

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**“*pep 27* COMO MARCADOR DE TOLERANCIA A
VANCOMICINA EN *Streptococcus pneumoniae*”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS GENÓMICAS
P R E S E N T A
QFB. ALMA LIDIA OLIVARES CERVANTES

DIRECTORES DE TESIS.

DRA. NORMA VELAZQUEZ GUADARRAMA
DR. JOSE DE JESUS OLIVARES TREJO

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2008

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR

Dra. Norma Velázquez Guadarrama.
Encargada del Laboratorio de Bacteriología Intestinal
Hospital Infantil de México Federico Gómez

CODIRECTOR

Dr. José de Jesús Olivares Trejo
Profesor-Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

ASESORES

Dra. Elisa Azuara Liceaga
Profesor-Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Profesor-Investigador. Posgrado en Ciencias Genómicas
Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Silvia Giono Cerezo
Profesora titular. Laboratorio de Bacteriología Médica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

Dr. Gerardo Aparicio Ozores
Profesor titular. Laboratorio de Bacteriología Médica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional

APOYO ACADEMICO Y FINANCIERO

El presente proyecto de investigación fue realizado en:

- El laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Institución a la cual agradezco su apoyo académico y económico.

La realización del presente trabajo contó con el apoyo financiero de:

- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) (Proyecto Número 54212 de Ciencia Básica 2006)



APOYO ACADEMICO Y FINANCIERO

El presente proyecto de investigación fue realizado en:

- El laboratorio de Bacteriología Intestinal el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” a la cual agradezco su apoyo académico y económico.

La realización del presente trabajo contó con el apoyo financiero de:


- Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (Proyecto HIM/2006/021, de Fondos Federales)



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO

FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

 **65** AÑOS DE EXCELENCIA EN PEDIATRÍA

Salud para las Nuevas Generaciones

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo mi comité tutorial por sus valiosas enseñanzas, críticas y facilidades ofrecidas para la realización de este trabajo.

Gracias al apoyo y valiosos consejos metodológicos brindados por el M. en C. Máximo Martínez y la M. en C. Areli Cruz Castañeda.

Agradezco al Colegio de Profesores-Investigadores del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por sus grandes enseñanzas para mi formación.

Agradezco al Departamento de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", por todo su apoyo y enseñanzas en la realización de este trabajo.

**"SI HEMOS PODIDO VER MAS ALLA DEL HORIZONTE, ES
POR QUE HEMOS ESTADO EN HOMBROS DE GIGANTES"**

NEWTON

I. INDICE GENERAL

	PÁG.
I. INDICE GENERAL.....	v
II. INDICE DE FIGURA.....	i
III. INDICE DE TABLAS.....	ii
IV. ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN	v
1 INTRODUCCION	1
1.1 Antecedentes generales del tema.....	1
1.1.1 Fenómeno de Tolerancia.....	3
1.1.2 Vancomicina.....	5
1.1.2.1- Mecanismo de Acción.....	6
1.1.3.- Antecedentes de la tolerancia y resistencia a vancomicina en otros cocos gram positivos.....	8
1.1.4.- Ciclo de Crecimiento Bacteriano.....	9
1.2 Estado del arte.....	11
1.3 Antecedentes particulares de su proyecto.....	13
1.3.1 Pep 27.....	19
1.3.2 Criterio de Liu y Tomaz para determinación de Tolerancia	19
1.4 Importancia del continuar el estudio del tema.....	20
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	21
Hipótesis.....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Particulares.....	21
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	22

	PÁG.
4. METODOLOGÍA	23
4.1 Diseño del estudio.....	23
4.2 Validación de los aislamientos.....	23
4.3 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	23
4.3.1 Procedimientos para dilución en caldo (Microdilución).....	24
4.4 Detección de Tolerancia.....	24
4.4.1 Lisis bacteriana.....	24
4.4.2 Muerte logarítmica.....	25
4.5 Determinación del fenotipo Lyt A (DOC).....	25
4.6 Curva de crecimiento.....	26
4.7 RT-PCR de los genes <i>lyt A</i> y <i>pep 27</i>	26
4.7.1 Extracción de RNA con trizol.....	26
4.7.2 Tratamiento con DNasa.....	27
4.7.3 Transcripción reversa.....	27
4.7.4 Condiciones para PCR.....	28
4.7.5.- Electroforesis y análisis Densitométrico.....	29
4.7.6. Análisis Estadístico.....	29
5. RESULTADOS	30
5.1 CIM a vancomicina.....	30
5.2 Frecuencia de SPTV.....	30
5.3 Fenotipo Lyt A.....	33
5.4 Susceptibilidad antibiótica.....	33
5.5 Cinética de crecimiento.....	36
5.6 RT-PCR de <i>16S</i> , <i>pep27</i> y <i>lyt A</i>	37
5.7 Expresión de los genes <i>lyt A</i> y <i>pep27</i>	39

	PÁG.
6. DISCUSIÓN	44
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

II. INDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁG
1	Morfología microscópica de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
2	Morfología colonial de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en placas de agar sangre.....	1
3	Evidencia de la cápsula por la reacción de Quellung.....	2
4	Representación esquemática de diferencias del comportamiento de <i>S. pneumoniae</i> frente el antibiótico.....	4
5	Mecanismo de acción de la Vancomicina.....	7
6	Curva de crecimiento bacteriano	10
7	Modelo propuesto de la función del operon MurMN bajo stress.....	12
8	Fases de división celular y muerte de la bacteria, en las cuales esta involucrada Lyt A.....	14
9	Ensayo de funcionalidad de actividad autolítica de SPTV.....	16
10	Modelo de activación de Lyt A	17
11	Organización genética del locus <i>vex123-pep27-vncR/S</i> de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
12	Diagrama de dispersión de SPVT.....	32
13	Cinética de crecimiento de SPTV, cepas R6, ATCC, 35, 36, 43, 55 y 69.....	36
14	Cinética de crecimiento de SPTV, cepas 134, 141, 167, 173 y 261.....	36
15	RT-PCR del gen <i>16S</i> de <i>S. pneumoniae</i> cepa R6.....	37
16	RT-PCR del gen <i>pep27</i> de <i>S. pneumoniae</i> cepa R6.....	38
17	RT-PCR del gen <i>lyt A</i> de <i>S. pneumoniae</i> cepa R6.....	38
18	Expresión del gen <i>pep27</i> en ausencia y presencia de vancomicina en SPVT.....	40
19	Expresión del gen <i>lyt A</i> en ausencia y presencia de vancomicina en SPVT.....	41

FIGURA	PÁG
20	Expresión del los genes <i>pep27</i> y <i>lyt A</i> en las diferentes fases de crecimiento en ausencia de vancomicina en SPVT.....42
21	Expresión de los genes <i>pep27</i> y <i>lyt A</i> en las diferentes fases de crecimiento en presencia de vancomicina en SPVT.....43

III. INDICE DE TABLAS

TABLA	PÁG
1	Sitios de aislamientos de <i>S. pneumoniae</i>30
2	<i>S. pneumoniae</i> tolerantes a vancomicina de 1997 al 2006..... 31
3	Fenotipo <i>Lyt A</i> en SPVT.....33
4	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de SPVT.....34
5	Clasificación de <i>S. pneumoniae</i> vancomicina tolerantes..... 35

IV. ABREVIATURAS

ABC	Cassete enlazante de ATP
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Trifosfato
BLASTP	Basic Local Alignment Search Tool Protein
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
D-ala-D-ala	D-alanina-D-alanina
DOC	Desoxicolato de Sódio
Ery	Eritromicina
HIMFG	Hospital Infantil de México Federico Gómez
I	Intermedio
LCR	liquido cefalorraquídeo
Lyt +	Fenotipo positivo para Lyt A
Lyt 4-4	Cepa <i>S. pneumoniae</i> no tolerante con una deleción para Lyt A
Lyt A	Murein Hidrolasa
<i>MurMN</i>	Operon implicado en síntesis de pared celular
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pen	Penicilina
Pep 27	Péptido de 27 aminoácidos
Pi	Fósforo
R	Resistente
R6	Cepa de referencia <i>S. pneumoniae</i> no tolerante
RT-PCR	Retrotranscripción de Reacción en Cadena de la Polimerasa
S	Sensible
DE	Desviación Estándar
SPSS	Statistic Package for the Social Sciences
SPVT	<i>Streptococcus pneumoniae</i> tolerante a vancomicina
T4	Cepa de referencia <i>S. pneumoniae</i> tolerante

Taxo P	Etilhidrocupreina hidrocloreido
TMDs	Dominios Transmembranales
TMP-SMX	Trimetropim con Sulfametosaxol
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
<i>van A</i>	Gen responsable de resistencia a vancomicina
Vex 123	Proteína de transporte tipo ABC
VncR/S	Sistema dual regulador de histidina-cinasa
VrasR	Sistema dual regulador

RESUMEN

Antecedentes. La tolerancia a la vancomicina es un fenómeno poco estudiado que se asocia a bacterias gram positivas como *Streptococcus pneumoniae*, el cual es la causa de muerte en infecciones graves. Actualmente se desconocen los mecanismos que pudieran estar implicados en dicho fenómeno y por lo tanto no existe un marcador para su identificación.

Método. Se incluyeron 309 aislamientos clínicos de *S. pneumoniae*, identificados por pruebas microbiológicas básicas. Se determinó la susceptibilidad a vancomicina midiendo la concentración inhibitoria mínima (CIM), siguiendo los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). El fenotipo Lyt A se estableció mediante la técnica de DOC. Se definieron las cepas con el fenómeno de tolerancia mediante la determinación de lisis y viabilidad después de 4 horas de adicionar vancomicina (10X). A las cepas de *S. pneumoniae* vancomicina tolerantes (SPVT) se les determinó la CIM a los antibióticos de uso frecuente, el serotipo mediante la reacción de Quellung y la expresión del gen *pep27* por RT-PCR.

Resultados y Conclusiones: El 100% de los aislamientos fueron sensibles a vancomicina y el 70% a la penicilina. El 3.6% (11/309) resultaron SPVT (5 moderada y 6 altamente tolerantes); en estos predominaron los serotipos 23F y 6B. El 63.7% fueron resistentes a penicilina y 1 SPVT presentó un fenotipo negativo a Lyt A, una de las cepas SPVT fue multirresistente a más de tres familias de antibióticos. En las cepas SPVT con estímulo de vancomicina (10X CIM), se encontró una disminución en la expresión del gen *pep27* en fase muerte con respecto a la cepa de referencia R6 (no tolerante). El comportamiento de las cepas clínicas no tolerantes se debe estudiar y comparar con las cepas tolerantes para establecer cual es la relevancia del gen *pep27* respecto a la tolerancia.

1. INTRODUCCION

1.1.- ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

Streptococcus pneumoniae es una bacteria gram-positiva cápsulada, clasificada según el manual de Bergey dentro de la Familia *Streptococcaceae*, del Género *Streptococcus*. Especie *pneumoniae*. Se agrupa en diplococos, tiene una forma lanceolada y presenta cápsula [figura 1] (Koneman y col. 1999).

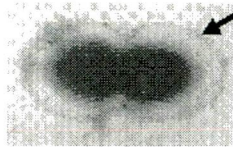


Fig. 1 Morfología microscópica de *Streptococcus pneumoniae*, la flecha indica la cápsula.

Tomado de www.genome.uab.edu/strep/

Estas bacterias son anaerobias facultativas, crecen en medios enriquecidos con sangre al 5%, en donde se observan colonias puntiformes, grisáceas, planas, umbilicadas, con alfa hemólisis, pueden presentar una morfología mucóide [figura 2], una de las pruebas de identificación presuntiva, es la evidencia de un halo de inhibición alrededor de un sensidisco de Taxo P (etilhidrocupreina hidrocloreto) (Koneman y col. 1999).

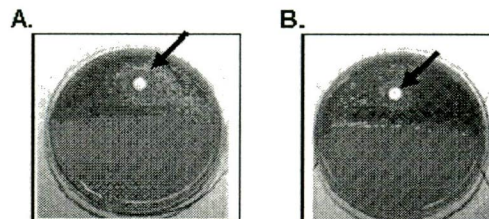


Fig 2 Morfología colonial de *S. pneumoniae* en placas de agar sangre, con prueba de Taxo P, indicado con una flecha. A) Cepa con colonias cremosas B) Cepa con colonias mucoides

Existen alrededor de 90 serotipos, los cuales se basan en su antígeno capsular, esta cápsula puede ser evidenciada mediante la reacción de Quellung (hinchazón de cápsula), y puede ser observada al microscopio como un halo alrededor de los diplococos [figura 3]. Se ha descrito que el serotipo está relacionado con la resistencia a múltiples antibióticos (incluyendo penicilina), siendo los de mayor importancia y prevalencia el 6, 9, 14, 19 y 23. La alta prevalencia de estos serotipos en México hace evidente el problema de resistencia de esta bacteria (Calderón, 1999).

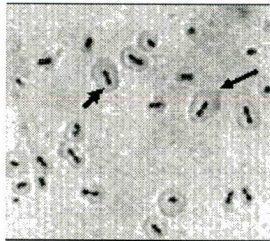


Fig 3 Evidencia de la cápsula por la reacción de Quellung, las flechas indican la cápsula.

