

Q882  
53845



UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES  
MÉRIDA-VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA, MENCIÓN CLÍNICA  
MÉRIDA. VENEZUELA

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE  
BIOPELÍCULA IN VITRO DE DIVERSOS CLONES INTERNACIONALES DE  
*Streptococcus pneumoniae* AISLADOS DE LA NASOFARINGE DE NIÑOS  
SANOS**

DONACION

**SERBIULA**  
Tullio Febres Cordero

Tutora: PhD. Beatriz Quintero

Tesista: Lcda. Eulimar Alfonso

Octubre, 2013

QR82  
S78A5



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA, MENCIÓN CLÍNICA  
MÉRIDA. VENEZUELA

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE  
BIOPELÍCULA IN VITRO DE DIVERSOS CLONES INTERNACIONALES DE  
*Streptococcus pneumoniae* AISLADOS DE LA NASOFARINGE DE NIÑOS  
SANOS**

**DONACION**

**SERBIULA**  
Tullo Febres Cordero

Tutora: PhD. Beatriz Quintero

Tesista: Lcda. Eulimar Alfonso

Octubre, 2013



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA, MENCIÓN CLÍNICA  
MÉRIDA. VENEZUELA

**EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE  
BIOPELÍCULAS IN VITRO DE DIVERSOS CLONES INTERNACIONALES  
DE *Streptococcus pneumoniae* AISLADOS DE LA NASOFARINGE DE NIÑOS  
SANOS**

TRABAJO DE GRADO. REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER SCIENTIAE EN  
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA

Tutora. PhD. Beatriz Quintero

Tesista: Lcda. Eulimar Alfonzo

Octubre, 2013

## DEDICATORIA

www.bdigital.ula.ve

*A todas aquellas personas que por alguna razón se creen incapaces de alcanzar una meta.  
Cuando decides creer lo que Dios dice de ti y aceptas su ayuda, las grandes montañas de  
dificultad son derribadas...*

*“Jesús dijo: Aquí en el mundo tendrán muchas pruebas y tristezas, pero ánimo, porque yo  
he vencido al mundo”. Juan 16:33*

*¡Sólo déjate guiar por Él!*

## AGRADECIMIENTOS

*Cuando vives con pasión y convicción, cada paso que das te acercan de manera indiscutible al propósito que tienes en la vida. Cuando escoges el camino de la ciencia y la investigación esto se hace palpable. Pierdes el miedo a hacerte preguntas porque sabes que las respuestas están ahí, en algún lugar, detrás de miles de análisis y que tras ellos se encuentra la esperanza de esa luz que traerá soluciones necesarias y vitales. Esa pasión por el saber, descubrir y por encontrar respuestas, son el motor que te impulsan a continuar, a creer y a tomar un nuevo reto de estudio. Nada de esto sería posible sin la inspiración y el consejo de tantas personas que marcan tu vida y que te han acompañado en el proceso. Por eso quiero agradecer a ustedes, aquellos que han estado ahí haciendo parte en mi vida, con su presencia e influencia. Ayudándome a avanzar en esta aventura, dándome la oportunidad de conocerme más, de crecer y de dar un aporte a la ciencia.*

*A Dios, mi guía, mentor y la mayor inspiración que alguien pueda tener. Es hermoso sumergirse en el conocimiento, más aun cuando sabemos que el principio de la sabiduría radica en ti Señor; y que al conocer y descubrir lo maravillosa y compleja que es la vida puedo ver que tu huella yace intacta en toda tu creación. Gracias Jesús por escogerme y utilizar este tiempo como excusa para conocer tu grandeza, te convertiste en el centro de mi vida, a ti sea toda la gloria y la honra.*

*A mis padres, mis hermanos, cuñadas y sobrinos: siempre pilares fundamentales donde se apoya mi corazón. Gracias por ser esa mano amorosa y dispuesta, siempre creyendo y apostando en todo lo que emprendo.*

*A mi tutora Dra. Beatriz Quintero: de corazón mil gracias por su paciencia y dedicación. Gracias por creer en mí, por retarme a trabajar cada día con excelencia, enseñándome a ver las situaciones de diferentes ángulos, para así llevar un equilibrio entre lo académico y lo personal. Agradezco cada palabra de aliento, por su mano amiga, más que una tutora se convirtió en un referente y una inspiración para mí.*

