en el análisis de comparación de secuencias.

Cepa	Posición en la secuencia problema	E	Homología (%)	Posición en el genoma
<i>S. pneumoniae</i> R6	9-379	8E-6	41	97963-96851
<i>S. pneumoniae</i> TIGR4	9-379	1E-5	41	103414-102302
<i>S. pneumoniae</i> 23F	-	-	-	-
<i>S. pneumoniae</i> 670-6B	9-379	1E-5	41	3121-2009 (contig 2122)
<i>S. mitis</i> NCTC 12261	9-379	0.024	41	26019-24907 (contig 975)

La región homóloga a EmeA en la posición 96851-97963 de *S. pneumoniae* R6, correspondió a una proteína hipotética no caracterizada de 388 aminoácidos (Referencia spr0090). Este resultado confirmó la posible existencia de una nueva bomba de reflujo en *S. pneumoniae*, que en este caso sería homóloga a la bomba EmeA de *E. faecalis*. Según está descrito en la bibliografía, EmeA proporciona resistencia a norfloxacin y a bromuro de etidio y el reflujo puede revertirse con inhibidores como la reserpina [53].

Así pues, la búsqueda de proteínas homólogas a bombas de reflujo descritas en otras bacterias Gram positivas dio como resultado destacado la localización de una posible nueva bomba de reflujo en *S. pneumoniae* que mantendría un elevado porcentaje de similitud con la bomba de reflujo EmeA.

La alineación de la secuencia de EmeA con las distintas cepas de *Streptococcus* se muestra en las figuras 4.22 y 4.23.

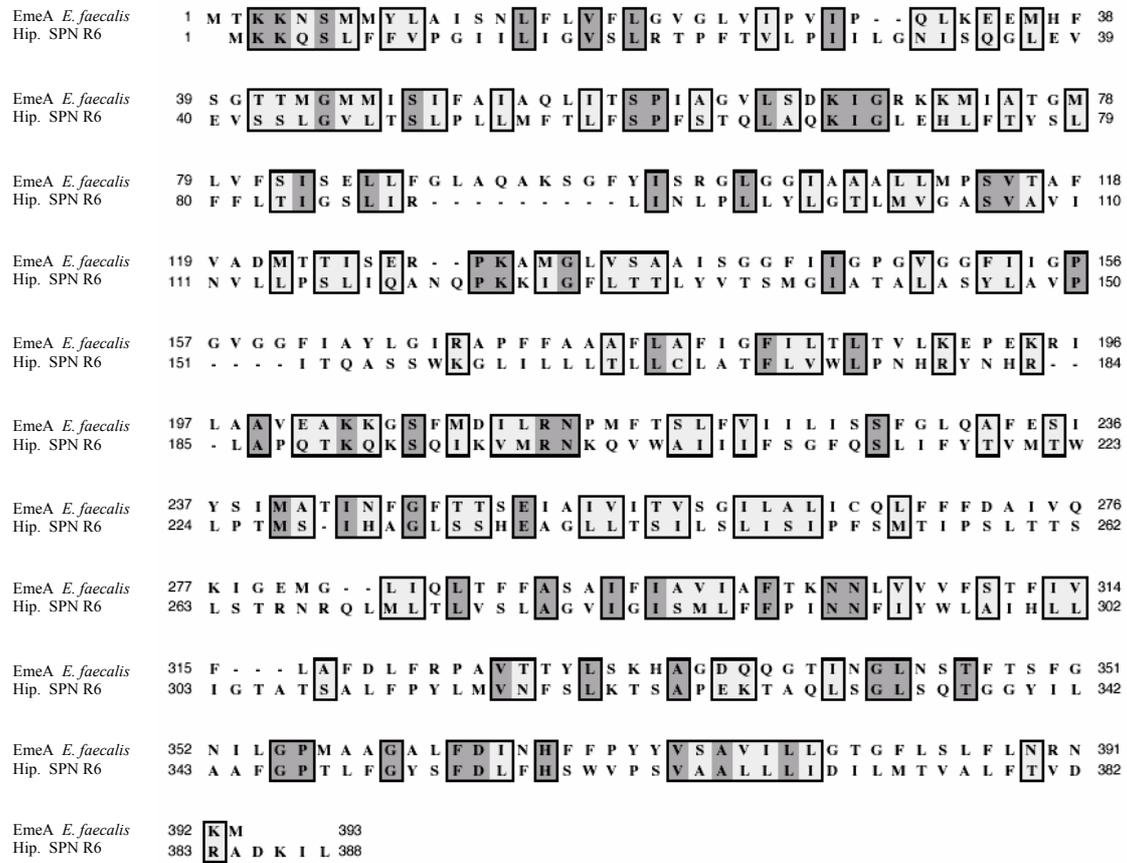


Fig. 4.22. Alineación de la secuencia de la bomba de reflujo EmeA de *E. faecalis* con la proteína hipotética de *S. pneumoniae* R6, mediante el programa de alineación de secuencias ClustalW. Las regiones marcadas en gris oscuro indican identidad entre las secuencias y las regiones marcadas en gris claro indican cambio conservado de aminoácido.

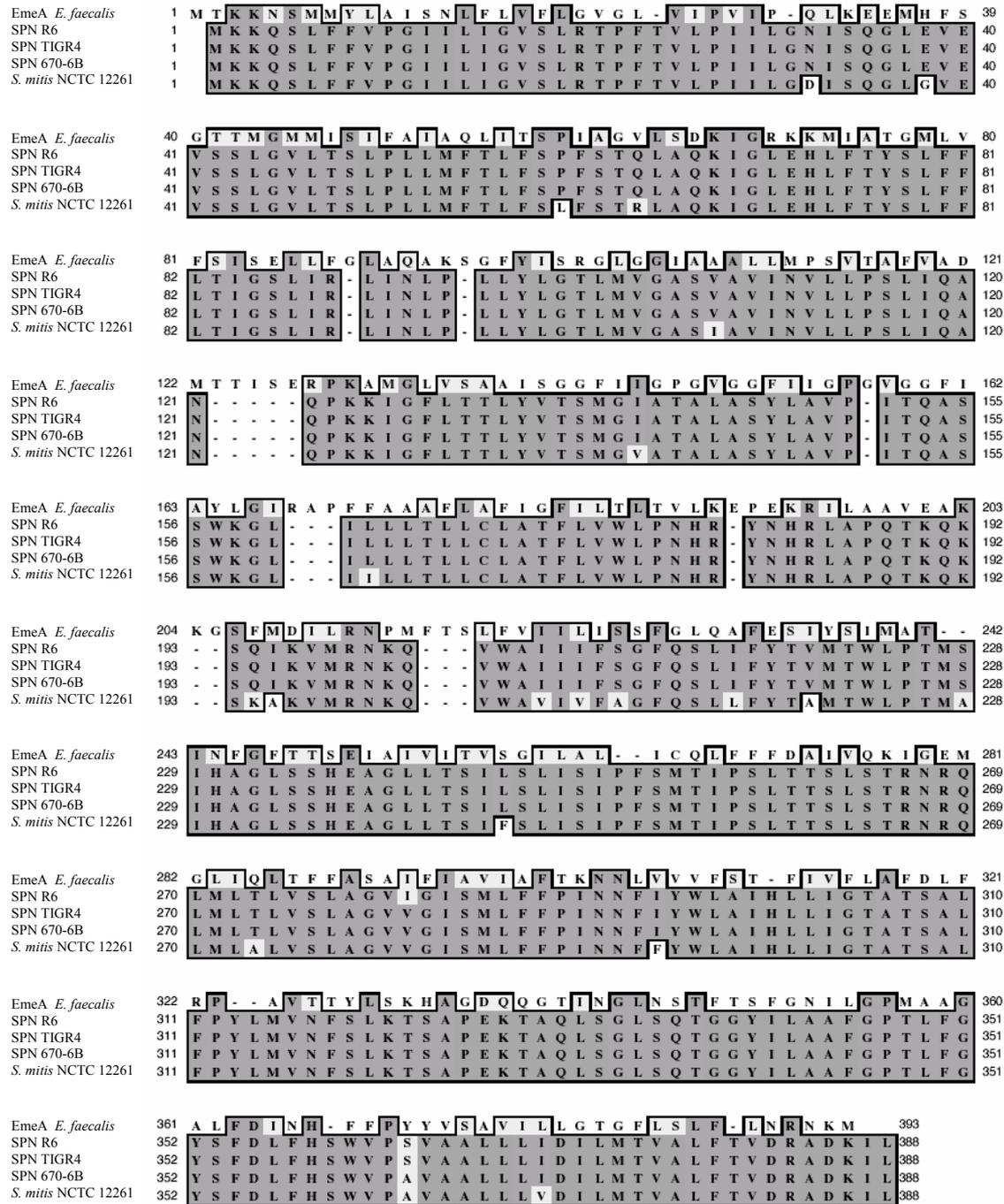


Fig. 4.23. Alineación de la secuencia de EmeA con las proteínas hipotéticas de las cepas de *S. pneumoniae* R6, TIGR4, 670-6B y *S. mitis*, mediante el programa de alineación de secuencias ClustalW. Las regiones marcadas en gris oscuro indican identidad entre las secuencias y las regiones marcadas en gris claro indican cambio conservado de aminoácido.