Tomada de www.bact.wisc.edu/.../S.pneumoniae.html

S. pneumoniae puede ser una bacteria comensal que coloniza la nasofaringe en el 20% a 50% de los niños y adultos mayores, la transición de bacteria comensal a patógeno oportunista, se puede presentar después de una infección primaria del tracto respiratorio (Lanie y col. 2007). Es uno de los principales patógenos responsables de una gran variedad de enfermedades: incluyendo padecimientos respiratorios, bacteriémias y meningitis, este microorganismo posee una gran habilidad para generar infecciones de tipo sistémicas, siendo los grupos de edad de más alto riesgo los niños < 2 años de edad y adultos > 65 años de edad, así como individuos inmunosuprimidos y debilitados (Lanie y col. 2007). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que hay una mortalidad de un millón de niños cada año en el mundo, debido a

infecciones neumocócicas, ocurriendo estas muertes principalmente en países en vías de desarrollo (W H O, 2003). Asimismo, uno de los factores importantes en el estudio en *S. pneumoniae* es la emergencia de resistencia a la penicilina y el incremento cada vez más de cepas con resistencia múltiple (Hortal y col. 2001).

Antes de 1960 todos los aislamientos eran susceptibles a penicilina; en México antes de 1993 las cepas de *S. pneumoniae* resistentes eran relativamente raras, por lo que la penicilina fue considerada como el antibiótico de primera elección para el tratamiento empírico de las infecciones neumocócicas por más de 50 años; sin embargo, de 1967 a 1977 alrededor del mundo se publicaron informes esporádicos de aislamientos de neumococos resistentes a la penicilina (Calderón, 1999) y en 1985 se establecieron los criterios, para determinar un fenómeno alterno a la resistencia a penicilina, llamado tolerancia (Liu y col. 1985).

1.1.1.- Fenómeno de Tolerancia

La tolerancia antibiótica es la capacidad de una bacteria a sobrevivir, pero no proliferar en la presencia de un antibiótico bactericida, una vez que este es eliminado se recupera su capacidad de crecimiento, a este evento se le conoce como incremento de supervivencia bacteriana (Ortega y col. 2003). Existe una clara diferencia entre sensibilidad, resistencia y tolerancia, en el caso de la resistencia antibiótica la bacteria es capaz de crecer en presencia del antibiótico, [figura 4 A], en el caso de una cepa sensible todas las bacterias mueren en presencia del antibiótico [figura 4 B]. Por su parte cuando es tolerante la bacteria no prolifera, pero si se mantiene viable, y una vez eliminado el antibiótico esta recupera su capacidad de crecimiento y se multiplica [figura 4 C] (Rodríguez y col. 2004).

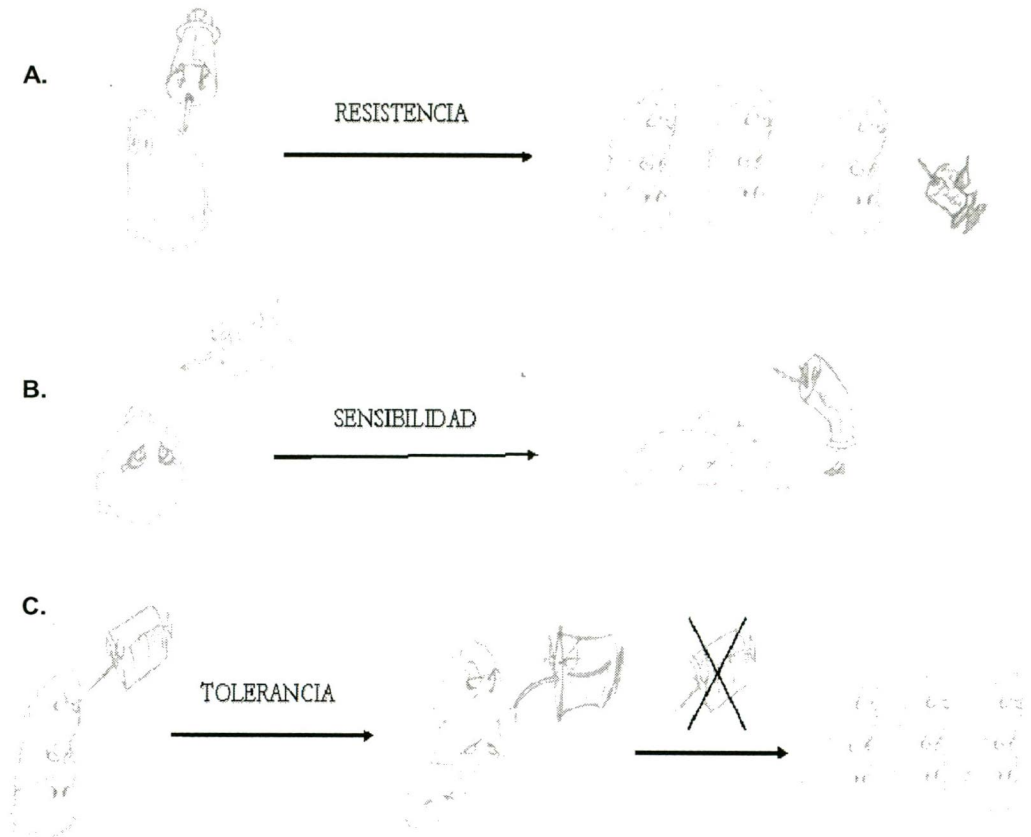


Fig. 4 Representación esquemática de diferencias del comportamiento de *S. pneumoniae* frente al antibiótico. A) Resistencia; crecimiento de la bacteria en presencia del antibiótico, B) Sensibilidad; muerte de la bacteria en presencia del antibiótico y C) Tolerancia; supervivencia de la bacteria en presencia del antibiótico, recuperando su capacidad de crecimiento una vez que este es eliminado.

Este esquema fue diseñado por la Ingeniera en Informática Viridiana López C.

La tolerancia es un fenómeno que se estudia con antibióticos de tipo líticos, como lo son la penicilina y vancomicina (Normark y col. 2001). Es un mecanismo, en el que la bacteria puede escapar de un antibiótico bactericida. Sin embargo, en pruebas de laboratorio como la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), donde se define si una cepa es sensible o resistente retándola contra el antibiótico, una cepa tolerante da resultados de sensibilidad (Normark y col. 2001), dando lugar a la no identificación de SPVT, por ende a una posible falla al tratamiento. En un estudio en la clínica en Memphis Tennessee donde fueron analizados casos clínicos de meningitis se observó una posible asociación a la tolerancia con un efecto negativo a la supervivencia (Rodríguez y col. 2004).

1.1.2.- Vancomicina

La vancomicina es un antibiótico que se utiliza fundamentalmente en el tratamiento de sepsis graves por microorganismos aerobios gram positivos, este difunde muy bien hacia distintos líquidos corporales, inclusive a meninges inflamadas, alcanzando altas concentraciones en líquido cefalorraquídeo. Su uso se inicio en 1956 para el tratamiento de sepsis causada por *S. aureus*; debido a los efectos colaterales que causa, entre los cuales destacan la flebitis, daño renal, daño auditivo, síndrome del "hombre rojo", síndrome de dolor y espasmo, hipotensión arterial, facilidad de infección nosocomial por *Candida* y hepatotoxicidad, por lo que al disponer de antibióticos menos tóxicos, su uso fue relegado a un segundo plano, y ahora se ha retomado debido a la aparición de cepas multirresistentes (Gundian y col. 1998).

A partir de 1980 el uso de la vancomicina se incrementó, atribuyendo por ello la aparición de cepas resistentes en *Enterococcus* y casos aislados en *S. aureus* (Levide y col. 2008), en estos casos el tratamiento con vancomicina es empleado

con terapia triple; de vancomicina, rifampicina y cotrimoxazol (Hiramatsu y col, 2001).

1.1.2.1- Mecanismo de Acción

La vancomicina pertenece al grupo de los glucopéptidos, su acción bactericida es a nivel de pared celular. De manera normal la célula lleva a cabo la síntesis de la pared celular en la membrana, sintetizando ahí los precursores de los peptidoglicados, específicamente en D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala) los cuales dan origen a la pared celular a través de una transglicolación y una transpeptidación [figura 5 A]. La vancomicina se une a los precursores de D-ala-D-ala [figura 5 B], inhibiendo de esta forma la transglicolación y transpeptidación [figura 5 C] y generando alteraciones en la permeabilidad de la pared al inhibir su síntesis, dando pie a una lisis celular (Fraimow y col. 2000).

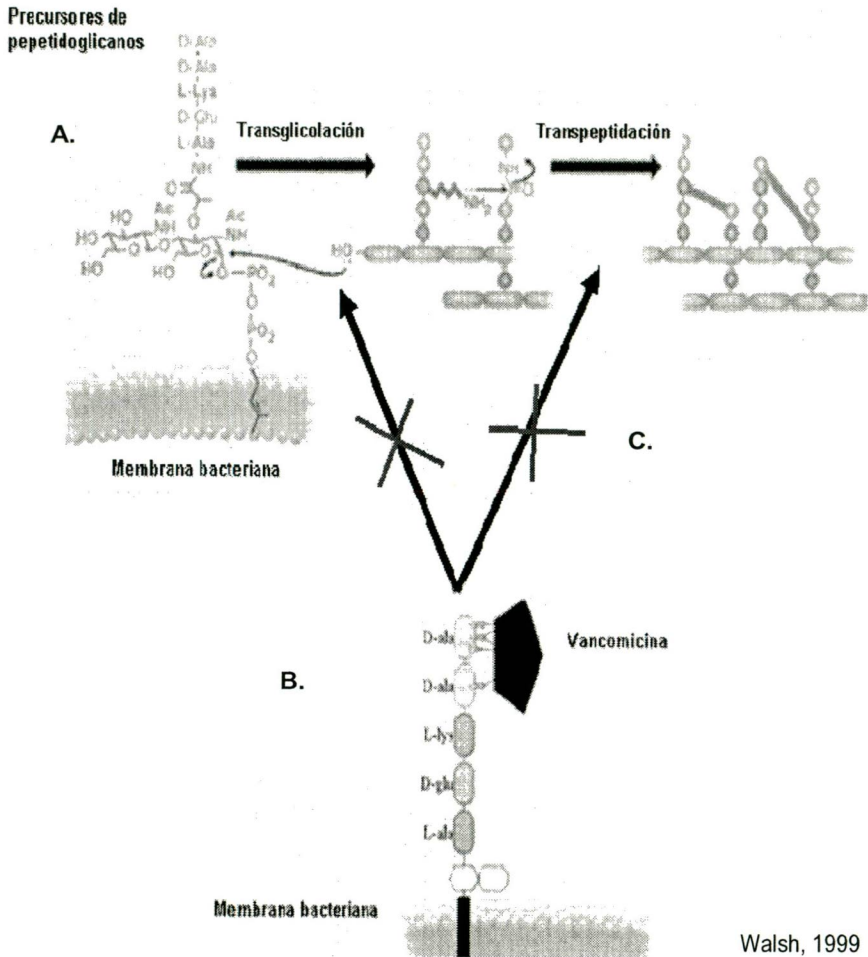


Figura 5. Mecanismo de acción de la vancomicina. A) Síntesis normal de la pared celular a partir de precursores de peptidoglicanos, los cuales son unidos por transglicolación y transpeptidación, B) unión de la vancomicina a los precursores de peptidoglicanos y C) inhibición de transglicolación y transpeptidación

1.1.3.- Antecedentes de la tolerancia y resistencia a vancomicina en cocos gram positivos

La resistencia a β -lactámicos como la penicilina, representa un problema importante en el tratamiento de infecciones neumocócicas. La resistencia a penicilina en cepas de *S. pneumoniae* aisladas de muestras clínicas llega a ser hasta del 50%, El incremento de resistencia, hace que sea más difícil combatir infecciones generadas por *S. pneumoniae*, incluso en un país como Suecia; donde la frecuencia de resistencia a penicilina es aun baja con valores del 3% al 4% (Normark y col. 2001). La resistencia elevada a penicilina, ha destituido a este antibiótico como el de primera elección para el tratamiento de infecciones neumocócicas (Normark y col. 2001).

En México se ha reportado una resistencia a penicilina del 27.8% en meningitis y 18.1% en no meningitis (Echaniz y col. 2003), aunado a la emergencia de cepas con resistencia múltiple a los antibióticos de primera elección, se dificulta aun mas el tratamiento. Lo anterior ha dejado a la vancomicina como una de las últimas opciones de tratamiento, aumentando su manejo en infecciones causadas por neumococos multirresistentes (Hass y col. 2004). En la actualidad, a nivel mundial no se han reportado cepas resistentes a vancomicina; sin embargo, han emergido cepas de *S. pneumoniae* tolerantes a vancomicina (SPVT) (Rodríguez y col. 2004).

El porcentaje de cepas de SPTV puede variar dependiendo de las características de la población como; edad, sitio de aislamiento del paciente del cual fue aislada la cepa, y el grado de invasión de la bacteria en el paciente (Mitchell y col. 2001).

La posible emergencia de SPVT es monitoreada en países como España, debido al alto porcentaje de resistencia a penicilina y el uso frecuente de vancomicina. La tolerancia a vancomicina a su vez se relaciona con la resistencia a diversos antibióticos, como son; β -lactámicos, sulfonamidas y eritromicina (Hass y

col. 2004); Asimismo se ha observado mayor relación con los serotipos 9V, 14 y 23F, siendo el primero el de mayor frecuencia (Fernebroy col. 2004).