*A mi "miga": Vani juntas iniciamos esta locura llamada tesis, que me permitió en gran manera conocer a esa mujer virtuosa que eres. Gracias por estar en cada momento que te necesite, disfruté todo el tiempo que compartí a tu lado, sobre todo esas noches en vela en el laboratorio, eres más que especial para mí "miga", la mejor de todas las amigas. Seguiremos viendo biopelículas!!!*

*A mis amigos, quienes han compartido conmigo aciertos y desaciertos en todo el proceso de este postgrado y de mi vida. Gracias por su amor, dedicación, paciencia, porque aunque no entendían nada de microbiología siempre mostraban interés y preocupación en lo que les hablaba. Agradezco al Señor por cada uno de ustedes, son fuerza y motivación para seguir adelante. Soy bendecida grandemente con su amistad.*

*Al Laboratorio de Microbiología Molecular y a su excelente equipo de trabajo, agradezco a la Prof. María del Carmen Araque, Prof. Beatriz Millán, por su apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio.*

*A la ilustre Universidad de Los Andes, que con su labor formativa sigue apostando por la ciencia y el saber y continúa sembrando en nuestro país.*

*A todos muchas gracias...*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	viii
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
MARCO TEÓRICO	7
1. Características epidemiológicas, clínicas y microbiológicas de <i>S. pneumoniae</i>	7
2. Diversidad antigénica, patogénica y genética de <i>S. pneumoniae</i>	12
3. Características nutricionales y de crecimiento de <i>S. pneumoniae</i>	17
4. Biopelículas	23
5. Biopelículas en <i>S. pneumoniae</i>	29
6. Metodología para el estudio de las biopelículas	36
MATERIALES Y MÉTODOS	40
RESULTADOS	57
1. Cinética de crecimiento	57
2. Producción de biopelícula	67
3. Inducción de la producción de biopelícula	69
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	78
RECOMENDACIONES	79
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.	
Figura 1	Morfología de <i>S. pneumoniae</i> al microscopio óptico	8
Figura 2	Pruebas para la identificación de <i>S. pneumoniae</i>	8
Figura 3	Curva de crecimiento bacteriano	17
Figura 4	Esquema del funcionamiento de la turbidimetría	20
Figura 5	Etapas de formación de la biopelícula	26
Figura 6	Imagen tomada con el microscopio confocal de barrido láser donde se evidencia la viabilidad de una biopelícula de <i>S. pneumoniae</i> R6	28
Figura 7	Imagen de microscopia electrónica de barrido a bajas temperaturas de una biopelícula de <i>S. pneumoniae</i>	29
Figura 8	Esquema simplificado del desarrollo de la competencia en <i>S. pneumoniae</i>	30
Figura 9	Experimento de transformación llevado a cabo por Griffith en el año 1928	33
Figura 10	Esquema para la reactivación de las cepas y preparación del inóculo bacteriano	43
Figura 11	Esquema para la evaluación de la cinética de crecimiento	45
Figura 12	Esquema para la producción de biopelículas	48
Figura 13	Esquema para la extracción del ADN genómico y detección del gen <i>lytA</i> en las cepas de <i>S. pneumoniae</i>	51
Figura 14	Esquema para la inducción de la producción de biopelículas	55

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla 1	Listado de clones internacionales PMEN y cepas de referencia	14
Tabla 2	Serotipos, perfiles de resistencia y secuencias tipo de las cepas de <i>S. pneumoniae</i>	39
Tabla 3	Esquema para la adición de sustancias al Caldo Todd Hewitt utilizado en las evaluaciones de la cinética de crecimiento	40
Tabla 4	Puntos de corte establecidos para la producción de biopelícula en los medios de cultivo utilizados	47
Tabla 5	Condiciones de amplificación para la detección por PCR del gen <i>lytA</i>	50
Tabla 6	Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen <i>lytA</i>	50
Tabla 7	Cepas receptoras, donadoras de ADN y puntos de corte utilizados en los experimentos de inducción de la producción de biopelículas	52
Tabla 8	Crecimiento máximo promedio en el caldo Todd Hewitt de seis cepas relacionadas con tres clones internacionales neumocócicos	55
Tabla 9	Diferencias en el crecimiento en caldo Todd Hewitt entre cepas pertenecientes a distintos clones internacionales neumocócicos	57
Tabla 10	Diferencias en el crecimiento en caldo Todd Hewitt entre cepas pertenecientes a un mismo clon internacional neumocócico	58
Tabla 11	Modelo lineal general de medidas repetidas ajustado al crecimiento de las seis cepas de <i>S. pneumoniae</i>	60
Tabla 12	Densidades ópticas y cantidad de biopelícula producida en caldo Todd Hewitt con y sin glucosa por seis clones internacionales neumocócicos	65
Tabla 13	Producción de biopelícula en cepas capsuladas de <i>S. pneumoniae</i> al ser expuestas al ADN de una cepa productora del exopolisacárido	67
Tabla 14	Producción de biopelícula en cepas capsuladas y acapsuladas de <i>S. pneumoniae</i> al ser expuestas al ADN de cepas no productoras del exopolisacárido	69