4.7. MICROARRAYS DE DNA.

TÉCNICA FAIM (*Fitness Analysis of Insertional Mutants*)

Planteamiento experimental

Durante los últimos años, la investigación relacionada con los genomas ha sido objeto de estudio y base para el desarrollo de nuevas tecnologías. Esto ha dado lugar, entre otras, a la tecnología de los *microarrays*, que permite el análisis simultáneo de miles de genes. Los métodos tradicionales utilizados en biología molecular generalmente estudian un número restringido de genes, lo cual significa que el alcance es muy limitado y que es muy difícil obtener una visión general de la función del gen. En este sentido, la aplicación de los *microarrays* ha supuesto un avance importante debido a que hacen posible el estudio de genomas completos en un único chip. Este conocimiento global permite entrever el funcionamiento orquestado de los genes y de cómo ellos, y por tanto las proteínas para las que codifican, interaccionan entre sí en una circunstancia determinada.

Los *microarrays* son soportes sólidos, normalmente de cristal, a los que se les adhieren muestras biológicas de naturaleza conocida y marcadas con una sustancia fluorescente. Existen básicamente dos tipos de *microarrays*, basados en los tipos de muestras distintas que pueden utilizarse en su construcción: *microarrays* de DNA y *microarrays* de proteínas. Lo que los hace distintos es el tipo de muestra inmovilizada utilizada para generar el *array* y el tipo de información que se deriva de cada chip.

Los *microarrays* de DNA constan de pequeños puntos (*spots*) de DNA fijados generalmente en soportes de vidrio (portaobjetos). Las secuencias de DNA en un *microarray* están unidas al soporte ordenadamente, para que la localización de cada punto en el *array* permita identificar la secuencia de un gen en particular. Cada gen está representado por un fragmento específico de DNA (cDNA u oligonucleótidos sintéticos de 20 a 80 nt) inmovilizado sobre la superficie y que ha sido depositado por un robot o sintetizado *in situ*, usando los principios de la fotolitografía, que permiten sintetizar sobre el mismo soporte fragmentos cortos de DNA.

El proceso está basado en la hibridación de las moléculas de ácido nucleico marcadas fluorescentemente para identificar moléculas de DNA complementarias capaces de unirse a ellas. Por lo general, se utilizan dos fluoróforos distintos, uno para la muestra problema y otro para la muestra control. Después de que se completa la hibridación, el *microarray* se introduce en un lector o escáner con el que se aplica radiación láser para excitar los fluoróforos. Este lector va acoplado a un instrumental que permite crear una imagen digital del *array*. Estos datos se almacenan en un ordenador y se utiliza generalmente un programa específico para calcular el cociente entre la fluorescencia de los dos fluoróforos (generalmente Cy3 y Cy5) en cada punto del *microarray*.

Después del estudio de la implicación del reflujo en cepas resistentes a ciprofloxacina, se planteó como objetivo la aplicación de la técnica de *microarrays* para detectar genes que contribuyen a la resistencia de la bacteria a los antibióticos. Éstos muy probablemente incluirán transportadores de reflujo y genes de reparación del DNA, entre otros, sin embargo, también pueden permitirnos caracterizar otros genes cuyas funciones no podemos tan siquiera suponer. El objetivo último de esta aplicación fue el de identificar nuevas dianas del antibiótico de estudio, así como obtener un mejor entendimiento de los mecanismos de acción de las fluoroquinolonas. Las aplicaciones de la técnica de los *microarrays* en el campo de la resistencia a los antibióticos son limitadas y hasta el momento se han centrado casi exclusivamente en *E. coli*. Es por ello que la primera aproximación realizada mediante esta técnica se basó en *microarrays* de oligonucleótidos de *E. coli*.

Neyfakh *et al.* describieron, hace ya más de diez años, el primer transportador de reflujo bacteriano conocido de múltiples antibióticos: Bmr de *B. subtilis* [96]. Desde entonces, se han descrito cientos de transportadores, muchos de ellos involucrados en la resistencia bacteriana a los antibióticos de bacterias clínicamente importantes. Actualmente son muchos los grupos de investigación que centran sus esfuerzos en aplicar nuevos métodos de genómica bacteriana para el desarrollo de nuevas aproximaciones a la terapia antibiótica (identificación de genes bacterianos que proporcionan resistencia intrínseca a los antibióticos existentes, genes involucrados en la supervivencia de los patógenos bacterianos en el organismo humano, etc.). Recientemente, Neyfakh y colaboradores han desarrollado un método que permite, entre otras cosas, la selección efectiva de mutantes bacterianos sensibles a los antibióticos,

denominado FAIM (*Fitness Analysis of Insertional Mutants*). Esta técnica está basada en la aplicación de *microarrays*, que fue la técnica desarrollada en este trabajo.

Resultados y Discusión

El método FAIM consiste, a grandes rasgos, en crear una librería de mutantes en una bacteria determinada mediante inserciones de transposones y someterla a dos condiciones de crecimiento distintas: por lo general, la librería incubada en condiciones normales y la misma librería después de someterla a ciertas condiciones de selección. Los DNA genómicos correspondientes a estas dos muestras se marcan fluorescentemente y se hibridan a un *microarray* que contiene los genes (o una representación de los mismos) de la bacteria de estudio.

La selección en nuestro caso consistió en someter una librería de *E. coli* a dosis subletales de ciprofloxacina, la fluoroquinolona de estudio. En estas condiciones, la mayoría de los clones de la librería se espera que crezcan sin problemas, pero algunos mutantes insercionales con sensibilidad aumentada al antibiótico (por ejemplo, aquellos donde la disrupción se encuentre en un transportador de múltiples antibióticos) morirán o dejarán de crecer. Si un mutante insercional muere en presencia del antibiótico, este clon también desaparecerá de la librería después de la exposición al antibiótico. Esto puede detectarse uniendo el DNA de las regiones flanqueantes de la inserción del transposón de la librería original con un color (por ejemplo, rojo) y el DNA flanqueante de las inserciones del transposón en la librería sometida al antibiótico, con otro color (por ejemplo, azul). Realizado esto, se mezclan las dos muestras marcadas fluorescentemente y se hibridan al *microarray*. Este método permitirá, pues, identificar los clones que desaparecen cuando la librería se incuba en presencia del antibiótico.

En la figura 4.24 se muestra un diagrama de flujo del proceso seguido en la aplicación de la técnica FAIM.