El tratamiento con vancomicina es una alternativa para procesos infecciosos asociados a cocos gram positivos como: *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp y *Enterococcus* sp; sin embargo, son cada vez más los reportes de cepas tolerantes a este antibiótico. En el caso de los Enterococos, existen reportes de cepas resistentes a vancomicina, en los que se ha identificado a los genes *van A*, *B* y *C* como los responsables de este mecanismo (Murria y col. 1997). Por su parte en aislamientos de *Staphylococcus aureus* se han reportado cepas resistentes, sin conocer hasta el momento el mecanismo (Tiwari y col. 2006), se proponen que pudiera existir un aumento en la cantidad de peptidoglicanos, dando como resultado un engrosamiento de la pared, al formarse de 30 a 40 capas más de peptidoglicana en la pared celular, donde las moléculas de vancomicina son atrapadas entre las capas de peptidoglicano evitando que alcance la membrana citoplasmática, lugar donde ocurre la síntesis de las peptidoglicanos, impidiendo así su acción bactericida (Hiramatsu, 2001).

1.1.4.- Ciclo de Crecimiento Bacteriano

La célula bacteriana sigue un ciclo de crecimiento en el que se tienen diferentes fases, en un cultivo bacteriano en medio líquido, se pueden diferenciar 4 fases de crecimiento [figura 6]:

Fase lag o de adaptación; durante la cual los microorganismos adaptan su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales (de nutrientes) para poder iniciar su crecimiento exponencial.

Fase exponencial o logarítmica; en esta fase la velocidad de crecimiento es máxima y el tiempo de generación mínimo, las bacterias consumen los nutrientes del medio a velocidad máxima.

Fase estacionaria; en ella no se incrementa el número de bacterias, se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que

pueden tener importancia en el curso de infecciones o intoxicaciones producidas por bacterias.

Los microorganismos entran en fase estacionaria, por que se agota algún nutriente esencial del medio, o por que los productos de desecho que han liberado durante la fase de crecimiento exponencial hacen que el medio sea inadecuado para el crecimiento microbiano o por la presencia de competidores u otras células que limiten su crecimiento.

Fase de muerte; se produce una reducción del número de bacterias viables del cultivo, cuando estas pierden su capacidad de dividirse (Koneman y col. 1999).

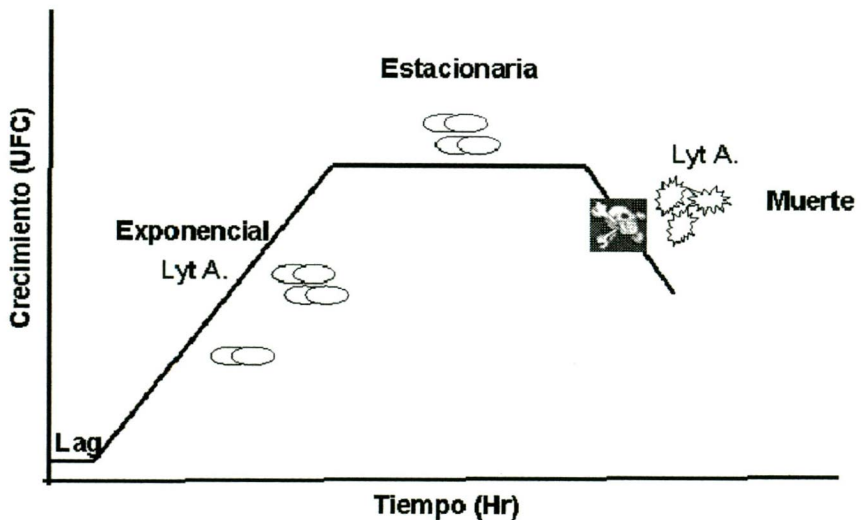


Fig. 6 Curva de crecimiento bacteriano, con sus diferentes fases de crecimiento; fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

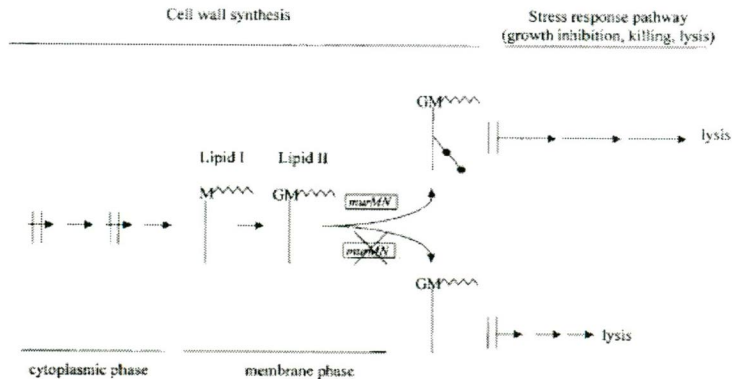
1.2.- ESTADO DEL ARTE

El primer reporte clínico de una cepa SPVT corresponde a un aislamiento clínico de líquido cefalorraquídeo (LCR) en un caso de meningitis de una paciente de 10 meses de edad. Esta cepa actualmente se emplea como referencia (cepa tolerante), en ensayos de tolerancia y lleva el nombre de la ciudad donde se identificó: Tupelo. La historia clínica de la paciente indica que presentó cuadros recurrentes de meningitis, a pesar de que fue tratada 8 días con vancomicina y 10 días con cefalosporina de tercera generación, por lo tanto se atribuyó la falla al tratamiento con la presencia de tolerancia, además de que la tolerancia pudiera ser un precursor al desarrollo de resistencia antimicrobiana, ya que incrementa la supervivencia en la terapia con antibiótico (McCullers y col. 2000).

En *S. pneumoniae* se desconoce el mecanismo de tolerancia, el cual pudiera ser causado por más de una alteración en diversos eventos celulares. Estudios realizados sobre genes que codifican para la síntesis de la pared celular han identificado genes involucrados en la prevención de lisis por inhibidores de la misma. En microarreglos de cDNA, donde retaron las cepas T4 y Tupelo (cepas tolerantes), con altas concentraciones de antibiótico por un corto tiempo, detectaron que la vancomicina afectó la expresión de 175 genes, incluyendo genes que codifican para transportadores y enzimas involucradas en el metabolismo de aminoazúcares, encontrando una diferencia significativa en la expresión de 3 regulones; *TCS03*, *TCS11* y *CiaRH*, el primero de ellos con significativa similitud a *VraSR* (sistema dual regulador sobrerregulado en respuesta al tratamiento con vancomicina y otros inhibidores de la pared celular en *S. aureus*). Por su parte, el regulon *CiaRH* juega un papel importante en la lisis del aislamiento T4 pero no para la cepa Tupelo (Haas y col. 2005).

El sistema *CiaRH*, ha sido estudiado de manera particular, observando que es necesario para prevención de lisis generada por inhibidores de pared celular (Mascher y col. en 2006).

Un operon también implicado en síntesis de pared celular es el operon *MurMN*, que codifica enzimas involucradas en la síntesis de estructuras ramificadas de muropéptidos en peptidoglicanos del pneumococo. Estas enzimas se han relacionados con fenómenos de resistencia y tolerancia, lo anterior se observó al realizar una inserción al operon *MurMN*, lo que genero una perdida completa de resistencia a penicilina (Cafini y col. 2006). La resistencia a penicilina se relaciona con tolerancia a vancomicina, debido a que ambos antibióticos son de tipo lítico que inhiben la síntesis de pared celular. En este estudio se suprimieron al gen *murM*, generando un incremento en sensibilidad de la bacteria a inhibidores de pared celular, como se muestra en la figura 7 donde se esquematiza el modelo propuesto donde el operon *MurMN*, regula el estrés propiciado a la célula (Filipe y col. 2002).



Filipe y col. 2002

Figura 7. Modelo propuesto de la función del operon *MurMN* bajo stress

1.3.- ANTECEDENTES PARTICULARES DEL PROYECTO

En 1970 Alexander Tomasz fue el primero en reportar y observar el fenómeno de tolerancia, en penicilina (Benriquez y col. 2002). La cual era uno de los antibióticos de primera elección, sin embargo el progresivo aumento en la frecuencia de *S. pneumoniae* resistentes a penicilina y otros antibióticos ha suscitado dudas en torno a las practicas terapéuticas tradicionales (Hortal y col. 2000), dando lugar al uso de otros antibióticos, como la vancomicina que actualmente es uno de los antibióticos de última elección para el tratamiento de enfermedades graves como la meningitis y en infecciones donde se aíslan cepas multiresistentes (Haas y col. 2004).

SPVT ha sido asociado a una mayor mortandad en pacientes con infecciones graves; al observarse que en el 30% de casos donde es asilado un SPVT y hubo deceso del paciente (Novak y col. 1999). También se ha observado una posible asociación a la tolerancia con un efecto negativo a la supervivencia, en casos clínicos de meningitis (Rodríguez y col. 2004).

En un estudio realizado en Tennessee y Georgia, se aislaron 8/215 (3.7%), de cepas SPVT de nasofaríngeos y 12/113 (10.6%) de meningitis (Rodríguez y col. 2001). Por otro lado en Corea se detectaron 2/188 (1.1%) de cepas SPVT; siendo el primero en encontrar el primer aislamiento con déficit en autolisinas (Heungsup y col en 2006). En España no se han detectado ninguna cepa SPVT; sin embargo, dado el alto porcentaje de resistencia que presenta *S. pneumoniae* en este país y el uso frecuente a vancomicina, puso en alerta a los investigadores por lo que continúa el estudio epidemiológico para monitorear la posible aparición de cepas tolerantes (Ortega y col. 2003).

El mecanismo de tolerancia ha sido estudiado en diversos microorganismos cocos gram-positivos, como en *S. aureus* en donde se ha

sugerido fallas en la regulación del sistema de autolisinas o modificaciones en la composición de la pared celular (Bourgeois y col. 2007).

Los antibióticos líticos como penicilina y vancomicina no matan directamente a *S. pneumoniae*, sino que encienden una señal de inicio que se traduce en la activación de un proceso endógeno de muerte, generando la activación de la cascada de lisis, mediada por activación de la proteína LytA, una murein hidrolasa (enzima extracelular) (Hass y col. 2004, Fernero y col. 2004, Lauren y col. 2001). En la bacteria que presenta tolerancia, existe una autólisis defectuosa o un defecto en la cascada de señales de la transducción que activa las autolisinas (Fernero y col. 2004).

Lyt A es una enzima que de manera normal tiene la célula, esta involucrada durante la división celular para romper la pared y dar origen a dos células hijas o bien dar paso a la muerte por lisis celular [Figura 8], asimismo esta enzima es considerada la mayor autolisina del *S. pneumoniae* (Velasco y col. 1995).

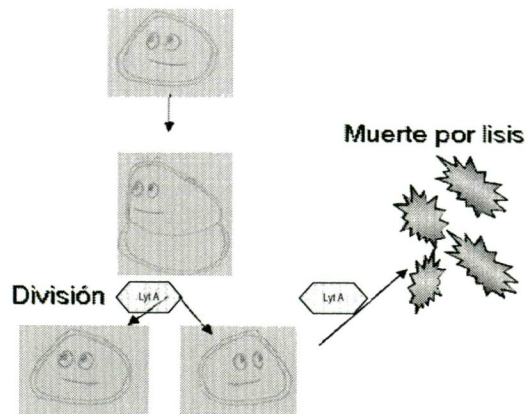


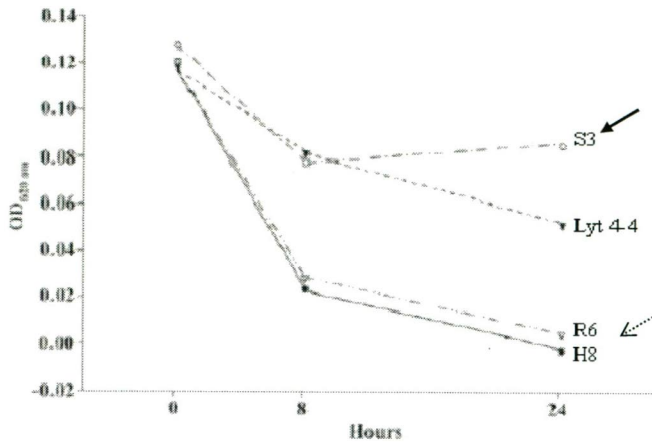
Fig 8 Fases de división celular y muerte de la bacteria, en las cuales esta involucrada Lyt A

Este esquema fue diseñado por la Ingeniera en Informática Viridiana López C.

El mecanismo propuesto para el funcionamiento de las proteínas para iniciar la autólisis es generada por la vía “*quórum sensing*”. (Hass y col. 2004).

La funcionalidad de Lyt A fue analizada en cepas SPVT, dado que esta enzima es la responsable de lisis celular; sin embargo, solo existe un reporte con déficit de Lyt A. La cepa fue aislada de un paciente de 91 años de edad. El experimento que Sung y col realizaron para evidenciar la disfuncionalidad de Lyt A, fue basándose en la capacidad de *S. pneumoniae* de adquirir DNA exógeno, los autores lograron recuperar la funcionalidad de actividad autolítica del aislamiento tolerante por reconstitución de la cepa Lyt 4-4 (Sung y col. 2006); a la cepa de *S. pneumoniae* llamada Lyt 4-4 le fue deletado el gen que codifica para la amidasa y es empleada como control positivo en evaluación de la tolerancia (Diaz y col. 1991).