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 Curva de crecimiento individual y promedio en caldo Todd Hewitt de seis cepas relacionadas con tres clones internacionales neumocócicos	56
Gráfico 2 Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt con y sin glucosa de seis cepas de <i>S. pneumoniae</i>	59
Gráfico 3 Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt con y sin sangre de carnero de seis cepas de <i>S. pneumoniae</i>	61
Gráfico 4 Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt y caldo Todd Hewitt suplementado con glucosa y sangre de carnero en seis cepas de <i>S. pneumoniae</i>	63
Gráfico 5 Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt con y sin los diferentes suplementos en seis cepas de <i>S. pneumoniae</i>	64
Gráfico 6 Cantidad de biopelícula producida en caldo Todd Hewitt con y sin glucosa por las tres cepas del clon acapsulado NCC1	66
Gráfico 7 Cantidad de biopelícula producida en cepas capsuladas de <i>S. pneumoniae</i> al ser expuestas al ADN de una cepa productora del exopolisacárido	68
Gráfico 8 Cantidad de biopelícula producida en cepas capsuladas y acapsuladas de <i>S. pneumoniae</i> al ser expuestas al ADN de cepas no productoras del exopolisacárido	70

## RESUMEN

*Streptococcus pneumoniae* es un colonizador frecuente de la nasofaringe humana y causa una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Ciertos serotipos y clones neumocócicos, determinados por MLST, son más exitosos en los procesos de colonización e invasividad y se ha sugerido que ambos fenómenos podrían estar relacionados con su capacidad de crecimiento *in vitro*. Además, la producción de biopelícula se ha asociado con los procesos de colonización nasofaríngea y persistencia en procesos crónicos de sinusitis y otitis media. Sin embargo, no se conoce claramente las características particulares de crecimiento y/o producción de biopelícula en una especie bacteriana con tan amplia diversidad genética. En esta investigación se evaluó la cinética de crecimiento y la capacidad de producción de biopelícula *in vitro* en quince (15) cepas de *S. pneumoniae* aisladas de la nasofaringe de niños sanos, relacionadas con los siguientes clones internacionales: el acapsular NCC1 y los capsulados Spain<sup>6B</sup>-2, England<sup>14</sup>-9, Tennessee<sup>23F</sup>-4, Taiwan<sup>19F</sup>-14 y el ST135. Las evaluaciones se realizaron en placas de poliestireno utilizando el caldo Todd Hewitt suplementado con glucosa y/o sangre de carnero. Para la cinética de crecimiento se midieron las densidades ópticas por espectrofotometría cada 16 h a intervalos de 1 h. Para la producción de biopelícula, luego de 48 horas de incubación las placas fueron sometidas a lavados y tinturas con cristal violeta al 1% y medidas por espectrofotometría. La cinética de crecimiento *in vitro* mostró diferencias estadísticamente significativas interclonales e intraclonales en el crecimiento de los neumococos, sugiriendo que tales variaciones podrían responder a diferencias individuales independientes del serotipo y genotipo. La adición de glucosa y/o sangre aumentaron significativamente la densidad celular y aceleraron el tiempo de crecimiento. En la práctica clínica el diagnóstico de las infecciones neumocócicas requiere el uso de medios que contienen glucosa al 0,2%. Estos resultados sugieren que adicionar glucosa hasta obtener un valor de 0,6%, podría contribuir en la recuperación e identificación temprana del microorganismo. Respecto a la producción de biopelícula, solamente las cepas acapsuladas del clon NCC1 formaron el exopolisacárido. Ninguno de los clones capsulados fueron capaces de producir biopelícula espontáneamente. Las cepas capsuladas no productoras de biopelícula (Taiwan<sup>19F</sup>-14 y Spain<sup>6B</sup>-2), al ser expuestas al ADN de una cepa productora de biopelícula (clon NCC1) mostraron resultados