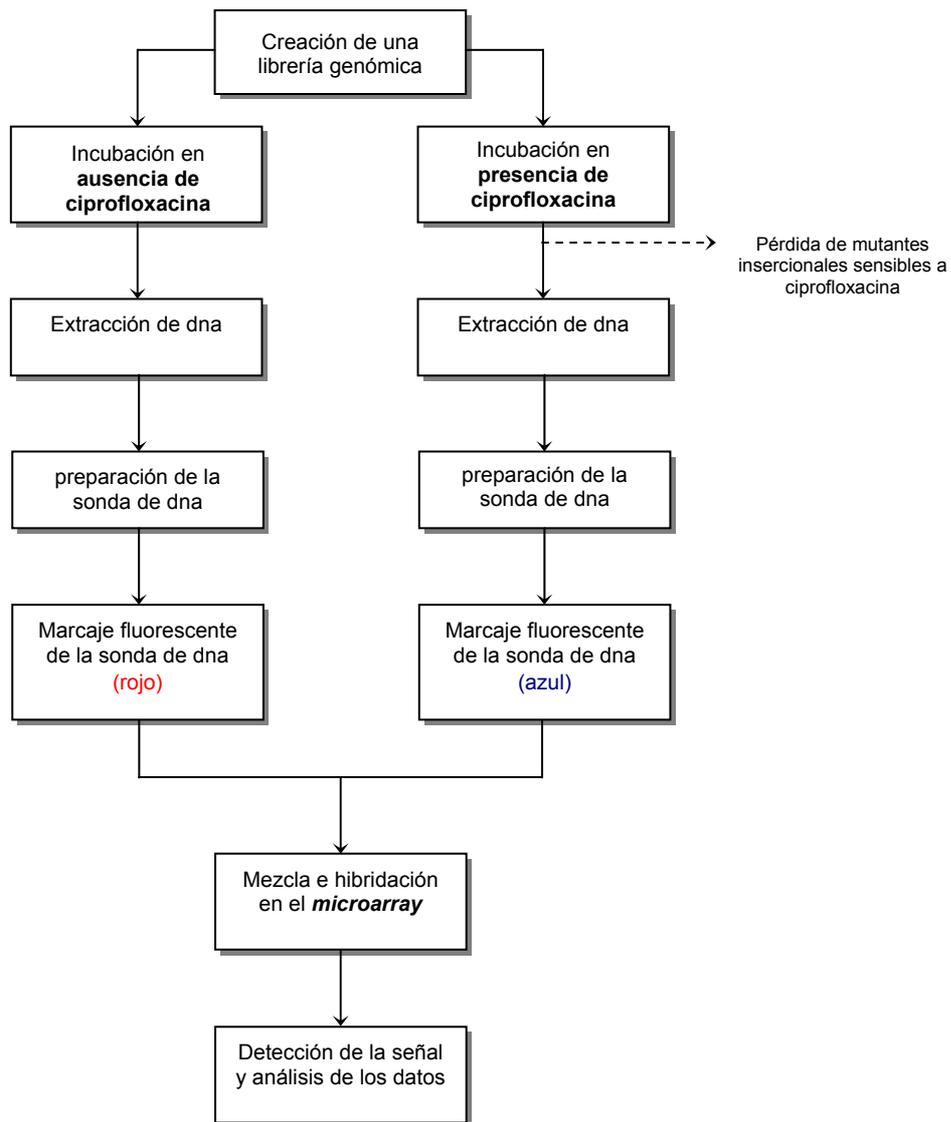


Fig. 4.24. Diagrama de flujo de la metodología aplicada en la técnica FAIM (*Fitness Analysis of Insertional Mutants*).

Condiciones de selección de la librería genómica

Tras crear la librería Tn Ω (ver apartado 3.12.1 de material y métodos), ésta se sometió a ciertas condiciones de selección. La selección en nuestro caso consistió en incorporar al medio de cultivo dosis subletales de ciprofloxacina, la fluoroquinolona de estudio.

Para determinar a qué concentración de antibiótico sería interesante realizar la selección, se determinó la MIC de ciprofloxacina de la librería Tn Ω , que correspondió a 0.031 $\mu\text{g/ml}$. Una vez determinado este valor, se incubó la librería a distintos valores de concentración del antibiótico, correspondientes a 1/10, 1/5 y 1/2 el valor de la MIC y se fue midiendo la densidad óptica a 600 nm cada 30 minutos, durante 3-4 h. Los valores obtenidos se muestran en la tabla 4.28 y en la figura 4.25.

Tabla 4.28. Valores de densidad óptica a 600 nm obtenidos durante el crecimiento de la librería Tn Ω de *E. coli* MG1655, sometida a distintas concentraciones de ciprofloxacina.

t(h)	DO (600 nm)			
	0 MIC	1/10 MIC	1/5 MIC	1/2 MIC
0	0.026	0.026	0.026	0.026
0.5	0.035	0.018	0.018	0.042
1	0.044	0.024	0.026	0.026
1.5	0.055	0.038	0.049	0.044
2	0.155	0.113	0.115	0.099
2.5	0.346	0.301	0.270	0.199
3	0.728	0.574	0.493	0.289
3.5	1.189	1.047	0.855	0.414

DO: densidad óptica; MIC: concentración mínima inhibitoria.

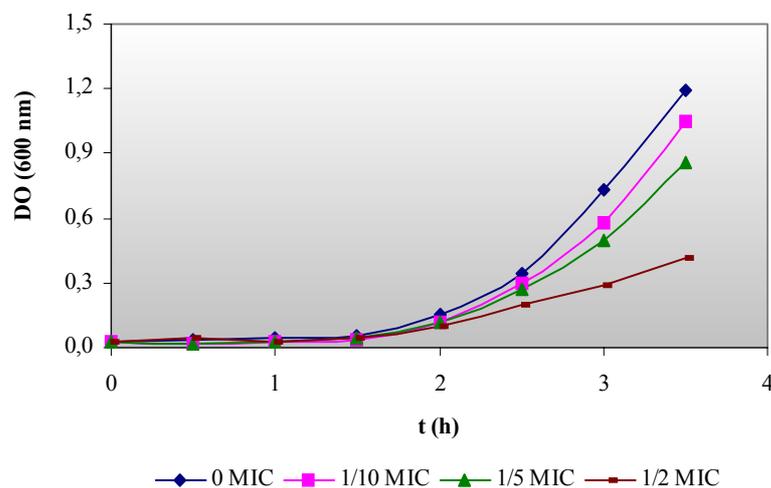


Fig. 4.25. Curvas de crecimiento de la librería Tn Ω de *E. coli* MG1655, sometida a distintas concentraciones de ciprofloxacina.

La concentración de ciprofloxacina que se seleccionó fue 1/5 el valor de la MIC. En presencia de esta concentración, la densidad óptica del cultivo transcurridas unas 3 horas fue ligeramente inferior a la del cultivo original, pero suficientemente distinta como para diferenciar entre los dos cultivos. Una vez establecida la concentración de ciprofloxacina a utilizar como condición de selección, se procedió a la extracción y purificación del DNA genómico de los cultivos de la librería original y de la librería sometida a 1/5 el valor de la MIC.

Obtención del DNA diana

La figura 4.26 muestra un esquema del proceso seguido en la obtención del DNA diana. Tras la realización de las extracciones de DNA genómico, se amplificaron mediante PCR, utilizando *primers* biotinilados, fragmentos cortos de DNA (de unos 300 pares de bases) de las regiones flanqueantes de todos los sitios de inserción del transposón en la librería genómica, tal y como se detalla en el apartado 3.12.4 de material y métodos. Posteriormente se recuperó el DNA de cadena sencilla (ssDNA) con una solución de diminutas esferas de estreptavidina magnetizada, gracias a la afinidad de la biotina por la estreptavidina. Tras modificar el extremo 3' de este ssDNA mediante poliadenilación e incorporación de dUTP aminoalil, se procedió al marcaje fluorescente del DNA.

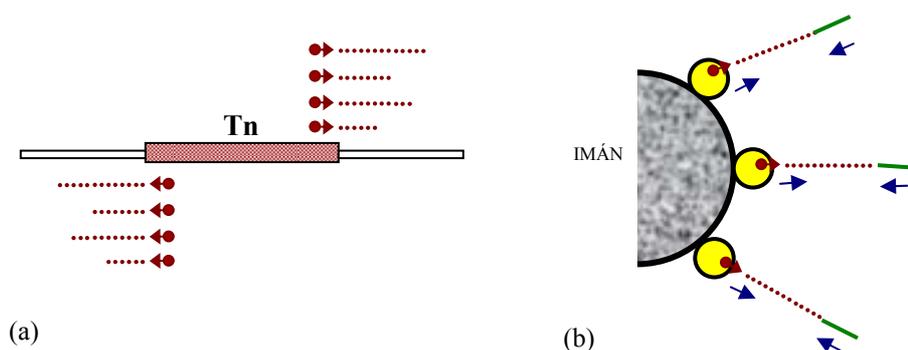


Fig. 4.26. Esquema de la preparación del DNA diana. (a) Amplificación de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla (ssDNA) flanqueantes a las regiones de inserción del transposón (Tn) en la librería genómica de mutantes, utilizando *primers* con el extremo 5' marcado con biotina (en rojo). (b) Unión de la estreptavidina (en amarillo) a la biotina y consecuente recuperación del ssDNA gracias a las propiedades magnéticas de los *beads* de estreptavidina.