Al determinar la lisis inducida con penicilina en cultivos de Lyt 4-4, a los que se adicionó extractos celulares de las cepas tolerantes S3, H8 ó Lyt 4-4, se observaron que con el extracto de la cepa H8, Lyt 4-4 se recupera la capacidad de lisis frente a la penicilina, alcanzando valores semejantes a la cepa control R6 (cepa tolerante). Por el contrario la cepa S3 no genera ninguna recuperación de lisis [figura 9], evidenciando así que esta cepa efectivamente tiene un déficit de Lyt A (Sung y col. 2006).



Sung y col. 2006

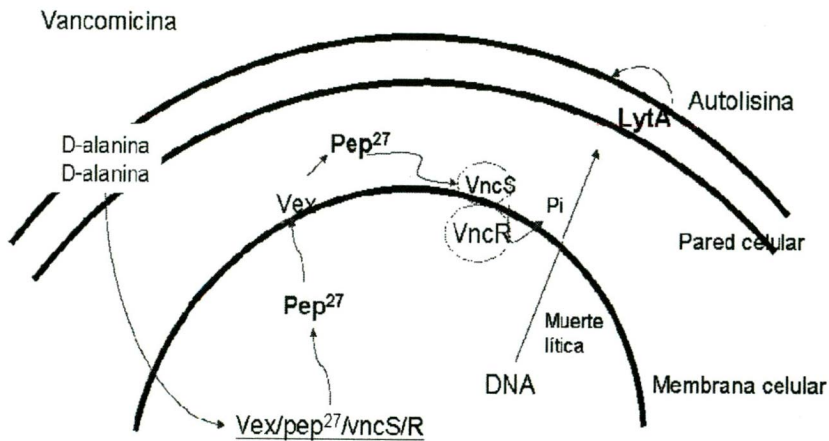
Fig. 9 Ensayo de funcionalidad de actividad autolítica de SPVT. Recuperación de capacidad lítica de la cepa H8 (flecha discontinua), no hubo recuperación de capacidad lítica (flecha continua) ○ S3, ▽ Lyt 4-4, △ R6, ● H8

Dado que sólo existe un reporte con déficit de Lyt A, los investigadores se han dado a la tarea de investigar sobre los diferentes mecanismos por los cuales pudiera no ser activada Lyt A, y por ende generar una lisis defectuosa dando como resultado una cepa tolerante (Lauren y col. 2001).

Se han reportado mutaciones en los genes relacionados con la activación de las proteínas involucradas en la cascada de lisis de cepas tolerantes (Lauren y col. 2001). Se ha implicado al locus conocido como *vex123-pep27-vncR/S*, dicho locus consiste en una proteína de transporte proximal de la superfamilia ABC, un péptido señal hipotético, un sistema dual regulador de histidina-cinasa que actúa como un sensor de señal externo y un regulador mediador de cambios en la expresión del gen. El modelo a seguir para la activación de Lyt A por la vancomicina (Hass y col. 2004), sugiere que esta inhibe la síntesis de pared celular al unirse a precursores de peptidoglicanos D-alanina D-alanina, y residuos de estos

son reconocidos por algún mecanismo aun no descrito que enciende la señal de activación de la cascada [Figura 10].

El locus *vex123-pep27-vncR/S*, es el encargado de codificar lo necesario para la activación de la lisis celular de *S. pneumoniae*, por lo que diferentes investigadores se han dado a la tarea de identificar si existe una mutación que sea constante en las cepas SPVT (Lauren y col. 2001).



Lauren mithell and tuomanen, 2001

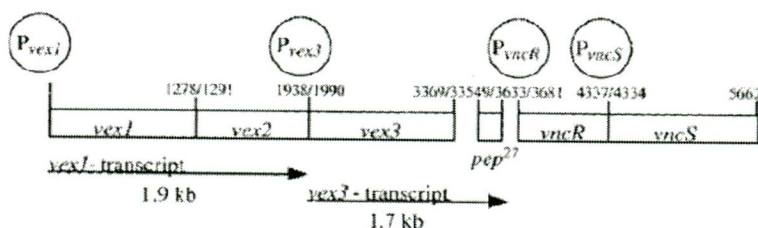
Figura 10. Modelo de activación de Lyt A

Los experimentos realizados *in vitro* sugieren que algunas de estas proteínas generadas a través de la transcripción de estos genes, determinan la vulnerabilidad de la bacteria a los antibióticos. De esta manera, este gen es responsable de desencadenar un proceso de apoptosis o destrucción celular; sin embargo, la

mutación bloquea este proceso de suicidio celular y permite a la bacteria sobrevivir incluso en la presencia de la propia vancomicina (Lauren y col. 2001).

Otro posible mecanismo es la no detección de los excesos de residuos de D-alanina D-alanina, y por tanto no hay activación del locus. Lo anterior comienza por la síntesis de Pep27, también conocido como el péptido de la muerte. Este péptido puede iniciar la cascada de activación para la lisis celular activando finalmente a Lyt A (Novak y col. 2000).

La orientación genética del locus esta conformada por un sistema de dos componentes; los genes *vncR* y *vncS*, *pep27* es un gen codificado en un marco de lectura abierto de 84pb, donde están codificados 3 genes: *vex1*, *vex2* y *vex3* [figura 11], que codifican para un hipotético transportador tipo ABC (cassette enlazante de ATP) con dominios heterodímeros transmembranales (TMDs); *vex1* y *vex3* codifican para proteínas hipotéticas transmembranales hidrofóbicas, cada una con 4 TMDs, y *vex2* codifica para el cassette enlazante de ATP, este media el transporte de una diversidad de sustratos incluyendo iones, azúcares y péptidos. (Novak y col. 2000).



Novak y col, 2000

Fig 11. Organización genética del locus *vex123-pep27-vncR/S* de *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.1.- Pep 27

Pep 27 es un péptido lineal de 27 aminoácidos que censa la señal para el inicio de la muerte celular, regulando la actividad de las autolisinas, de tal forma que pudiera ser este un buen marcador para identificar a una cepa tolerante (Novak y col. 2000).

La transcripción de *pep27* da como resultado un péptido de 3 kDa (MRKEFHNVLSSGQLLADKRPARDYNRK), el cual se puede encontrar en medio de cultivo en el sobrenadante, así como en el citoplasma del neumococo (Novak y col. 2000).

Experimentos realizados con la cepa Lyt-4-4 a la cual le fue adicionado Pep27 sintético de manera exógena, han permitido evidenciar que este péptido es capaz de desencadenar diferentes mecanismos que lleva a la bacteria a la muerte, mediante la observación de la formación de cadenas largas de 20 a 30 neumococos, en el crecimiento de la Lyt-4-4 en ausencia del pep27 comparando con la no adición del péptido en un experimento con las mismas condiciones en donde se observan cadenas cortas. (Novak y col. 2000).

1.3.2.- Criterio de Liu y Tomaz para determinación de Tolerancia

La tolerancia según los criterios de Hans H. Liu y Alexander Tomaz (1985), establecen que: 1) Se debe analizar la lisis celular frente al antibiótico, tomando en cuenta que este es de tipo lítico (vancomicina); en este paso se determina si la cepa presenta lisis negativa, moderada o rápida. Asimismo, se evidencia de forma indirecta como actúa Lyt A frente al antibiótico. 2) Se realiza la siembra en placa a las 4 horas de haberlas puesto en contacto con el antibiótico, de aquellas que fueron lisis negativas y moderadas, evidenciando así el hecho de que las cepas tolerantes se recuperan cuando el antibiótico es retirado, proliferando nuevamente. (Rodríguez y col. 2004).

1.4.- IMPORTANCIA DEL CONTINUAR EL ESTUDIO DEL TEMA

La tolerancia es un fenómeno que se ha relacionado frecuentemente a recaída de la enfermedad después del tratamiento. Algunos investigadores sugieren que la tolerancia a vancomicina puede ser un antecedente del desarrollo de resistencia, por lo que es de suma importancia su estudio (McCuller y col. 2000). Este fenómeno, implica la persistencia del microorganismo en el paciente, sin necesidad de llegar a ser resistente (Mc Culler y col. 1999).

La identificación de posibles marcadores moleculares en cepas tolerantes ayudaría en gran medida a una pronta identificación y corrección de la terapia empleada en estos pacientes, Asimismo, permitirá comprender los mecanismos por los cuales ha adquirido esta capacidad y poder desarrollar e implementar en un futuro nuevas alternativas terapéuticas contra este microorganismo.

Finalmente estudios epidemiológicos, que nos permitirán establecer la relevancia clínica que pueden tener los aislamientos de SPVT, así como el saber si estas cepas están diseminando a mayor uso del antibiótico en nuestra población, lo cual sería alarmante dado que la vancomicina es uno de los antibióticos de ultima elección en el tratamiento de infecciones graves.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Pep 27 es un péptido necesario en división y en muerte celular; por lo que en cepas de *Streptococcus pneumoniae* tolerantes a vancomicina no habrá expresión del gen *pep27* que inicia la señal de lisis.

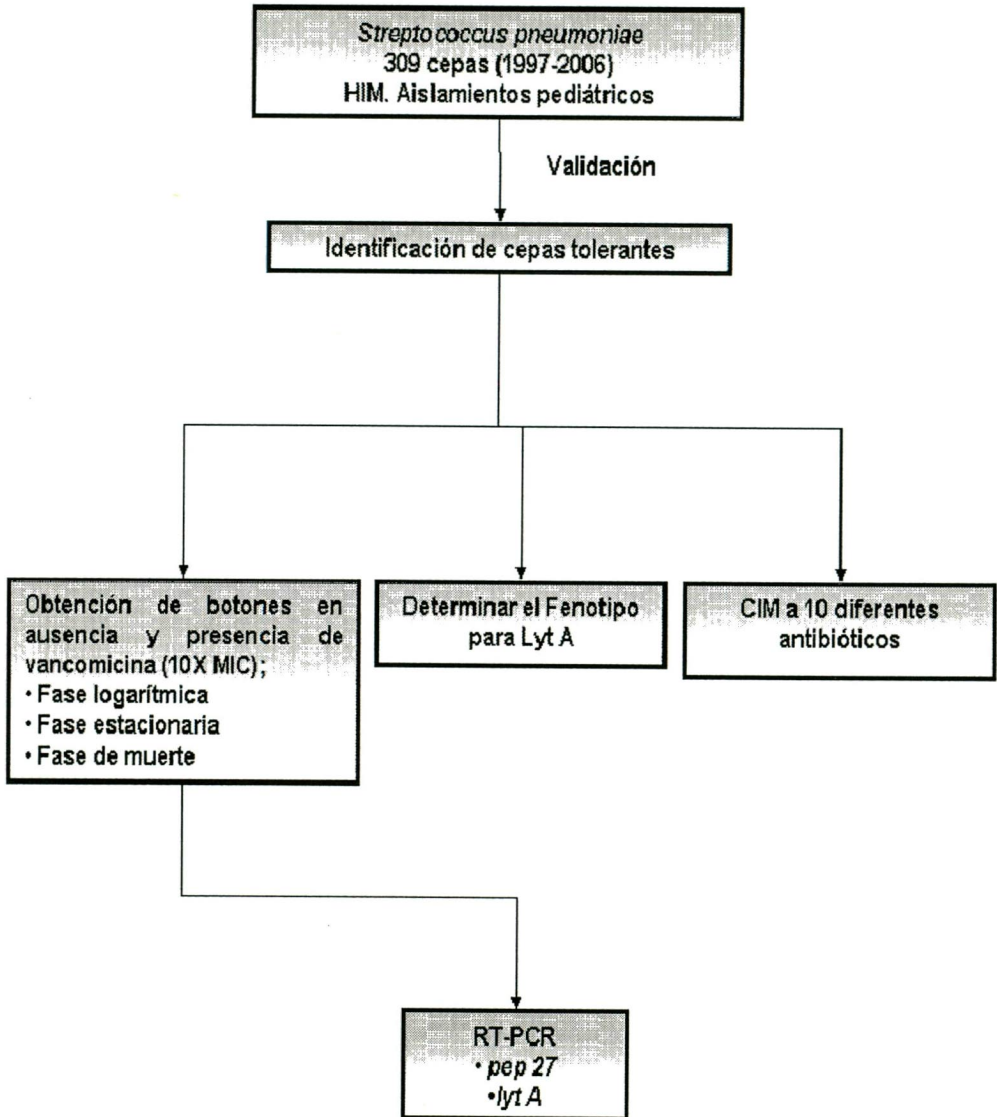
➤ OBJETIVO GENERAL

- Analizar la expresión del gen *pep 27* en *Streptococcus pneumoniae* tolerantes a vancomicina.

➤ OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar aislamientos clínicos de *S. pneumoniae* tolerantes a vancomicina
2. Evaluar la expresión del transcrito *pep 27* y *lyt A* en cepas de SPTV, en presencia y ausencia de vancomicina.

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



4. METODOLOGIA

4.1.- DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio descriptivo transversal, con 309 cepas de *S. pneumoniae* aisladas de niños de 0 a 5 años, con alguna enfermedad estreptocócica (invasora o no invasora), durante el periodo comprendido entre 1997 y 2006 en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Los aislamientos se almacenaron a -70° C hasta su uso, por lo que fueron descongelados y validados. Como cepas de referencia se emplearon las siguientes cepas control de *S. pneumoniae*; ATCC 49619 (cepa control según la CLSI) y R6 (cepa no tolerante).

4.2.- VALIDACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

Se realizó mediante técnicas bacteriológicas convencionales como son: morfología colonial y microscópica, prueba de catalasa (que debe ser negativa), sensibilidad a la optoquina positiva (Taxo P), prueba de conglutinación positiva (Phadebac).