diferentes. Se logró la formación de biopelícula para la cepa del clon Taiwan<sup>19F</sup>-14 pero no así para la cepa del clon Spain<sup>6B</sup>-2. Estos resultados sugieren posible diferencia en la compatibilidad genética entre la cepa del clon Spain<sup>6B</sup>-2 y el clon NCC1, tales como las descritas entre cepas de neumococo con variantes alélicas del péptido estimulante de la competencia (CSP-1, CSP-2). Por otra parte, la adición de glucosa (0,4%) tuvo un efecto negativo en la cantidad de exopolisacárido formado en todas las cepas, por lo que no se recomienda su uso para estimular la producción de biopelícula en neumococo.

Finalmente, los resultados de esta investigación hacen notar que las características de crecimiento y probablemente el éxito de algunas cepas neumocócicas podrían responder a características genéticas más allá del genotipo y serotipo. Además, sugieren que la co-colonización nasofaríngea por cepas capsuladas y acapsuladas compatibles para el intercambio genético podría estar favoreciendo la adquisición de factores de virulencia como la producción de biopelícula, y por ende la persistencia de los neumococos en nasofaringe y en patología del tracto respiratorio superior.

**Palabras claves:** *Streptococcus pneumoniae*, crecimiento *in vitro*, serotipos, clones neumocócicos, biopelículas.

## INTRODUCCIÓN

*Streptococcus pneumoniae* es un colonizador frecuente de la nasofaringe y uno de los principales patógenos que afecta al ser humano, con una amplia distribución mundial. Esta especie bacteriana es la principal causa de otitis media aguda y de neumonía adquirida en la comunidad, así mismo puede causar infecciones serias como meningitis y sepsis (Hsieh y col, 2008).

La cápsula es el principal mecanismo de virulencia de neumococo y sus diferencias antigénicas han permitido clasificar a este microorganismo en más de 90 serotipos. Durante muchos años, la serotipificación fue considerada la herramienta más importante para los estudios epidemiológicos. Tales investigaciones mostraron que ciertos serotipos están relacionados con una mayor frecuencia a colonización o a la producción de enfermedad invasiva, por lo que fueron llamados “serotipos colonizadores” o “serotipos invasivos” (Hausdorff y col., 2005).

Sin embargo, el tipo capsular no es suficiente para determinar el potencial invasivo de una cepa neumocócica y el uso de nuevas herramientas de tipificación molecular, tal como es la secuenciación de múltiples locus (MLST del inglés "*multi-locus sequence typing*"), ha permitido a la epidemiología moderna enfocarse en el reconocimiento y caracterización de grupos genéticos particulares, conocidos como clones internacionales neumocócicos. Los clones neumocócicos se caracterizan por tener una distribución geográfica muy amplia y parecen ser responsables, en gran medida, de la diseminación global de la resistencia a algunos antimicrobianos (Klugman, 2002).

Se sospecha, que otras características diferentes al serotipo capsular y al tipo de MLST hacen que algunos grupos genéticos neumocócicos sean más exitosos para diseminarse, colonizar y producir enfermedad (Klugman, 2002; Sjöström y col., 2006; Henriques y col., 2008). Al respecto, una investigación reciente mostró que los neumococos con serotipos colonizadores tenían un crecimiento *in vitro* mayor que los serotipos invasivos, dejando al

descubierto que existen variaciones importantes en el crecimiento entre cepas de esta especie microbiana. Lo que sugiere que el potencial de una cepa neumocócica para colonizar o producir enfermedad invasiva podría estar relacionada con su capacidad de crecimiento *in vitro* (Bättig y col., 2006).