Tradicionalmente, las sondas se han unido a moléculas fluorescentes mediante la incorporación de deoxinucleótidos marcados con Cy3 o Cy5 en la reacción de PCR. Sin embargo, la resolución posterior en el *microarray* no suele ser muy buena. En nuestro caso, se aplicó un método alternativo en la marcación de la sonda, que tuvo lugar en una etapa posterior a la obtención del DNA diana, denominado método aminoalil. Consiste en la incorporación de un análogo químico reactivo (dUTP-aminoalil) que se incorpora fácilmente en el DNA y que permite la unión posterior con fluorocromos como los utilizados (Alexa Fluor 555 -equivalente al marcador fluorescente Cy3- y Alexa Fluor 647 -equivalente al marcador fluorescente Cy5). Este marcaje posterior implica un procedimiento más largo que el marcaje directo, aunque el rendimiento aumenta considerablemente. Los pasos seguidos para el marcaje indirecto se detallan en el apartado 3.12.4 de material y métodos.

Hibridación del DNA en el *microarray*

El *microarray* utilizado para la hibridación de las muestras de DNA marcadas fluorescentemente fue el *MWG Biotech E. coli Start-Up array*. Este chip contiene dos repeticiones de 96 de oligonucleótidos de 50 nt, correspondientes al genoma de la cepa de *E. coli* K12, incluyendo un oligonucleótido control de *Arabidopsis* (que corresponde a un gen de *Arabidopsis thaliana*), para confirmar que la hibridación se realiza con éxito. Concretamente, consta de 60 genes regulados y 32 no regulados, que constituirían un experimento para detectar genes que codifican para proteínas *heat-shock*. Como es sabido, las bacterias responden a condiciones desfavorables como la exposición a compuestos químicos tóxicos, a agentes físicos o a aumentos repentinos de la temperatura de crecimiento, mediante la rápida expresión de regulones relacionados con el *heat shock* y dando lugar a la activación de una serie de genes SOS y respuestas del estrés oxidativo. El daño producido por el tratamiento con quinolonas como el ácido nalidíxico o la levofloxacina induce tanto la respuesta SOS como respuestas asociadas al *heat shock*, tal y como se ha descrito en la bibliografía [103]. Es por ello que la utilización inicial de este *microarray* sirvió como primera aproximación para validar el método FAIM.

Detección de la señal y análisis de los datos

El software asociado al escáner permitió la identificación de los *spots* individuales y la medida de la intensidad de cada *spot*. Estos datos fueron procesados para eliminar cualquier intensidad basal y fueron normalizados. La normalización se llevó a cabo para eliminar cualquier diferencia sistemática (no biológica) entre las muestras en el *microarray*. Por ejemplo, la corrección de señales bajas asociadas a una diana fluorescente comparada con la otra (Cy5 frente a Cy3). Los datos se representaron como un cociente entre ambas moléculas fluorescentes, de manera que permitió detectar y calcular diferencias entre las muestras. Una de las imágenes obtenidas pertenecientes a uno de los tres experimentos de *microarrays* realizados se muestra en la figura 4.27.

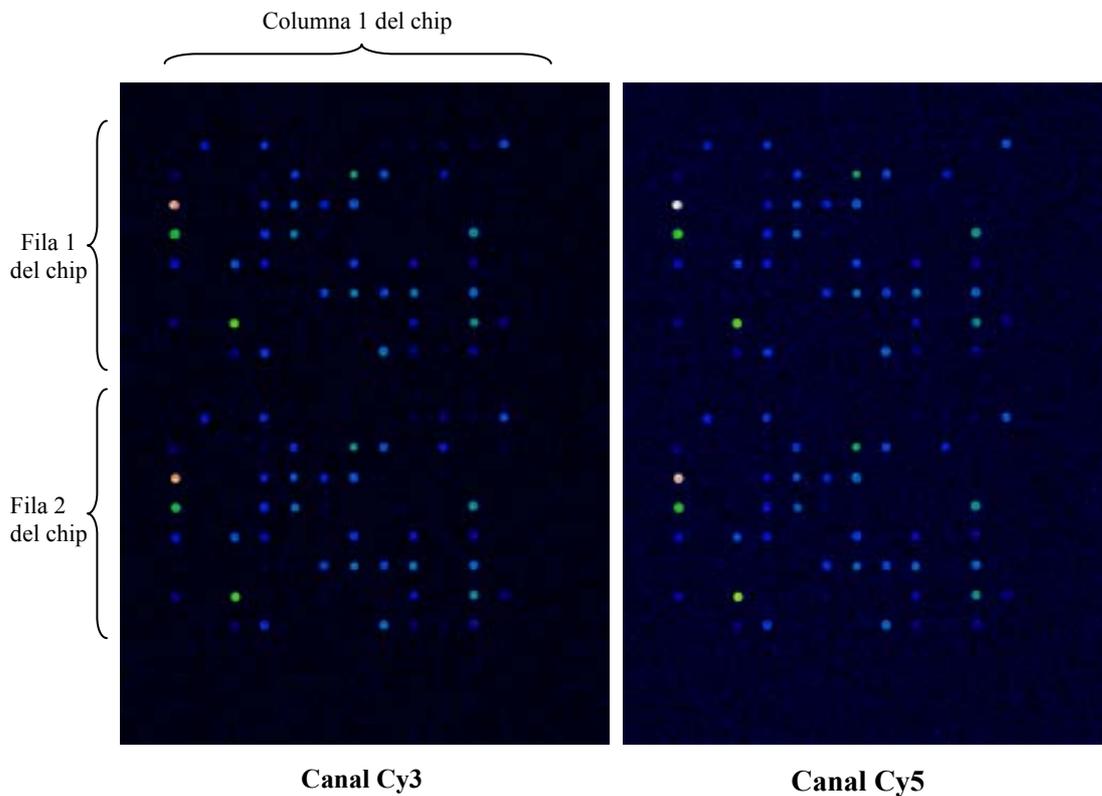


Fig. 4.27. Aplicación del método FAIM (*Fitness Analysis of Insertional Mutants*) al *microarray* MWG Biotech *E. coli* *Start-Up* (contiene dos repeticiones de 96 *spots* de oligonucleótidos de 50 nt). Los DNA diana se obtuvieron de la librería de transposones original (imagen izquierda) y de la misma librería sometida a 1/5 de la MIC de ciprofloxacina (imagen derecha) y se marcaron con Alexa Fluor 555 (Cy3) y Alexa Fluor 647 (Cy5), respectivamente. Las muestras se mezclaron e hibridaron al mismo *array* y las imágenes fueron visualizadas en los canales ópticos de Cy3 y Cy5. Las imágenes se presentan en pseudocolores correspondientes a diferentes intensidades de fluorescencia, desde el azul (débil) al blanco (fuerte).

Cabe anotar que el escáner, cuando realiza el análisis del *microarray*, lee el chip como una escala gradual que va del blanco al negro y la convierte en los colores que muestran las imágenes de la figura 4.27. Estos colores únicamente responden a diferencias en la intensidad detectada. Así pues, el color de cada *spot* se establece por conveniencia y no tiene un significado concreto.

Para buscar cambios biológicos globales en los experimentos de *microarrays*, se hizo necesario realizar múltiples réplicas y comparar los resultados de los análisis de los datos correspondientes. Por ello se realizaron tres experimentos, cuyos resultados se presentan en las tablas 4.29, 4.30 y 4.31. En ellas se muestran de manera ordenada los genes que presentaron mayores diferencias entre las dos condiciones estudiadas en los tres experimentos realizados.

Tabla 4.29. Datos obtenidos en el primer *microarray*. En la tabla se muestra la posición en el *microarray* de los genes seleccionados, así como el cociente entre los valores normalizados del canal Cy5 entre el canal Cy3. En estos valores se ha eliminado la intensidad de fondo.