4.3.- CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)

A todas las cepas de *S. pneumoniae* se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) a vancomicina, y a las cepas que presentaron el fenómeno de tolerancia adicionalmente se les determinó la CIM a Ceftriazona, Cefepime, Meropenem, Rinfampicina, Eritromicina, Trimetropin con Sulfamethoxazol, Clindamicina, Linezolid y Penicilina, cada uno de los cuales forma parte del esquema habitual de tratamiento para infecciones neumocócicas y pertenecen a grupos distintos de acuerdo a la CLSI.

Las determinaciones se realizaron utilizando los lineamientos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (por sus siglas en inglés CLSI). Se empleó la cepa de referencia ATCC 49619 como cepa control de la técnica.

4.3.1.- Procedimientos para Dilución en Caldo (Microdilución)

Los antibióticos fueron preparados de acuerdo a la siguiente fórmula;

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volumen (ml)} \times \text{Concentración } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potencia } (\mu\text{g/mg})}$$

- Se prepararon diluciones del antibiótico en cuestión, y se distribuyeron en cada uno de los 96 pozos de una placa de ELISA.
 - Cada placa incluyó un pozo para control de crecimiento y un pozo negativo (sin inocular).
- Se preparó una suspensión directa en solución salina con colonias seleccionadas de cultivos en placa de agar sangre incubadas de 18 a 24 horas. La suspensión se ajustó a la turbidez del patrón 0.5 de McFarland.
- Pequeños volúmenes de caldo de cultivo Mueller-Hinton, fueron distribuidos en microplacas estériles. En cada pozo se depositaron 0.1 mL de caldo con el antibiótico.
- A cada pozo se le adicionó 0.1 mL de una dilución 1:100 del 0.5 de McFarland y se incubó a 37° C con CO₂, de 18 a 24 horas

4.4.- DETECCIÓN DE TOLERANCIA.

La tolerancia fue medida de acuerdo a los criterios de Liu y Tomasz (1985), mediante las siguientes técnicas:

4.4.1.- Lisis bacteriana

A un cultivo bacteriano con una absorbancia inicial de 0.17 a 600nm, (de 10⁶ a 10⁷ UFC/ml) se adicionó 10X la concentración de la CIM a vancomicina, y

posteriormente de midió la absorbancia cada hora durante 4 horas, observando y clasificando a las cepas según la pérdida de absorbancia:

- La **lisis rápida** se definió como la pérdida de >50% de densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) a las 2 horas de incubación.
- La **lisis moderada** se definió como la pérdida de <50% de DO_{600nm} a las 2 horas pero >50% a las 4 horas.
- La **lisis negativa** fue definida como; la pérdida de <50% de DO_{600nm} a las 4 horas.

4.4.2.- Muerte Logarítmica

A los aislamientos que tuvieron una lisis moderada o lisis negativa, se les determinó la viabilidad a las 4 horas después de agregar el antibiótico.

La tolerancia fue evaluada a partir de los valores obtenidos con la cepa de referencia R6 bajo los siguientes criterios;

- **Tolerancia moderada** una muerte logarítmica que decrece >2 DE (Desviación Estándar) por debajo de la cepa de referencia R6 (<1.53)
- **Alta tolerancia**, con una muerte logarítmica que decrece por >3 DE debajo del aislamiento de referencia R6 (<1.13).

Muerte logarítmica de la cepa de referencia R6: 3.9+/-0.5,UFC/mL

4.5.- DETERMINACIÓN DEL FENOTIPO LYT (DOC).

La determinación del fenotipo fue realizado según la técnica planteada por **Obregón y col. (2002)**. A 0.5 ml de suspensión bacteriana con crecimiento exponencial se le adicionaron 50 μ L de solución reguladora de fosfato (pH 8.0), 50 μ L de una solución de desoxicolato de sodio (Doc 10%), se incubó 15 min a 37°C, y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600_{nm}.

Los resultados fueron interpretados de la siguiente manera:

Cuando la turbidez de la suspensión bacteriana disminuye más de 50% del valor inicial las cepas son designadas *Lyt*⁺, lo cual significa que las cepas de neumococos se autolisan en fase estacionaria por la técnica de DOC.

4.6.- CURVA DE CRECIMIENTO

Se planteo la siguiente estrategia para la determinación de las curvas de crecimiento para establecer los tiempos de las diferentes fases de crecimiento; fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte;

En medio de cultivo Todd-Hewit caldo, enriquecido con extracto de levadura al 1%, se incubaron a 37 °C con una atmósfera del 5% de CO₂, realizando lecturas cada hora a una longitud de onda de 600nm.

4.7.- RT-PCR de los genes *lyt A* y *pep27*,

Se amplificaron los transcritos de *lyt A*, *pep27*, con el kit GeneAmp AccuRT RNA PCR de Applied Biosystems., siguiendo las instrucciones del kit, para lo cual se partió del crecimiento de de las cepas de *S. pneumoniae* tolerantes a vancomicina en las diferentes fases de crecimiento (fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte), tanto en ausencia como en presencia de vancomicina (10X CIM) por 20 min. Como control constitutivo se analizó el 16S.

4.7.1.- Extracción de RNA con Trizol

Las bacterias se lisaron con; mutanolisina 2 mg/mL, lisozima 2 mg/mL y proteinasa K 100 µg/mL, incubando por 30 min a 37°C.

La extracción se realizó con Trizol de GIBCO BRL

- Se adicionó 1 mL de Trizol y se incubó 5 min a temperatura ambiente
- Posteriormente se adicionó 200 µL de cloroformo y se vortexeo 15 minutos, incubando 3 minutos

- Se centrifugó 13,000 rpm por 15 min a 4° C, se separó la fase acuosa, a la cual se le adicionó 500 μ L de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente
- Se realizó una segunda centrifugación a 12,000 rpm 10 minutos a 4° C, y se eliminó el isopropanol, el pellet se lavó con 1 mL de etanol
- Se dejó secar a temperatura ambiente y se disolvió con agua libre de RNasas por 10 minutos a 60° C
- Se midió la concentración en el espectrofotómetro observando integridad del RNA mediante un gel de agarosa

4.7.2.- Tratamiento con DNasa,

Se realizó el tratamiento con DNasa con el reactivo RQ1 RNase-Free DNase de Promega, siguiendo las instrucciones del kit, se realizó una mezcla de reacción, según la concentración del RNA, con un volumen final de 10 μ L; Buffer 1 μ L, 1 μ g de RNA, 1 μ L de DNasa, agua libre de nucleasas para completar el volumen a 10 μ L, esta se incubó por 30 min. a 37° C.

Para detener la reacción se adicionó; 1 μ L de DNasa Stop y se incubó 10 minutos a 65° C

4.7.3.- Transcripción reversa.

Seguendo el procedimiento del kit GeneAmp AccuRT RNA PCR de Applied Biosystems, se preparó una mezcla de reacción para la retrotranscripción del RNA a cDNA con los siguientes reactivos; 5 mM de $MgCl_2$, 2 μ L de 10X PCR Buffer II, 1 mM dGTP, 1 mM dCTP, 1 mM dATP, 1 mM dTTP, 1 μ L Inhibidor de RNasa (1U/ μ L), 1 μ L Retrotranscriptasa Reversa (2.5U/ μ L), 2.5 μ M Random Hexamers, y se incubó 10 minutos a 37° C, seguido de las siguientes condiciones para la extensión para el cDNA ; 42°C/ 15 min, 99°C /5 min y 5° C/ 5 min, en un termociclador (Termo Hybaid PCR Express).

4.7.4.- Condiciones para la reacción de PCR

Se preparó la mezcla de reacción para PCR con los siguientes reactivos; 2 mM MgCl₂, 8 µL 10X PCR Buffer II, 0.5 µL Taq DNA Polymerasa (2.5 U/µL), agua libre de nucleasas, se dispensó 78 µL de la mezcla de reacción para PCR en cada tubo de transcripción reversa y se dispensó el oligonucleotido correspondiente a cada mezcla de reacción.

GEN	OLIGONUCLEOTIDOS		TAMAÑO	REFERENCIA	CONDICIONES	CICLOS
	NOMBRE	SECUENCIA				
16S	<i>spn16s f</i>	ggctacacacgtgctacaatgg	218 pb	Ha-Sheng y col. 2007	94°/5 min.	20
	<i>spn16s r</i>	cgacttcgggtgtacaaactctc				
lyt A	<i>lyta1</i>	gtcggcgtgcaaccatataggcaa	413 pb	Daniel Llull y col. 2006	94°/1 min.	35
	<i>lyta2</i>	ggataagggtcaacgltgtctgag			55°/1 min.	
pep27	<i>pep27 (1)</i>	atgagaaaggaattcacaacg	172 pb	En este trabajo	72°/1 min.	45
	<i>pep27 (2)</i>	tcacggatcatctcttcac			72°/5 min.	

La mezcla de reacción se les da las siguientes condiciones de amplificación para la PCR; 94°/5 min. 94°/1 min. 55°/1 min. 72°/1 min. 72°/5 min., en un termociclador (Termo Hybaid PCR Express).

4.7.5.- Electroforesis y análisis Densitométrico

Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2%, para comparar de manera cualitativa, mediante densitometría los niveles de expresión de los genes, con el programa Quantity One-4.1.1 de Bio Rad

4.7.6. Análisis Estadístico

Los resultados densitométricos de las RT-PCR se analizaron estadísticamente con ayuda del programa SPSS (Statistic Package for the Social Sciences), mediante pruebas no paramétricas; prueba de Wilcoxon para dos variables y la prueba de Friedman para comparación de mas de 2 variables

5. RESULTADOS

Se trabajaron con 309 cepas de *S. pneumoniae* aisladas de pacientes pediátricos (no mayor de 15 años) con alguna enfermedad neumocócica durante el periodo comprendido entre 1997- 2006 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG). Las cepas fueron obtenidas de diferentes sitios de aislamiento teniendo un total de 126 cepas de origen invasor (sitios estériles) y 183 no invasoras (sitios no estériles) [tabla 1], las cuales demostraron ser *S. pneumoniae* por las pruebas de validación realizadas.

Tabla 1. **Sitios de aislamientos de *S. pneumoniae*.** Cepas del HIMFG aisladas durante el periodo de 1997 a 2006, de procesos invasores y no invasores (celdas sombreadas).

ORIGEN	NUMERO DE CEPAS N = 309
LCR	55
HEMO	71
LIQUIDO PLEURAL	19
ABSESOS	5
BRONCOASPIRADO	47
DERRAME	6
ORINA	7
SECRECIÓN (ÓTICO/OCULAR/NARINA)	64
SECRECIONES	14
OTROS	21

5.1.- CIM a vancomicina. Todas las cepas (309 aislamientos) presentaron sensibilidad a vancomicina mediante la prueba de CIM, según la CLSI, por el método de microdilución.

5.2.- Frecuencia de SPTV. Fue identificado el fenómeno de tolerancia de los 309 aislamientos, de los cuales; 11 (3.6%) presentaron tolerancia a vancomicina, 4 de ellas fueron aislamientos de sitios estériles y 7 de sitios no estériles, 6 fueron altamente tolerantes, con valores ≤ 1.13 de muerte logarítmica y 5 moderadamente tolerantes con valores ≤ 1.53 de muerte logarítmica con respecto a la cepas de referencia R6 [tabla 2].

Tabla 2. *S. pneumoniae* tolerantes a vancomicina de 1997 al 2006. Clasificación de la tolerancia, origen de la muestra y serotipo.

CEPA	SEROTIPO	ORIGEN	TOLERANCIA R6
35	7F	Sangre	<i>Altamente tolerante</i>
36	23F	LCR	<i>Altamente tolerante</i>
43	23F	Otitis media	<i>Altamente tolerante</i>
55	28F	Otitis media	<i>Moderadamente tolerantes</i>
69	23F	LCR	<i>Moderadamente tolerantes</i>
103	19F	Broncoaspirado	<i>Altamente tolerante</i>
134	15B	Conjuntiva	<i>Altamente tolerante</i>
141	23F	Líquido peritoneal	<i>Altamente tolerante</i>
167	6B	Sangre	<i>Moderadamente tolerantes</i>
173	6B	Empiema	<i>Moderadamente tolerantes</i>
261	6B	Secreción ocular	<i>Moderadamente tolerantes</i>

Los serotipos más frecuentes de las cepas tolerantes fueron; el 23F (4/11) y el 6B (3/11), el resto de las cepas presentaron los serotipos 7F, 28F, 19F y 15F.

Los valores de las pruebas para identificar una cepa tolerante se observan en un diagrama de dispersión, donde se grafican; la lisis y muerte a las 4 horas de adicionar el antibiótico en las cepas tolerantes así como la cepa de referencia R6 (no tolerante), la cual obtuvo una muerte logarítmica de 2.33 ± 0.40 UFC/mL. Las

RESULTADOS

cepas SPVT se agruparon en 2 grupos: a) Las de tolerancia moderada que tuvieron valores <1.53 y b) Las altamente tolerantes con valores <1.13 . De la misma forma se les clasificó en cepas con lisis negativa a las que tienen un decremento de $<50\%$ a las cuatro horas de adicionar el antibiótico y cepas de lisis moderada las que tuvieron una pérdida de $>50\%$. Todas las cepas SPVT a las 2 horas de adicionar el antibiótico presentaron un decremento $<50\%$, por su parte la cepa de referencia R6 tuvo valores de lisis rápida con un decremento del 92.17% [figura 12].