No menos importante es el hecho de que *S. pneumoniae* es un microorganismo exigente para su cultivo en el laboratorio (Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006). De allí que una optimización de los medios empleados para su recuperación, que sea útil para la mayoría de los grupos genéticos que conforman esta especie, podría facilitar los estudios diagnósticos y de investigación

Por otra parte, la colonización y algunas enfermedades neumocócicas crónicas como la rinosinusitis y la otitis media están asociadas con la formación de biopelícula (Sauer y col., 2007; Domenech y col., 2009; Camilli y col., 2011). Es importante resaltar, que la participación de los neumococos en un ambiente sésil le permite un amplio intercambio genético horizontal, promoviendo de esta manera la acumulación de determinantes de resistencia, recambio del serotipo capsular y del material genético para la defensa ante el sistema inmune del hospedero en ambientes hostiles (Sanderson y col., 2006; Domenech y col., 2009; Castrillón y col., 2010; Marks y col., 2012)

Se ha descrito que no todas las cepas neumocócicas son capaces de generar biopelícula, de hecho, las cepas acapsuladas tienen una mayor capacidad para la producción de este exopolisacárido que las cepas capsuladas (Waite y col., 2001; Allegrucci y Sauer, 2007; Moscoso y col., 2009). Aquellas cepas que espontáneamente no generan biopelícula pueden adquirir esta capacidad tomando el ADN de otros microorganismos a través del fenómeno de la transformación. En el caso particular de *S. pneumoniae* las técnicas regularmente utilizadas para la transformación *in vitro* tienen una buena efectividad o rendimiento en las cepas carentes de cápsula, pero muy escaso en las cepas capsuladas. Afortunadamente, investigaciones recientes han demostrado altos niveles de intercambio genético en cepas de neumococos capsulares en un ambiente que simula la producción de biopelícula (Marks y col., 2012).

La urgente necesidad de profundizar en las investigaciones epidemiológicas, clínicas y de laboratorio con respecto a la colonización, patogenia y resistencia a los antimicrobianos en *S. pneumoniae* se ven limitada por la escasa información acerca de las características de crecimiento y la capacidad de formación de biopelícula de los diferentes grupos genéticos que conforman esta especie bacteriana. Por tal motivo, en esta investigación se evaluó la cinética de crecimiento y la producción de biopelículas *in vitro* de seis clones internacionales de *S. pneumoniae* que colonizaban a niños sanos.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la cinética de crecimiento y producción de biopelículas *in vitro* de diversos clones internacionales de *S. pneumoniae* aislados de la nasofaringe de niños sanos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Describir la cinética de crecimiento en caldo Todd Hewitt de tres clones internacionales de *S. pneumoniae* mediante espectrofotometría.
2. Estudiar los efectos de la adición de glucosa y sangre de carnero en el caldo Todd Hewitt sobre el crecimiento celular de tres clones internacionales de *S. pneumoniae*.
3. Determinar la producción de biopelículas en caldo Todd Hewitt de seis clones internacionales de *S. pneumoniae* mediante espectrofotometría.
4. Estudiar los efectos de la adición de glucosa en el caldo Todd Hewitt sobre la producción de biopelículas de seis clones internacionales de *S. pneumoniae*.
5. Inducir la capacidad de producción de biopelícula en dos clones internacionales de *S. pneumoniae* no productores utilizando el ADN de una cepa productora del exopolisacárido.

## MARCO TEÓRICO

### 1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, CLÍNICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE *S. pneumoniae*

#### 1.1 IMPORTANCIA EPIDEMIOLOGÍA Y CLÍNICA DE *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* también conocido como neumococo, coloniza frecuentemente en la nasofaringe de personas sanas. Alrededor de un 20-40% de los niños y cerca de un 10% de los adultos, son colonizados por este agente bacteriano. La colonización comienza poco después del nacimiento, bien sea por el canal de parto o por el contacto con las personas que rodean al recién nacido, por ello se considera que todos los humanos han sido colonizados al menos una vez en su vida por este microorganismo. La colonización es el paso inicial para el desarrollo de las enfermedades neumocócicas (Ruvinsky y col., 2004; Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

El neumococo puede ocasionar una gran variedad de cuadros clínicos, que van desde infecciones benignas como otitis media y sinusitis agudas, hasta infecciones invasivas como neumonía, meningitis y bacteriemias. La mayor incidencia y gravedad de estas patologías se dan en niños menores de 5 años, adultos mayores de 65 años y pacientes inmunocomprometidos. Para el año 2007, la Organización Mundial de la Salud reportó más de 1,2 millones de decesos por infecciones respiratorias agudas originadas por *S. pneumoniae*. (Artz y col., 2003; Meats y col., 2003; Ruvinsky y col., 2004; WHO, 2009).