Orden	Fila array	Columna array	Fila	Columna	Gen	Cy3	Cy5	Cy5/Cy3
1	1	1	8	3	<i>nuof</i>	917.21	451.34	0.492
2	1	1	6	9	<i>mscl</i>	2102.35	1036.67	0.493
3	2	1	3	7	<i>lon</i>	3082.64	1530.92	0.497
4	2	1	6	9	<i>mscl</i>	2098.63	1077.15	0.513
5	1	1	5	9	<i>hsca</i>	2502.21	1288.68	0.515
6	2	1	5	9	<i>hsca</i>	2659.92	1400.13	0.526
7	2	1	5	8	<i>yhfy</i>	4864.59	2576.16	0.530
8	1	1	4	4	<i>pcka</i>	1736.81	922.75	0.531
9	1	1	1	2	<i>cyob</i>	1331.04	728.93	0.548
10	1	1	3	4	<i>nuom</i>	4586.94	2600.13	0.567
11	2	1	3	4	<i>nuom</i>	5254.46	2978.72	0.567
12	2	1	3	6	<i>hslu</i>	4895.44	2887.44	0.590
13	2	1	1	5	<i>artq</i>	5170.24	3070.08	0.594
14	1	1	5	8	<i>yhfy</i>	4182.54	2513.81	0.601
15	1	1	3	7	<i>lon</i>	2961.75	1783.63	0.602
16	1	1	2	4	<i>nuol</i>	1476.52	896.29	0.607
17	2	1	4	10	<i>rpe</i>	3377.11	2065.97	0.612
18	2	1	6	8	<i>yi81 2</i>	3380.41	2121.93	0.628
19	2	1	4	12	<i>yhal</i>	1638.58	1033.29	0.631
20	1	1	4	12	<i>yhal</i>	1707.97	1081.08	0.633

Tabla 4.30. Datos obtenidos en el segundo *microarray*. Se muestra la posición en el *microarray* de los genes seleccionados, así como el cociente entre los valores normalizados del canal Cy5 entre el canal Cy3. En estos valores se ha eliminado la intensidad de fondo.

Orden	Fila array	Columna array	Fila	Columna	Gen	Cy3	Cy5	Cy5/Cy3
1	1	1	2	4	<i>nuol</i>	1756.38	531.76	0.303
2	1	1	7	5	<i>grpe</i>	4970.33	1619.95	0.326
3	1	1	6	8	<i>yi81 2</i>	4189.80	1399.20	0.334
4	1	1	3	7	<i>lon</i>	2890.94	992.22	0.343
5	2	1	6	8	<i>yi81 2</i>	3788.60	1329.53	0.351
6	2	1	3	5	<i>clpb</i>	3157.87	1125.45	0.356
7	2	1	7	5	<i>grpe</i>	4534.33	1619.90	0.357
8	1	1	3	5	<i>clpb</i>	2946.47	1084.45	0.368
9	1	1	6	9	<i>mscl</i>	2076.10	768.83	0.370
10	1	1	7	6	<i>ibpb</i>	5837.75	2233.30	0.383
11	2	1	3	4	<i>nuom</i>	4704.45	1807.97	0.384
12	2	1	5	8	<i>yhfy</i>	4239.40	1666.46	0.393
13	2	1	3	7	<i>lon</i>	2999.06	1186.81	0.396
14	2	1	2	4	<i>nuol</i>	1462.27	580.01	0.397
15	2	1	5	9	<i>hsca</i>	2029.65	808.32	0.398
16	1	1	5	8	<i>yhfy</i>	4485.55	1812.01	0.404
17	1	1	7	3	<i>nmpc</i>	1902.38	770.13	0.405
18	2	1	6	9	<i>mscl</i>	1803.11	739.31	0.410
19	1	1	8	1	<i>cyoa</i>	3701.22	1560.19	0.422
20	1	1	5	9	<i>hsca</i>	2195.99	928.26	0.423

Tabla 4.31. Datos obtenidos en el tercer *microarray*. Se muestra la posición en el *microarray* de los genes seleccionados, así como el cociente entre los valores normalizados del canal Cy5 entre el canal Cy3. En estos valores se ha eliminado la intensidad de fondo.

Orden	Fila array	Columna array	Fila	Columna	Gen	Cy3	Cy5	Cy5/Cy3
1	2	1	6	8	<i>yi81 2</i>	4603.33	2278.76	0.495
2	2	1	3	3	<i>icda</i>	1461.73	757.30	0.518
3	1	1	7	3	<i>nmpc</i>	2126.94	1104.62	0.519
4	2	1	6	9	<i>mscl</i>	2319.01	1204.44	0.519
5	1	1	6	9	<i>mscl</i>	2431.11	1265.70	0.521
6	2	1	5	8	<i>yhfy</i>	4907.25	2625.89	0.535
7	2	1	7	5	<i>grpe</i>	3323.57	1806.16	0.543
8	1	1	5	8	<i>yhfy</i>	4615.26	2566.19	0.556
9	2	1	6	7	<i>groel</i>	2300.39	1287.40	0.560
10	1	1	7	5	<i>grpe</i>	3637.32	2079.90	0.572
11	2	1	1	2	<i>cyob</i>	1343.78	775.89	0.577
12	1	1	3	7	<i>lon</i>	2576.18	1523.57	0.591
13	2	1	7	3	<i>nmpc</i>	1798.99	1070.64	0.595
14	2	1	7	8	<i>yrfg</i>	2461.29	1496.40	0.608
15	1	1	4	4	<i>pcka</i>	2008.67	1236.50	0.616
16	1	1	2	1	<i>acee</i>	1326.84	829.51	0.625
17	1	1	6	8	<i>yi81 2</i>	3998.44	2540.69	0.635
18	2	1	3	7	<i>lon</i>	2559.51	1658.07	0.648
19	2	1	6	6	<i>ibpa</i>	4700,39	3045.04	0.648
20	1	1	6	6	<i>ibpa</i>	4834,99	3137.47	0.649

Tras la obtención de los resultados se siguieron los siguientes criterios:

- 1) Se consideraron aquellos genes en los que la intensidad correspondiente al canal Cy3 (marcador fluorescente presente en la sonda de DNA de la librería genómica incubada en condiciones normales) era claramente superior a la intensidad detectada para los mismos genes en el canal Cy5 (marcador fluorescente presente en la sonda de DNA de la librería genómica incubada en presencia de ciprofloxacina). Es decir, genes que proporcionaron un valor pequeño del cociente Cy5/Cy3. En estos casos se deduce que existe una pérdida de los clones correspondientes en la librería incubada a 1/5 de la MIC de ciprofloxacina. Por lo tanto, los genes corresponderán a genes implicados en la resistencia de la bacteria al antibiótico.
- 2) En segundo lugar, se compararon entre sí los resultados pertenecientes a los tres *microarrays* realizados. Con ello se pretendió detectar genes claramente diferenciados entre las dos condiciones de crecimiento de la librería, de manera reproducible en todos los experimentos.

En cada ensayo realizado se trataron los resultados independientemente y se dispusieron los datos Cy5/Cy3 en orden creciente. Tras la normalización de los datos, se escogieron, de las 192 posiciones posibles (los 192 puntos que contiene el *microarray*), las 20 primeras posiciones, tal y como puede observarse en las tablas 4.28, 4.29, 4.30.

Los experimentos resultaron ser razonablemente reproducibles, pudiéndose seleccionar cuatro genes como posibles candidatos involucrados en la resistencia de la bacteria a ciprofloxacina: *lon*, *mscl*, *yhyf* y *hsca*. El gen *lon* codifica para una proteína *heat-shock*. El gen *mscl* codifica para un canal de elevada conductancia. El gen *yhyf* es un gen que codifica para una proteína de función desconocida. Y el gen *hsca* codifica para una proteína de respuesta al estrés.

En primer lugar, resulta de interés la detección de genes que codifican para proteínas de función desconocida, como es el caso del gen *yhyf* seleccionado, cuyo estudio permitiría determinar la implicación de la proteína para la cual codifica en la resistencia a ciprofloxacina, hasta el momento no descrita.

Por otro lado, la proteína Lon es una proteína activada durante una respuesta *heat-shock*. La respuesta *heat-shock* constituye uno de los principales sistemas de regulación y se caracteriza por la inducción de un gran número de proteínas (*heat-shock proteins*, HSPs) como resultado de un aumento de la temperatura u otras condiciones ambientales y fisiológicas [104]. Estas HSPs incluyen mayoritariamente chaperonas moleculares y proteasas ATP-dependientes, como la proteína Lon, codificada por el gen *lon*. La proteasa Lon degrada la proteína Sula, de respuesta SOS, que si se acumula en el interior de la bacteria da lugar a la inhibición de la división celular. Existen trabajos que confirman, mediante la inactivación de genes que codifican para HSPs, que las proteínas inducidas cuando las bacterias están expuestas a los antibióticos pueden afectar a la susceptibilidad a estos agentes. La inactivación del gen *lon*, por ejemplo, se ha comprobado que da lugar a un aumento de la sensibilidad a la fluoroquinolona levofloxacina [103].