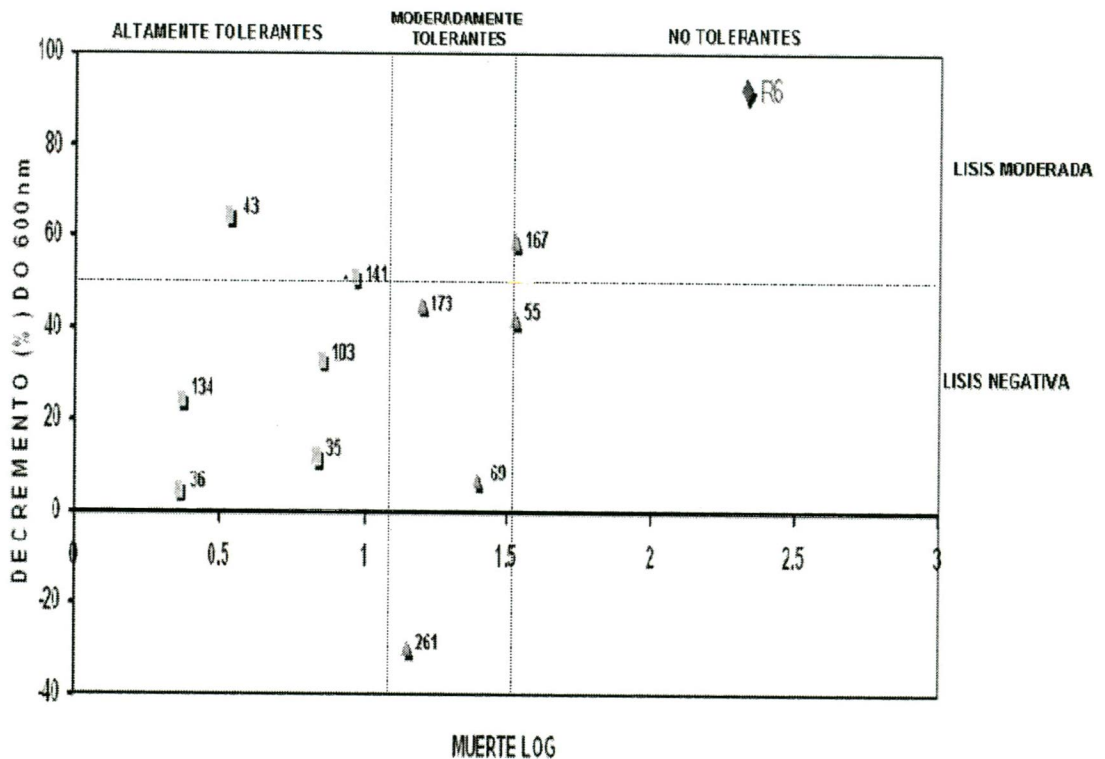


Figura 12. Diagrama de dispersión de cepas SPVT. Clasificación de las cepas tolerantes en función a la muerte logarítmica y su decremento de densidad óptica:

Moderadamente Tolerantes, Altamente Tolerantes, ♦ R6

5.3.- Fenotipo Lyt A. En la determinación del fenotipo se adiciono a las cepas SPVT una solución al 10% de DOC y a los 15 min se midió el decremento de la DO, con lo cual se clasificaron las cepas en; Lyt A⁺ con un decremento \geq 50 % (cepas 43, 55, 69, 103, 141, 167 y 173), Lyt A⁻ con un decremento \leq 50 % (cepa 261) y lisis parcial aquellas cuyos valores estuvieron muy cercanos al 50 % (cepas 35, 36 y 134 con 47%, 46% y 54% respectivamente) [tabla 3].

Tabla 3. **Fenotipo Lyt A en SPVT.** Clasificación de las cepas tolerantes en función de la lisis frente a DOC (fenotipo Lyt A) y a vancomicina.

CEPA	Lyt A/DOC	LISIS/Vanco
35	Parcial	Negativa
36	Parcial	Negativa
43	Lyt A ⁺	Moderada
55	Lyt A ⁺	Negativa
69	Lyt A ⁺	Negativa
103	Lyt A ⁺	Negativa
134	Parcial	Negativa
141	Lyt A ⁺	Moderada
167	Lyt A ⁺	Moderada
173	Lyt A ⁺	Negativa
261	Lyt A⁻	Negativa

5.4.- Susceptibilidad antibiótica. A las cepas SPVT se les determinó su susceptibilidad a 10 diferentes antibióticos mediante CIM utilizando los criterios del CLSI, la cual indica valores de corte para clasificar a una cepa como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) [tabla 4].

Tabla 4. **Concentración Inhibitoria mínima (CIM) de SPVT.** Susceptibilidad antimicrobiana a 10 diferentes antibióticos de acuerdo a los lineamientos de la CLSI.

ANTIBIOTICO	PUNTOS DE CORTE [$\mu\text{g/mL}$]			RESISTENCIA (%)
	S	I	R	
Penicilina	≤ 0.06	0.12-1	≥ 2	7/11 (64%)
Eritromicina	≤ 0.25	0.5	≥ 1	2/11 (18%)
Trimetropin con Sulfamethoxazol	$\leq 0.5/9.2$	1/19-2/38	$\geq 4/76$	3/11 (27%)
Clindamicina	≤ 0.25	0.5	≥ 1	1/11 (9%)
Ceftriazona	≤ 1	2	≥ 4	0%
Meropenem	≤ 0.25	0.5	≥ 1	0%
Rinfampicina	≤ 1	2	≥ 4	0%
Linezolid	≤ 2	-	-	0%
Cefepime	≤ 1	2	≥ 4	0%
Vancomicina	≤ 1	-	-	0%

Los datos obtenidos de cada una de las pruebas realizadas a las cepas SPVT se resumen en; la cepa 141 fue altamente tolerante, con lisis moderada; y un fenotipo positivo para Lyt A, sin embargo, presentó resistencia a 4 diferentes antibióticos (penicilina, eritromicina, trimetropin-sulfamethoxazol y clindamicina), por su parte la cepa 261 presento un fenotipo negativo para Lyt A [tabla5].

Tabla 5. Clasificación de *S. pneumoniae* vancomicina tolerantes. Clasificación de acuerdo a su tolerancia, resistencia, lisis frente a vancomicina y fenotipo de Lyt A en aislamientos del HIMFG.

CEPA	TOLERANCIA	RESISTENCIA	LISIS/VANCOMICINA	FENOTIPO Lyt A
35	Alta	Sensible	Negativa	Parcial
36	Alta	TMP_SMX	Negativa	Parcial
134	Alta	Pen	Negativa	Parcial
43	Alta	Pen	Moderada	Lyt A ⁺
103	Alta	Pen	Negativa	Lyt A ⁺
141	Alta	Multiresistente	Moderada	Lyt A ⁺
167	Moderada	Pen	Moderada	Lyt A ⁺
55	Moderada	Sensible	Negativa	Lyt A ⁺
69	Moderada	Pen	Negativa	Lyt A ⁺
173	Moderada	Pen, TMP_SMX	Negativa	Lyt A ⁺
261	Moderada	Ery	Negativa	Lyt A

5.5.- Cinética de crecimiento. Se realizaron curvas de crecimiento para identificar el tiempo en el cual se tienen las diferentes fases de desarrollo (fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte) en las cepas tolerantes a vancomicina. [figuras 15 y16].

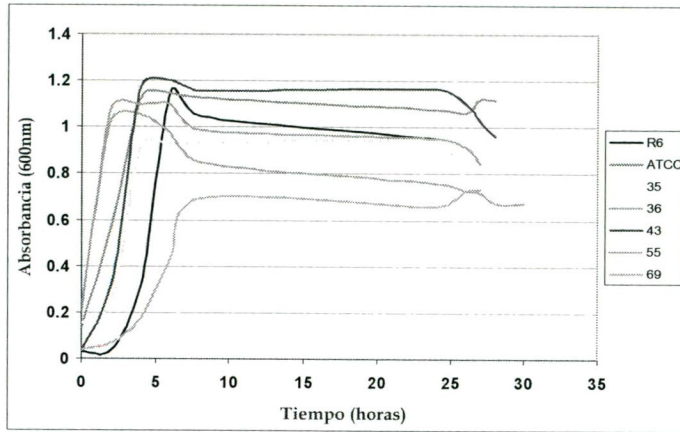


Figura 13. **Cinética de crecimiento de SPTV.** Tiempos establecidos en base a su fase de crecimiento para las cepas; R6, ATCC, 35, 36, 43, 55 y 69.

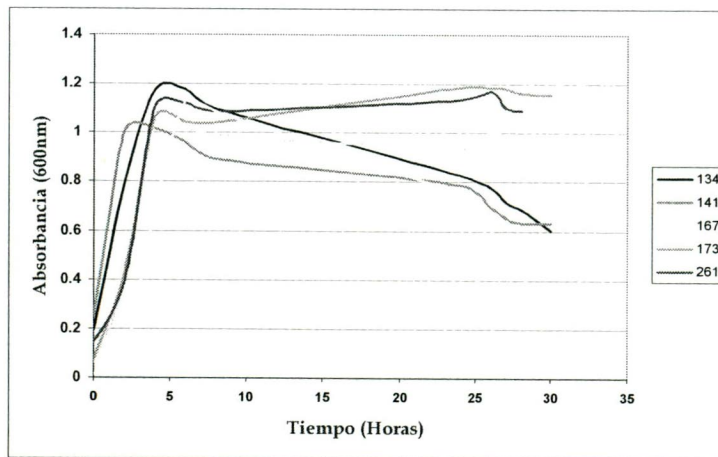


Figura 14.- **Cinética de crecimiento de SPTV.** Tiempos establecidos en base a su fase de crecimiento para las cepas; 134, 141, 167, 173 y 261.

5.6.- RT-PCR de 16S, *pep 27* y *lyt A*. Par determinar las condiciones de amplificación de cada uno de los genes se realizó una curva para identificar el punto antes de llegar a la saturación, y así poder comparar de manera cualitativa la expresión de los genes en estudio. A partir de estas curvas se determinó que para el gen 16S se emplearían 20 ciclos, para los genes *pep27* 45 ciclos y para *lyt A* 35 ciclos [figuras 12-14].

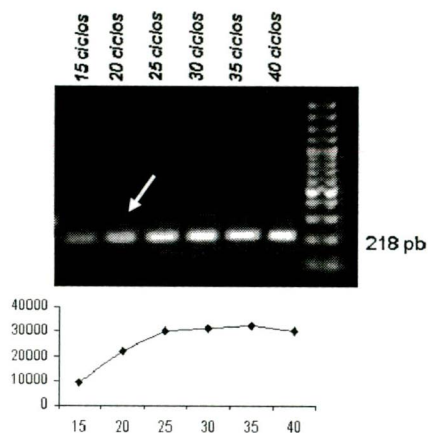


Fig 15.- RT-PCR del gen 16S de *S. pneumoniae* cepa R6. Curva a diferentes ciclos para el amplificado 16S, la flecha indica el ciclo antes del punto de saturación.

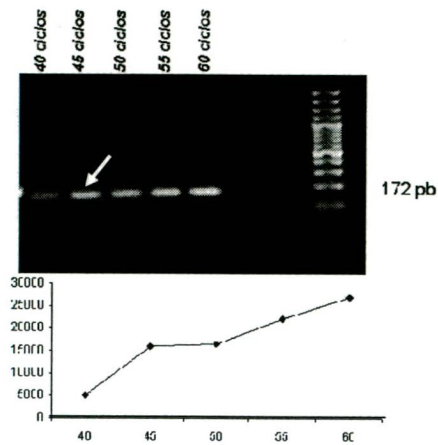


Fig 16.- RT-PCR del gen *pep27* de *S. pneumoniae* cepa R6. Curva a diferentes ciclos para el amplificado *pep27*, la flecha indica el ciclo antes del punto de saturación.

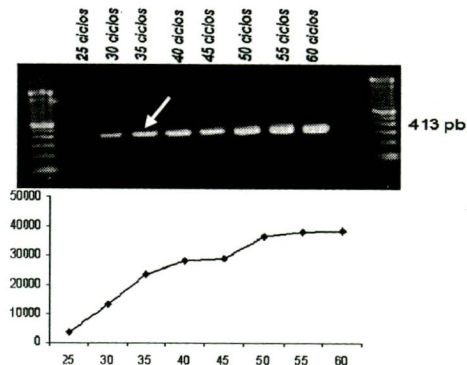


Fig 17.- RT-PCR de gen *lyt A* de *S. pneumoniae* cepa R6. Curva a diferentes ciclos para el amplificado *lyt A*, la flecha indica el ciclo antes del punto de saturación.

5.7.- Expresión de los genes *lyt A* y *pep 27*. El análisis densitométrico de las RT-PCR para *pep27* y *lyt A*, en las distintas fases de crecimiento tanto en ausencia como en presencia de vancomicina, mostró diferencias estadísticamente significativas, con un comportamiento similar en los cambios de expresión con respecto a la cepa de referencia no tolerante R6, se observó un comportamiento diferente en las cepas 35, 134 y 261 las cuales salieron del agrupamiento de datos (Figuras 18 y 19), de igual forma mostraron diferencias estadísticamente significativas los niveles de expresión para *pep 27* y *lyt A* en las diferentes fases de crecimiento en ausencia de vancomicina, observando un comportamiento similar con respecto a la cepa R6 [figura 20], por el contrario en presencia de vancomicina los niveles de expresión en fase de muerte difirieron con respecto a la cepa de referencia R6 (no tolerante), siendo que para las cepas SPVT los niveles de expresión fueron disminuyendo en forma progresiva con respecto a la fase de crecimiento, por el contrario los niveles de expresión de la cepa de referencia R6 (no tolerante) fueron en aumento [figura 21].