Así pues, las bacterias sometidas a condiciones desfavorables, como puede ser la presencia de un determinado antibiótico, responden a esta situación mediante la rápida expresión de genes relacionados con el *heat-shock*, el sistema SOS y las respuestas al estrés oxidativo. Tal sería el caso de las proteínas codificadas por los genes *lon* y *hsca*, seleccionados a partir de los datos obtenidos en los experimentos realizados. Estos resultados permiten demostrar la posible implicación de estos genes en la resistencia a la fluoroquinolona ciprofloxacina.

Finalmente, la proteína de membrana MscL es una proteína de canal mecanosensitivo, un tipo de proteína que detecta cambios en la tensión de la membrana celular [105]. Estos cambios ocurren cuando la concentración del fluido circundante difiere de las condiciones intracelulares. En respuesta al cambio en la tensión, MscL altera su forma, abriendo y cerrando poros en la membrana. Esta proteína protege las células bacterianas del shock hipotónico, reduciendo la presión intracelular a través de la liberación de osmolitos citoplásmicos.

Los canales iónicos como la proteína MscL están presentes en todas las bacterias y actúan como una válvula de escape de emergencia abriendo canales a través de la membrana. Sin embargo, una apertura prolongada puede desencadenar la muerte de la bacteria. De hecho,

los nuevos avances en el estudio de este tipo de proteínas, que mantienen las células vivas cerrando y abriendo poros en la membrana, pueden suponer una estrategia al desarrollo de nuevos antibióticos.

En resumen, la aplicación del método FAIM, basado en la técnica de *microarrays* de DNA, permitió la detección de genes presumiblemente implicados en la resistencia a ciprofloxacina, uno de los cuales (el gen *lon*) ya está descrito que participa en la resistencia a levofloxacina [103].

Por lo tanto, el método FAIM sería una extraordinaria herramienta a aplicar en *S. pneumoniae* que nos permitiría determinar, a nivel molecular, nuevos mecanismos involucrados en la resistencia a fluoroquinolonas.

5. CONCLUSIONES

1. La mayoría de cepas clínicas de *S. pneumoniae* estudiadas presentaron una elevada resistencia a las fluoroquinolonas, siendo todas ellas resistentes a ciprofloxacina.
2. Se demostró que la resistencia a fluoroquinolonas en las cepas de *S. pneumoniae* podía deberse a la transferencia génica horizontal por parte de especies relacionadas, como estreptococos del grupo *viridans*.
3. Los mecanismos de resistencia a ciprofloxacina en las cepas de *S. pneumoniae* estudiadas fueron debidos, principalmente, a mutaciones en las dianas de las fluoroquinolonas *parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB*. Los niveles bajos de resistencia fueron debidos a mutaciones en el gen *parC*, mientras que se detectaron niveles de resistencia más elevados en aquellas cepas que presentaron mutaciones en los genes *parC* y *gyrA*.
4. Las cepas de *S. pneumoniae* 2375 y 3073 presentaron una concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacina considerable pero su resistencia no respondió a mutaciones en las dianas *parC*, *parE*, *gyrA* y *gyrB* de las fluoroquinolonas.
5. La determinación de las MICs y las curvas de inhibición del crecimiento en presencia del inhibidor reserpina en las cepas 2375 y 3073 indicaron la posible implicación de un mecanismo de reflujo en la resistencia de dichas cepas a ciprofloxacina.
6. Los datos obtenidos en los experimentos de acumulación de ciprofloxacina mediante fluorimetría, pese a mostrar una ligera tendencia, no fueron estadísticamente significativos, no permitiendo verificar la presencia de un mecanismo de reflujo en las cepas 2375 y 3073. Este método, pese a que se ha utilizado con éxito en distintas bacterias Gram negativas, no pareció ser eficaz en *S. pneumoniae*.
7. El método PLM permitió la inactivación del gen *pmrA*, que codifica para la única bomba de reflujo descrita hasta el momento en *S. pneumoniae*, en la cepa altamente transformable R6.

8. Las cepas 2375 y 3073 no pudieron ser transformadas aún cuando se utilizaron los factores de competencia CSP1 y CSP2. En cambio, se pudieron obtener transformantes de reflujo de la cepa no capsulada R6 a partir de DNA procedente de las cepas 2375 y 3073.
9. La cepa R6 de *S. pneumoniae* adquirió el fenotipo de resistencia a ciprofloxacina y a bromuro de etidio al ser transformada con DNA cromosómico de las cepas 2375 y 3073.
10. La inactivación del gen *pmrA* en transformantes de reflujo de R6, obtenidos con DNA de las cepas 2375 y 3073, indicó que la bomba PmrA no está implicada en la resistencia a ciprofloxacina, sugiriendo la presencia de otra u otras bombas de reflujo distintas de PmrA en *S. pneumoniae*, también inhibibles por el alcaloide reserpina.
11. Los resultados de los análisis BLAST entre las secuencias de proteínas de reflujo caracterizadas en distintas bacterias Gram positivas y cuatro cepas de *S. pneumoniae* y una de *S. mitis* evidenciaron la posible existencia de al menos otra bomba de reflujo distinta de PmrA, no descrita hasta el momento en *S. pneumoniae*, y posiblemente conservada en el género *Streptococcus*.
12. La aplicación de la técnica de *microarrays* mediante el método FAIM (*Fitness Analysis of Insertional Mutants*) en un chip de oligonucleótidos de *E. coli* (*E. coli Start-Up array*), permitió seleccionar cuatro genes (*lon*, *mscl*, *yhfy* y *hsca*) presumiblemente implicados en la resistencia a ciprofloxacina, dos de los cuales codifican para una proteína *heat-shock* y una proteína de respuesta al estrés.
13. El método FAIM puede representar una valiosa herramienta a aplicar en *S. pneumoniae*, que nos permitiría determinar nuevos genes involucrados en la resistencia a fluoroquinolonas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.Henrichsen. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*, J.Clin.Microbiol., 33, (1995) 2759-2762.
- [2] D.Llull, R.Lopez, E.Garcia. Genetic bases and medical relevance of capsular polysaccharide biosynthesis in pathogenic streptococci, Curr.Mol.Med., 1, (2001) 475-491.
- [3] J.M.Sherman. The streptococci, Bacteriol.Rev., 1, (1937) 3-97.
- [4] R.Facklam. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes, Clin.Microbiol.Rev., 15, (2002) 613-630.
- [5] Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Baltimore, Maryland, USA, 1994.
- [6] L.A.Riapis, N.I.Briko. The classification of streptococci and human streptococcal diseases, Zh.Mikrobiol.Epidemiol.Immunobiol., (2000) 74-79.
- [7] E.Garcia, D.Llull, R.Munoz, M.Mollerach, R.Lopez. Current trends in capsular polysaccharide biosynthesis of *Streptococcus pneumoniae*, Res.Microbiol., 151, (2000) 429-435.
- [8] T.Kelly, J.P.Dillard, J.Yother. Effect of genetic switching of capsular type on virulence of *Streptococcus pneumoniae*, Infect.Immun., 62, (1994) 1813-1819.
- [9] R.Cockeran, R.Anderson, C.Feldman. The role of pneumolysin in the pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* infection, Curr.Opin.Infect.Dis., 15, (2002) 235-239.
- [10] M.J.Jedrzejcas. Pneumococcal virulence factors: structure and function, Microbiol.Mol.Biol.Rev., 65, (2001) 187-207.
- [11] J.C.Paton, A.M.Berry, R.A.Lock. Molecular analysis of putative pneumococcal virulence proteins, Microb.Drug Resist., 3, (1997) 1-10.
- [12] J.C.Paton, P.W.Andrew, G.J.Boulnois, T.J.Mitchell. Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins, Annu.Rev.Microbiol., 47, (1993) 89-115.
- [13] D.A.Watson, D.M.Musher, J.Verhoef. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them, Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis., 14, (1995) 479-490.
- [14] S.H.Gillespie, I.Balakrishnan. Pathogenesis of pneumococcal infection, J.Med.Microbiol., 49, (2000) 1057-1067.
- [15] H.O.Smith, D.B.Danner, R.A.Deich. Genetic transformation, Annu.Rev.Biochem., 50, (1981) 41-68.
- [16] M.G.Lorenz, W.Wackernagel. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment, Microbiol.Rev., 58, (1994) 563-602.
- [17] P.Mazodier, J.Davies. Gene transfer between distantly related bacteria, Annu.Rev.Genet., 25, (1991) 147-171.
- [18] D.A.Morrison. Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones, Microb.Drug Resist., 3, (1997) 27-37.

- [19] J.D.Chen, D.A.Morrison. Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, J.Gen.Microbiol., 133, (1987) 1959-1967.
- [20] L.S.Havarstein, R.Hakenbeck, P.Gaustad. Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges, J.Bacteriol., 179, (1997) 6589-6594.
- [21] G.Alloing, B.Martin, C.Granadel, J.P.Claverys. Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease, Mol.Microbiol., 29, (1998) 75-83.
- [22] A.M.Whatmore, V.A.Baracus, C.G.Dowson. Genetic diversity of the streptococcal competence (*com*) gene locus, J.Bacteriol., 181, (1999) 3144-3154.
- [23] B.Martin, M.Prudhomme, G.Alloing, C.Granadel, J.P.Claverys. Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*, Mol.Microbiol., 38, (2000) 867-878.
- [24] P.Luo, D.A.Morrison. Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, J.Bacteriol., 185, (2003) 349-358.
- [25] A.Tomasz. Cellular metabolism in genetic transformation of pneumococci: requirement for protein synthesis during induction of competence, J.Bacteriol., 101, (1970) 860-871.
- [26] L.S.Havarstein, G.Coomaraswamy, D.A.Morrison. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 92, (1995) 11140-11144.
- [27] Q.Cheng, E.A.Campbell, A.M.Naughton, S.Johnson, H.R.Masure. The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, Mol.Microbiol., 23, (1997) 683-692.
- [28] J.Yother, L.S.McDaniel, D.E.Briles. Transformation of encapsulated *Streptococcus pneumoniae*, J.Bacteriol., 168, (1986) 1463-1465.
- [29] A.W.Ravin. Reciprocal capsular transformations of pneumococci, J.Bacteriol., 77, (1959) 296-309.
- [30] C.G.Leonard, R.M.Cole. Purification and properties of Streptococcal competence factor isolated from chemically defined medium, J.Bacteriol., 110, (1972) 273-280.
- [31] G.Pozzi, L.Masala, F.Iannelli, R.Manganelli, L.S.Havarstein, L.Piccoli, D.Simon, D.A.Morrison. Competence for genetic transformation in encapsulated strains of *Streptococcus pneumoniae*: two allelic variants of the peptide pheromone, J.Bacteriol., 178, (1996) 6087-6090.
- [32] J.Majewski, P.Zawadzki, P.Pickerill, F.M.Cohan, C.G.Dowson. Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation, J.Bacteriol., 182, (2000) 1016-1023.
- [33] O.Humbert, M.Prudhomme, R.Hakenbeck, C.G.Dowson, J.P.Claverys. Homologous recombination and mismatch repair during transformation in *Streptococcus pneumoniae*:

- saturation of the Hex mismatch repair system, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, (1995) 9052-9056.
- [34] I.Mortier-Barriere, O.Humbert, B.Martin, M.Prudhomme, J.P.Claverys. Control of recombination rate during transformation of *Streptococcus pneumoniae*: an overview, *Microb.Drug Resist.*, 3, (1997) 233-242.
- [35] J.García de Lomas, D.Navarro, C.Gimeno. Mecanismo de acción de los antibióticos. Tratamiento antimicrobiano, Ediciones Doyma, Barcelona, 1993.
- [36] H.Fukuda, K.Hiramatsu. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, (1999) 410-412.
- [37] E.Fernandez-Moreira, D.Balas, I.Gonzalez, A.G.de la Campa. Fluoroquinolones inhibit preferentially *Streptococcus pneumoniae* DNA topoisomerase IV than DNA gyrase native proteins, *Microb.Drug Resist.*, 6, (2000) 259-267.
- [38] A.G.de la Campa, L.Balsalobre, C.Ardanuy, A.Fenoll, E.Perez-Trallero, J.Linares. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain, *Emerg.Infect.Dis.*, 10, (2004) 1751-1759.
- [39] D.T.Chu, P.B.Fernandes. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 33, (1989) 131-135.
- [40] A.Bryskier, J.F.Chantot. Classification and structure-activity relationships of fluoroquinolones, *Drugs*, 49 Suppl 2, (1995) 16-28.
- [41] D.C.Hooper, P.Devasthale, R.Zavod. Structure-activity relationships, in: D.C.Hooper, J.S.Wolfson (Eds.), *Quinolone Antimicrobial Agents*, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1993, pp. 3-52.
- [42] A.E.Asuquo, L.J.Piddock. Accumulation and killing kinetics of fifteen quinolones for *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *J.Antimicrob.Chemother.*, 31, (1993) 865-880.
- [43] D.E.King, R.Malone, S.H.Lilley. New classification and update on the quinolone antibiotics, *Am.Fam.Physician*, 61, (2000) 2741-2748.
- [44] B.A.Cunha, S.M.Qadri, Y.Ueno, E.A.Walters, P.Domenico. Antibacterial activity of trovafloxacin against nosocomial Gram-positive and Gram-negative isolates, *J.Antimicrob.Chemother.*, 39 Suppl B, (1997) 29-34.
- [45] J.F.Acar, F.W.Goldstein. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones, *Clin.Infect.Dis.*, 24 Suppl 1, (1997) S67-S73.
- [46] J.S.Wolfson, D.C.Hooper. Fluoroquinolone antimicrobial agents, *Clin.Microbiol.Rev.*, 2, (1989) 378-424.
- [47] D.C.Hooper. Mode of action of fluoroquinolones, *Drugs*, 58 Suppl 2, (1999) 6-10.
- [48] D.C.Hooper. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones, *Clin.Infect.Dis.*, 31 Suppl 2, (2000) S24-S28.

- [49] X.S.Pan, L.M.Fisher. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 41, (1997) 471-474.
- [50] H.Yoshida, M.Bogaki, S.Nakamura, K.Ubukata, M.Konno. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones, *J.Bacteriol.*, 172, (1990) 6942-6949.
- [51] P.N.Markham, E.Westhaus, K.Klyachko, M.E.Johnson, A.A.Neyfakh. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, (1999) 2404-2408.
- [52] N.P.Brenwald, M.J.Gill, R.Wise. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 42, (1998) 2032-2035.
- [53] X.Z.Li, H.Nikaido. Efflux-mediated drug resistance in bacteria, *Drugs*, 64, (2004) 159-204.
- [54] M.Putman, H.W.van Veen, W.N.Konings. Molecular properties of bacterial multidrug transporters, *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 64, (2000) 672-693.
- [55] M.I.Borges-Walmsley, K.S.McKeegan, A.R.Walmsley. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs, *Biochem.J.*, 376, (2003) 313-338.
- [56] M.J.Gill, N.P.Brenwald, R.Wise. Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, (1999) 187-189.
- [57] X.S.Pan, L.M.Fisher. DNA gyrase and topoisomerase IV are dual targets of clinafloxacin action in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 42, (1998) 2810-2816.
- [58] X.S.Pan, J.Ambler, S.Mehtar, L.M.Fisher. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 40, (1996) 2321-2326.
- [59] R.Munoz, A.G.de la Campa. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 40, (1996) 2252-2257.
- [60] E.Pestova, J.J.Millichap, G.A.Noskin, L.R.Peterson. Intracellular targets of moxifloxacin: a comparison with other fluoroquinolones, *J.Antimicrob.Chemother.*, 45, (2000) 583-590.
- [61] V.J.Heaton, C.E.Goldsmith, J.E.Ambler, L.M.Fisher. Activity of gemifloxacin against penici, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, (1999) 2998-3000.
- [62] L.J.Piddock, M.M.Johnson. Accumulation of 10 fluoroquinolones by wild-type or efflux mutant *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 46, (2002) 813-820.
- [63] V.Zeller, C.Janoir, M.D.Kitzis, L.Gutmann, N.J.Moreau. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 41, (1997) 1973-1978.