RESULTADOS

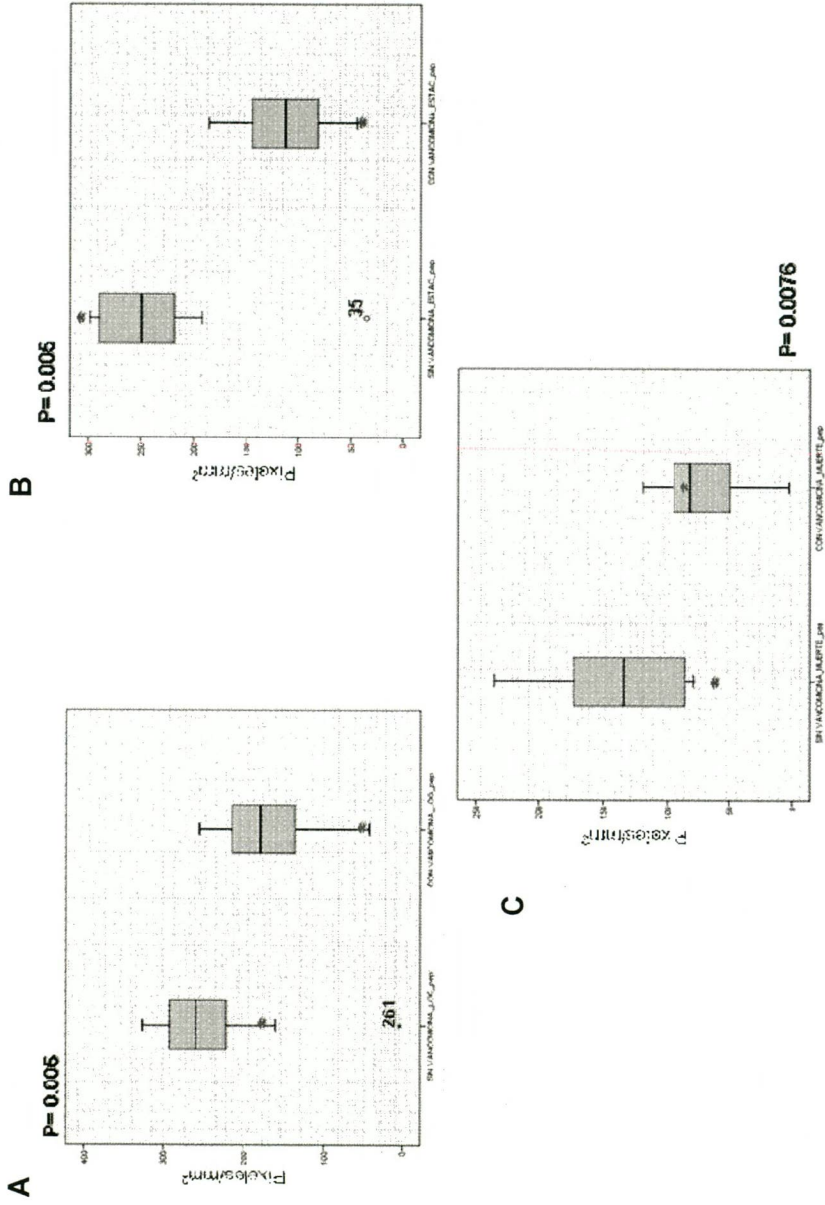


Figura 18. **Expresión del gen *pep27* en ausencia y presencia de vancomicina en SPVT.** Los resultados se analizaron con el programa SPSS con la prueba de Wilcoxon, se muestran los máximos y mínimos. A) Comparación en fase logarítmica, B) Comparación en fase estacionaria y C) Comparación en fase de muerte. * R6

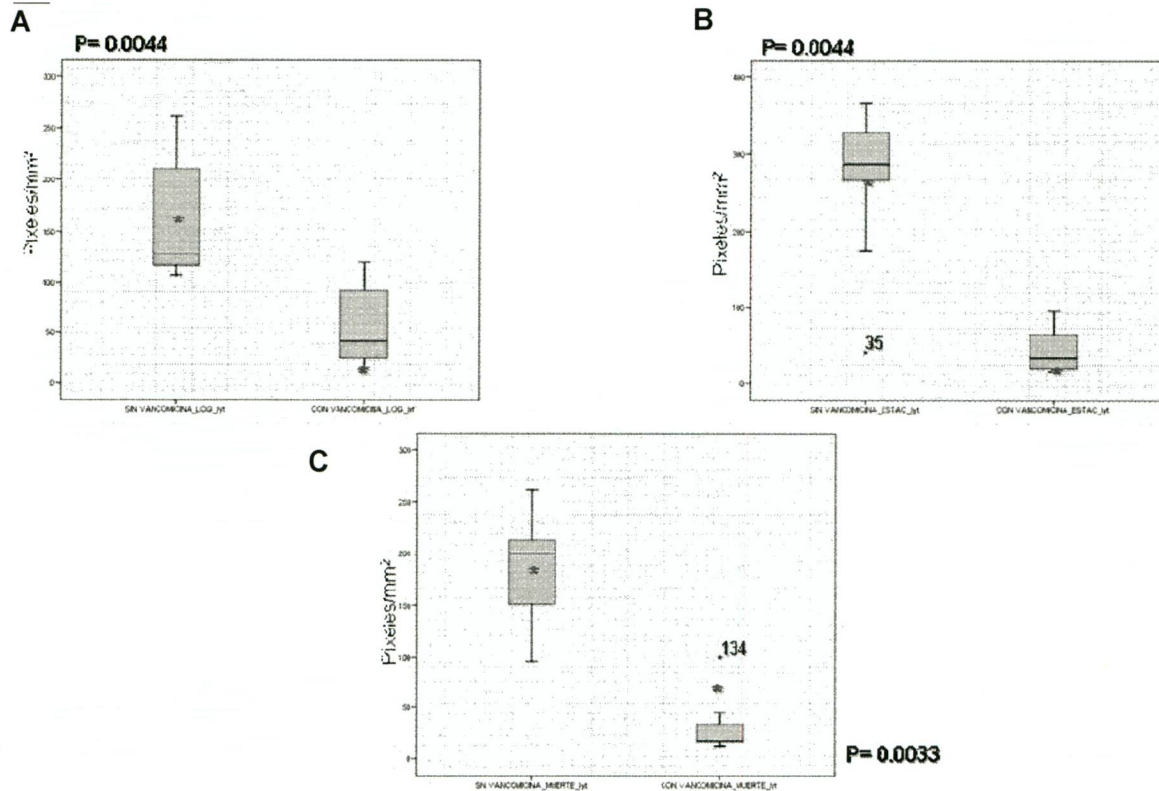


Figura 19.- Expresión del gen *lyt A* en ausencia y presencia de vancomicina en SPVT. Los resultados se analizaron con el programa SPSS con la prueba de Wilcoxon, se muestran los máximos y mínimos. A) Comparación en fase logarítmica, B) Comparación en fase estacionaria y C) Comparación en fase de muerte. * R6

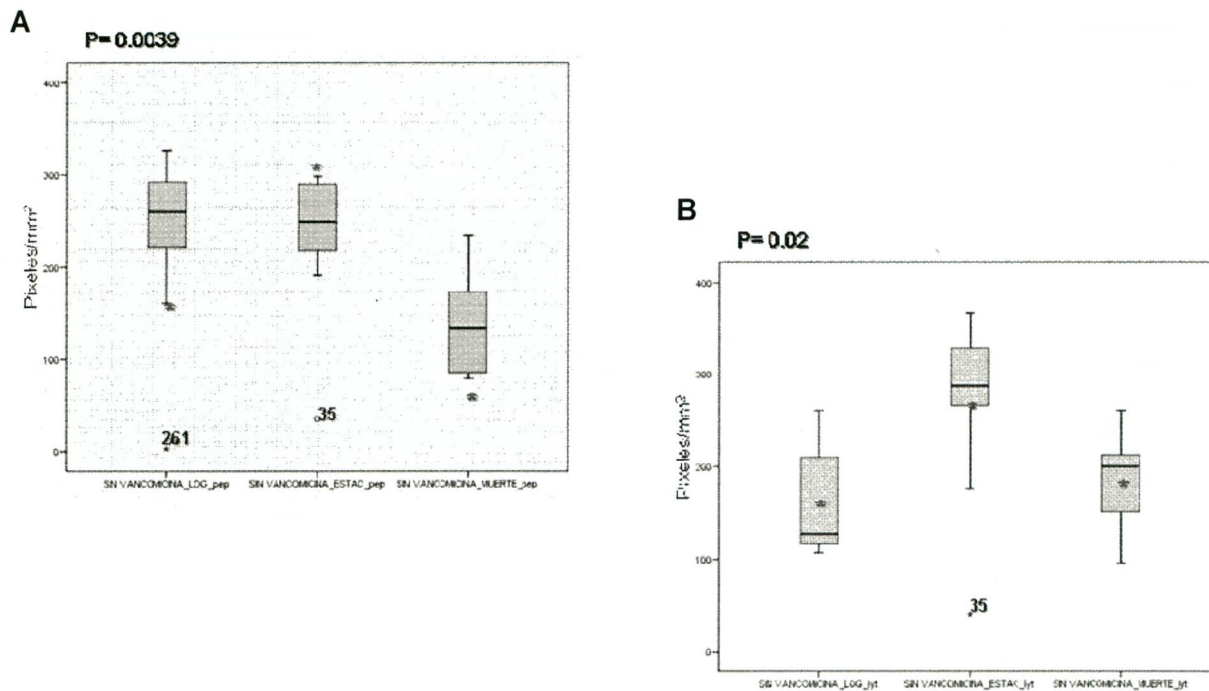


Figura 20.- Expresión del los genes *pep27* y *lyt A* en las diferentes fases de crecimiento en ausencia de vancomicina en SPVT. Los resultados se analizaron con el programa SPSS con la prueba de Friedman, se muestran los máximos y mínimos. A) Comparación del gen *pep27* en fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte y B) Comparación del gen *lyt A* en fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte. * R6

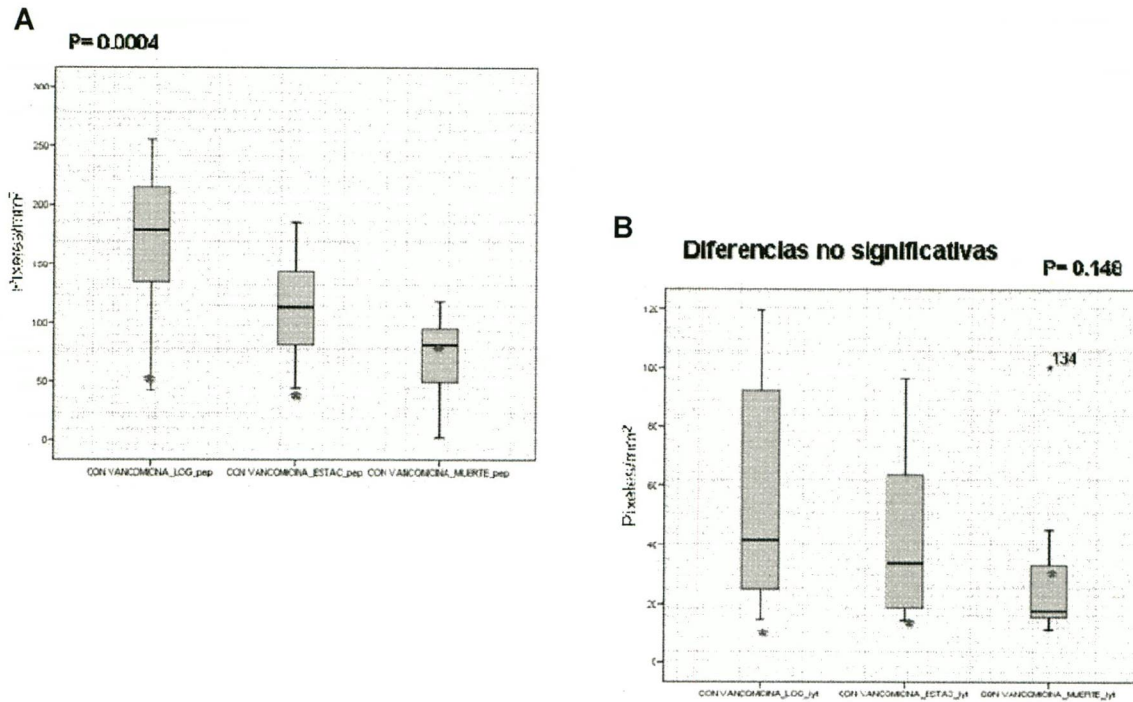


Figura 21.- **Expresión del los genes *pep27* y *lyt A* en las diferentes fases de crecimiento en presencia de vancomicina en SPVT.** Los resultados se analizaron con el programa SPSS con la prueba de Friedman, se muestran máximos y mínimos. A) Comparación del gen *pep27* en fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte y B) Comparación del gen *lyt A* en fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte. * R6

6. DISCUSIÓN

El tratamiento con vancomicina es una alternativa para procesos infecciosos asociados a cocos gram positivos como; *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp y *Enterococcus* sp; sin embargo, en estos géneros son cada vez más los reportes de fallas en el tratamiento por cepas tolerantes a dicho antibiótico, e inclusive resistentes como en el caso de *Enterococcus* sp.