- [64] E.Pestova, J.J.Millichap, F.Siddiqui, G.A.Noskin, L.R.Peterson. Non-PmrA-mediated multidrug resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *J.Antimicrob.Chemother.*, 49, (2002) 553-556.
- [65] E.Ottolenghi, R.D.Hotchkiss. Release of genetic transforming agent from pneumococcal cultures during growth and disintegration, *J.Exp.Med.*, 116, (1962) 491-519.
- [66] Colección Española de Cultivos Tipo Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Valencia, España, 3ª ed., 1990.
- [67] S.A.Lacks, R.D.Hotchkiss. A study of the genetic material determining an enzyme activity in pneumococcus, *Bioqui.Biophys.Acta*, 39, (1960) 508-517.
- [68] D.A.Morrison. Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex, *J.Bacteriol.*, 136, (1978) 548-557.
- [69] Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 1997.
- [70] R.Beyer, E.Pestova, J.J.Millichap, V.Stosor, G.A.Noskin, L.R.Peterson. A convenient assay for estimating the possible involvement of efflux of fluoroquinolones by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: evidence for diminished moxifloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin efflux, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44, (2000) 798-801.
- [71] P.G.Mortimer, L.J.Piddock. A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, *J.Antimicrob.Chemother.*, 28, (1991) 639-653.
- [72] I.Feliciello, G.Chinali. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia coli*, *Anal.Biochem.*, 212, (1993) 394-401.
- [73] J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Manias. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [74] S.H.Gillespie, L.L.Voelker, J.E.Ambler, C.Traini, A.Dickens. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*: evidence that *gyrA* mutations arise at a lower rate and that mutation in *gyrA* or *parC* predisposes to further mutation, *Microb.Drug Resist.*, 9, (2003) 17-24.
- [75] P.C.Lau, C.K.Sung, J.H.Lee, D.A.Morrison, D.G.Cvitkovitch. PCR ligation mutagenesis in transformable streptococci: application and efficiency, *J.Microbiol.Methods*, 49, (2002) 193-205.
- [76] A.Polissi, A.Pontiggia, G.Feger, M.Altieri, H.Mottl, L.Ferrari, D.Simon. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*, *Infect.Immun.*, 66, (1998) 5620-5629.
- [77] S.Y.Gerdes, M.D.Scholle, J.W.Campbell, G.Balazsi, E.Ravasz, M.D.Daugherty, A.L.Somera, N.C.Kyrpides, I.Anderson, M.S.Gelfand, A.Bhattacharya, V.Kapatral, M.D'Souza, M.V.Baev, Y.Grechkin, F.Mseeh, M.Y.Fonstein, R.Overbeek, A.L.Barabasi, Z.N.Oltvai, A.L.Osterman. Experimental determination and system level analysis of essential genes in *Escherichia coli* MG1655, *J.Bacteriol.*, 185, (2003) 5673-5684.

- [78] I.Chopra, J.Hodgson, B.Metcalf, G.Poste. The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 41, (1997) 497-503.
- [79] A.M.Di Guilmi, A.Dessen. New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*, *EMBO Rep.*, 3, (2002) 728-734.
- [80] C.Janoir, I.Podglajen, M.D.Kitzis, C.Poyart, L.Gutmann. In vitro exchange of fluoroquinolone resistance determinants between *Streptococcus pneumoniae* and viridans streptococci and genomic organization of the *parE-parC* region in *S. mitis*, *J.Infect.Dis.*, 180, (1999) 555-558.
- [81] M.K.Lacy, D.P.Nicolau, M.A.Banevicius, C.H.Nightingale, R.Quintiliani. Protective effect of trovafloxacin, ciprofloxacin and ampicillin against *Streptococcus pneumoniae* in a murine sepsis model, *J.Antimicrob.Chemother.*, 44, (1999) 477-481.
- [82] J.Linares, F.Tubau, M.Dominguez. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: An Overview of the 1990s, in: A.Tomasz (Ed.), *Molecular biology and mechanisms of disease-update for the 1990s, Streptococcus pneumoniae*, 2000, pp. 399-407.
- [83] D.Croisier, P.Chavanet, C.Lequeu, A.Ahanou, A.Nierlich, C.Neuwirth, L.Piroth, M.Duong, M.Buisson, H.Portier. Efficacy and pharmacodynamics of simulated human-like treatment with levofloxacin on experimental pneumonia induced with penicillin-resistant pneumococci with various susceptibilities to fluoroquinolones, *J.Antimicrob.Chemother.*, 50, (2002) 349-360.
- [84] L.M.Weigel, G.J.Anderson, R.R.Facklam, F.C.Tenover. Genetic analyses of mutations contributing to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 45, (2001) 3517-3523.
- [85] Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa., 2000.
- [86] D.F.Sahm, D.E.Peterson, I.A.Critchley, C.Thornsberry. Analysis of ciprofloxacin activity against *Streptococcus pneumoniae* after 10 years of use in the United States, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44, (2000) 2521-2524.
- [87] M.J.Ferrandiz, A.Fenoll, J.Linares, A.G.de la Campa. Horizontal transfer of *parC* and *gyrA* in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 44, (2000) 840-847.
- [88] A.G.de la Campa, M.J.Ferrandiz, F.Tubau, R.Pallares, F.Manresa, J.Linares. Genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated during ciprofloxacin therapy from a patient with bronchiectasis, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 47, (2003) 1419-1422.
- [89] C.Janoir, V.Zeller, M.D.Kitzis, N.J.Moreau, L.Gutmann. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 40, (1996) 2760-2764.
- [90] N.N.Baranova, A.A.Neyfakh. Apparent involvement of a multidrug transporter in the fluoroquinolone resistance of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 41, (1997) 1396-1398.

- [91] N.P.Brenwald, M.J.Gill, R.Wise. The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the *in-vitro* susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin, *J.Antimicrob.Chemother.*, 40, (1997) 458-460.
- [92] L.J.Piddock, Y.F.Jin, M.J.Everett. Non-gyrA-mediated ciprofloxacin resistance in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*, *J.Antimicrob.Chemother.*, 39, (1997) 609-615.
- [93] P.N.Markham. Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the multidrug efflux inhibitor reserpine, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 43, (1999) 988-989.
- [94] N.P.Brenwald, P.Appelbaum, T.Davies, M.J.Gill. Evidence for efflux pumps, other than PmrA, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Clin.Microbiol.Infect.*, 9, (2003) 140-143.
- [95] A.A.Neyfakh, C.M.Borsch, G.W.Kaatz. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 37, (1993) 128-129.
- [96] A.A.Neyfakh, V.E.Bidnenko, L.B.Chen. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 88, (1991) 4781-4785.
- [97] SAS Enterprise Guide. Copyright 1999-2004(3.0). 2004. Cary, NC, USA, SAS Institute Inc. Ref Type: Computer Program.
- [98] I.Gonzalez, M.Georgiou, F.Alcaide, D.Balas, J.Linares, A.G.de la Campa. Fluoroquinolone resistance mutations in the parC, parE, and gyrA genes of clinical isolates of *viridans* group streptococci, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 42, (1998) 2792-2798.
- [99] J.G.Tiraby, M.S.Fox. Marker discrimination in transformation and mutation of pneumococcus, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 70, (1973) 3541-3545.
- [100] L.J.Piddock, M.M.Johnson, S.Simjee, L.Pumbwe. Expression of efflux pump gene pmrA in fluoroquinolone-resistant and -susceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrob.Agents Chemother.*, 46, (2002) 808-812.
- [101] R.Pallares, A.Fenoll, J.Linares. The epidemiology of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones, *Int.J.Antimicrob.Agents*, 22, (2003) S15-S24.
- [102] M.Berlanga, J.L.Vázquez, J.Hernandez-Borrell, M.T.Montero, M.Viñas. Evidence of an efflux pump in *Serratia marcescens*, *Microb.Drug Resist.*, 6(2), (2000) 111-117.
- [103] Y.Yamaguchi, T.Tomoyasu, A.Takaya, M.Morioka, T.Yamamoto. Effects of disruption of heat shock genes on susceptibility of *Escherichia coli* to fluoroquinolones, *BMC.Microbiol.*, 3, (2003) 16.
- [104] R.Rosen, E.Z.Ron. Proteome analysis in the study of the bacterial heat-shock response, *Mass Spectrom.Rev.*, 21, (2002) 244-265.
- [105] P.C.Moe, G.Levin,P.Blount. Correlating a protein structure with function of a bacterial mechanosensitive channel, *J.Biol.Chem.*, 40, (2000) 31121-31127.