No es muy claro hasta el momento, como *S. pneumoniae* desarrolla el fenómeno de tolerancia; sin embargo, en 1985 Liu y Tomasz ya reportaban que había cepas tolerantes a penicilina, relacionando la disminución de la actividad bactericida del antibiótico a defectos en la autolisina o a alteraciones de la cascada de señal de traducción involucrada en la activación de la autolisina; tal evento esta relacionado con los antibióticos que actúan a nivel de síntesis de pared celular incluyendo vancomicina.

Nuestros resultados no mostraron resistencia a vancomicina; sin embargo, encontramos 11 cepas (3.6%) SPTV siguiendo los criterios de Liu y col. Lo anterior, representa el primer reporte de cepas SPTV realizado en Hospitales de México en aislamientos de población pediátrica. Es de suma importancia el seguir monitoreando este fenómeno en nuestra población, se debe tomar en cuenta que en países como España, a pesar del alto porcentaje de resistencia a penicilina, no se reportan aislamientos de SPVT, sin embargo, se continua con el monitoreo de la posible emergencia de este fenómeno en su población (Ortega y col. 2003). La frecuencia de SPVT encontrada en nuestra población es considerable, y puede ir en aumento como es casos en Tennessee y Georgia, donde reportan 10.6% de SPVT en casos de meningitis, observando mayor mortalidad en las cepas tolerantes (Rodríguez y col. 2001).

Los serotipos más prevalentes fueron el 6B y el 23F; este último concuerda con lo reportado en un estudio realizado en Estocolmo a partir de muestras clínicas, en donde observaron una mayor frecuencia en los serotipos 9V, 14 y 23F (Fernebroy col. en 2004). Sin embargo, cabe recordar que la prevalencia de los

serotipos varía de acuerdo a la población. En México el serotipo 6B es uno de los que mas predomina, por lo que no es de extrañar que sea uno de los de mayor prevalencia en las cepas de SPVT. (Calderon 1999).

En nuestro trabajo se encontró un alto porcentaje de SPVT resistentes a penicilina (64%), afirmando el hecho de que la presión selectiva por antibióticos acelera el desarrollo de tolerancia (Sung y col. 2006). Así mismo se encontró resistencia de SPVT a eritromicina (18%), trimetropin con sulfametoxazol (27%) y clindamicina (9%), y una cepa con el fenómeno de multirresistencia siendo resistente a; penicilina [4 µg/mL], eritromicina [4 µg/mL] y con alta resistencia a; trimetropin con sulfatoxazol [>16 µg/mL] y clindamicina [>4 µg/mL], lo cual ha sido reportado en estudios donde asocian la tolerancia a vancomicina con la presencia de resistencia a diversos antibióticos, incluyendo β-lactámicos, sulfonamidas y eritromicina (Hass y col. 2004).

Las cepas 35, 36 y 134 se identificaron como cepas con lisis parcial, debido a los valores observados (47%, 46% y 54% respectivamente), los cuales fueron muy cercanos al 50%, no permitiéndonos establecer el fenotipo de forma precisa ya que, Obregón y col. en 2002, establecen solo 2 términos; 1) Soluble; decremento ≥50% (Lyt A⁺) y 2) Insoluble decremento ≤50% (Lyt A⁻), sin reportar lisis parcial. Una posible explicación de este hecho es que se trate de una mezcla de 2 clones diferentes, las cuales estén asociadas. Cabe destacar que estas cepas presentan una lisis negativa en presencia de vancomicina.

La cepa 261 es claramente insoluble con solo 19% de disminución de turbidez, lo cual sugiere tiene un déficit en la amidasa Lyt A; sin embargo, es necesaria la realización de pruebas mas especificas como las realizadas por Sung y col., para confirmar este hecho, cabe mencionar que existen 3 murein hidrolasas que participan en los procesos líticos de *S. pneumoniae*; Lyt A, Lyt B y Lyt C, siendo Lyt A a la que se le atribuye la mayor actividad lítica (alrededor del 90%), sin embargo las 3 autolisinas participan en las diferentes fases de crecimiento de la

bacteria, por lo aunque exista un déficit en *Lyt A*, no pierde su capacidad de división (Fernebro y col. 2004).

Por otra parte en la misma cepa se observó que la densidad óptica del cultivo con vancomicina aumentó, en lugar de decrecer. Una posible explicación a este fenómeno muy particular de la cepa 261, es que se estuviera presentando engrosamiento de la pared celular, con lo cual *S. pneumoniae* pudiera estar atrapando la vancomicina, como ha sido descrito previamente en cepas de *S. aureus* (Hiramatsu y col. 2001)

En el análisis estadístico de los resultados densitométricos de las RT PCR para la determinación de expresión de los genes *pep27* y *lyt A*, en fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte de las cepas SPTV, mostró diferencias estadísticamente significativas en la expresión de los genes en las diferentes fases de crecimiento en ausencia y en presencia de vancomicina, no así con el gen *lyt A* en presencia con vancomicina, esto pudiera deberse a que la bacteria mantiene niveles bajos de la expresión de esta amidasa, manteniendo así tolerancia a la vancomicina. Con respecto a la R6 se observó diferencias en el comportamiento en presencia de vancomicina en la fase de muerte, en la que las cepas tolerantes bajaron sus niveles de expresión de *pep27* y *lyt A*, a diferencia de la R6 que elevó sus niveles en estas condiciones llevando así a la bacteria a muerte, esto nos muestra el hecho de que las cepas tolerantes disminuyen sus niveles de expresión de genes que llevan a lisis celular para tolerar el antibiótico. Existieron cepas como la 35 y la 261 que salieron de la agrupación de datos, por la diferencia en sus niveles de expresión, estas cepas en particular tienen un comportamiento diferente.

La emergencia de cepas de SPVT es un fenómeno creciente, y aun no es dilucidado del todo el mecanismo que genera este tipo de cepas, pareciera que este fenómeno es de tipo multifactorial, en donde pudiera estar afectado mas de

DISCUSION

una característica de la célula bacteriana, involucrando a la pared celular, procesos de lisis y muerte celular.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amábile-Cuevas Carlos F. New Antibiotics and New Resistance In many ways, the fight against antibiotic resistance is already lost; preventing bacterial disease requires thoughtful new approaches. *Am Sci* 2003;91:138
- Área De Cultura Científica. Museo Cultural de la Ciencia. Ministerio de Educación y Ciencia www.museovirtual.csic.es/salas/micros/m6.htm
- Bourgeois Ingrid, Pestel-Caron Martine, Lemeland Jean-Francois, Pons Jean-Louis, and Caron Francois. Tolerance to the Glycopeptides Vancomycin and Teicoplanin in *Coagulase-Negative Staphylococci.*, *Antimicrob. Agents Chemother* 2007;51:740–743 .
- Cafini Fabio, Rosa del Campo, Alou Luis, Sevillano David, Morosini María Isabel, Baquero Fernando and Prieto José. Alterations of the penicillin-binding proteins and murM alleles of clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates with high-level resistance to amoxicillin in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:224–229
- Calderón Jaimes. La resistencia antimicrobiana del *Streptococcus pneumoniae* como un problema de salud pública. *Salud Pública Méx.* 1999;41:360-361
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), anteriormente NCCLS antimicrobial susceptibility testing standards M2-A8 and M7-A6. 2005
- Diagnostico Microbiológico, Konema Elmer, Stephen D.Allen, Janda William., Editorial Medica Panamericana, 5 Edición, 1999, pp 22-24.
- Diaz Fernandez Eduardo. Estudio mediante ingeniería de proteínas de la autolisina LytA de *Streptococcus pneumoniae*. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis doctoral. Madrid 1991.
- Echaniz Gabriela. Susceptibilidad antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* en México. Interscience Conference on Antimicrobial Agent and Chemotherapy. Chicago. 2003 September 14-17.

-
- Fernebro Jenny, Andersson Ingrid, Sublett Jack, Morfeldt Eva, Novak Rodger, Tuomanen Elaine, Normark Staffan, and Normark Birgitta Henriques. Cápsular Expression in *Streptococcus pneumoniae* Negatively Affects Spontaneous and Antibiotic-Induced Lysis and Contributes to Antibiotic Tolerance. *J. Infect Dis* 2004;189:328-338
 - Filipe Sergio, Severina Elena, and Tomasz Alexander. The murMN operon: A functional link between antibiotic resistance and antibiotic tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Nat Acad Sci*. 2002;99:1550–1555.
 - Gundián José González-Piñera, Barreto Jesús, Rodríguez Miguel Machado Andrés, Mora Emilio, Lescay Manuel. Glicopéptidos. *Acta Medica* 1998;8:54-7
 - Gundián José, González-Piñera, Barreto Penié Jesús, Rodríguez Miguel Á, Machado Reyes Andrés, Mora Emilio. Lescay Manuel. Glicopéptidos. *Acta Medica* 1998;8:54-7
 - Haas W, Sublett J, Kaushal D, Tuomanen. El Revising the role of the pneumococcal vex-vncRS locus in vancomycin tolerance. *J. Bacteriol*. 2004 Dec;186:8463-71.
 - Haas Wolfgang, Kaushal Deepak, Sublett Jack, Obert Caroline, and Tuomanen Elaine. Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol* 2005;187:8205–8210.
 - Hans H. Liu and Tomasz Alexander. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant Natural Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect Dis* 1985;152:365-372.
 - Hare Krishna Tiwari and Malay Ranjan Sen., Emergence of vancomycin *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. *BMC Infect Dis*. 2006;6:156
 - Heungsup Sung, Hee Bong Shin. Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* in Korea., *J Clin Microbiol*. 2006;44: 3524-3528.

-
- Hortal M, Camou G T, Echaniz. Antibiotic Resistance in *Streptococcus pneumoniae* in six latin American Countries: 1993-1999 Surveillance. *Microb Drug Resist.* 2001;7:391-401
 - Hortal Maria y Camou Teresa. Epidemiologia molecular de *Streptococcus pneumoniae*, *Rev Chil Infec.* 2001;18:22-25
 - Jonathan A. McCullers, B. Keith English, and Rodger Novak. Isolation and Characterization of Vancomycin-Tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the Cerebrospinal Fluid of a Patient Who Developed Recrudescence Meningitis. *J. Infect Dis* 2000;181:369–73
 - Keiichi Hiramatsu. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis.* 2001;1:147–155
 - Lanie Joel, Wai-Leung, Krystyna M, Kazmierczak, Tiffany M. Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6. *J. Bacteriol* 2007;189:38-51.
 - Lauren Mitchell, and Tuomanen Elaine. Vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* and its clinical significance. *Pediatric Infec Dis.* 2001: 531-533.
 - McCuller Jonathan A., English B. Keith. Isolation and Characterization of Vancomycin-Tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the Cerebrospinal Fluid of a Patient Who Developed Recrudescence Meningitis, *J. Infect Dis* 2000; 181: 369-373.
 - Murray B. Vancomycin-resistant Enterococci., *Am J Med.* 1997;102:284-293.
 - Normak Benriques H and S. Normak. Antibiotic tolerance in pneumococci. *Clin Microbiol Infec.* 2002;8:613-622.
 - Normark Birgitta, Novak Rodger, Ortvist, Gunilla Källenius, Tuomanen Elaine, Normark Staffa Clinical Isolates Of *Streptococcus pneumoniae* That Exhibit Tolerance of Vancomycin. *Clin Infect Dis.* 2001; 32:552–558
 - Norvak R, Charpentier E, Braun Johann. Signal Transduction by a Death Signal Peptide: Uncovering the Mechanism of Bacterial Killing by Penicillin. *Mol Cell* 2000;5:49-57.

-
- Obregón Virginia, Garcia Pedro, Garcia Ernesto, Fenoll Asunción. Molecular peculiarities of the *lyt A* gene isolated from Clinical Pneumococcal strains that are bile insoluble., J Clin Microbiol. 2002;40(7):2545-2554.
 - Ortega Mar, Marco F, Soriano Alex, García Elisa, Martínez José A., and Mensa Josep.: Lack of Vancomycin Tolerance in *Streptococcus pneumoniae* Strains Isolated in Barcelona, Spain, from 1999 to 2001. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1976–1978.
 - Rodriguez C, Atkinson R, Wally Bitar, Whitney Cinthia G. Tolerance to Vancomycin in Pneumococci: Detection with a Molecular Marker and Assessment of Clinical Impact. J. Infect Dis. 2004; 190:1481-7.
 - Levine DP., Vancomycin: understanding its past and preserving its future. South Med J. 2008;101:284-91
 - Velasco Alonso, Verheul A F, Verhoef J. *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines. Microbiol Rev. 1995;59:591-603.
 - World Health Organization. Pneumococcal vaccines. The Weekly Epidemiology Record 2003;14:110-9.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 8 de Diciembre del 2008, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Maestra en Ciencias Genómicas, a la QFB. Alma Lidia Olivares Cervantes.

Dra. Norma Velázquez Guadarrama	
Dr. José de Jesús Olivares Trejo	
Dra. Silvia Giono Cerezo	
Dr. Gerardo Aparicio Ozores	
Dra. Elisa Azuara Liceaga	
Dr. Mauricio Castañon Arreola	



Tel. 5658 - 7100