Para el año 2009, se estima que en Latinoamérica *S. pneumoniae* causó entre 980.000 a 1.500.000 casos de neumonía y entre 2.600 a 6.800 casos de meningitis, y que en la región fallecieron entre 12.000 a 28.000 personas por alguna infección neumocócica (Valenzuela y col., 2009).

Para el año 2007, la neumonía ocupó el noveno lugar entre las causas de mortalidad en Venezuela, siendo responsable de 3.044 muertes. Estas cifras se traducen en la muerte de un paciente por neumonía cada 3 horas (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2009; OMS, 2010).

Asimismo, la otitis media aguda es el diagnóstico más frecuente para la prescripción de antibióticos en niños en todo el mundo. Aproximadamente, uno de cada tres niños experimenta dos o más episodios de otitis media aguda en los primeros tres años de vida. Tanto en los países desarrollados y en países con recursos limitados *S. pneumoniae* es la causa más común de esta patología en los menores de 5 años. Esta infección tiende a ser severa, supurativa, con un curso largo, de lenta resolución de los síntomas y pueden producirse complicaciones sistémicas si no son tratadas adecuadamente. La principal consecuencia de la otitis media es la pérdida auditiva, la cual puede ocasionar como secuela alteraciones del comportamiento, trastornos del aprendizaje y/o alteraciones del lenguaje (Shiao y col., 2004; Hall-Stoodley y col., 2006; Laufer y col., 2011).

En las últimas décadas, a consecuencia del uso y abuso de los antimicrobianos las cepas de *S. pneumoniae* han desarrollado y adquirido resistencia a estos fármacos. La presencia de cepas de *S. pneumoniae* resistentes a estas drogas incrementa la problemática de las infecciones neumocócicas ya que resta alternativas en el tratamiento de las mismas. Por ello, los sistemas internacionales de salud han caracterizado al neumococo como un agente de interés clínico, debido a la elevada tasa de morbilidad, hospitalización y mortalidad a las que se relaciona. Por lo tanto, la prevención de las enfermedades neumocócicas son una prioridad en los programas de salud, tanto en los países industrializados como en aquellos con recursos limitados como Venezuela (Echeverri y Giraldo, 2006; WHO, 2009; Arredondo y col., 2011; Tran y col., 2011).

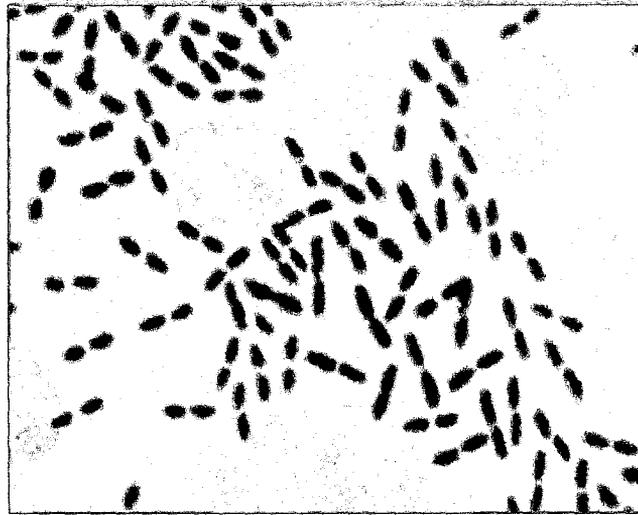
## 1.2 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae*, fue descubierto a principios del siglo XX, en 1881 por George Sternberg en Estados Unidos y Louis Pasteur en Francia, aislaron simultáneamente un microorganismo lanceolado, que se disponía en parejas, el cual fue llamado *Diplococcus pneumoniae*. Actualmente, *S. pneumoniae* se ubica en los esquemas taxonómicos en el Reino *Eubacteria*, Filum *Firmicutes*, Clase *Bacilli*, Orden *Lactobacillales*, Familia *Streptococcaceae*, Género *Streptococcus*, Especie *S. pneumoniae* (Koneman y col., 2006).

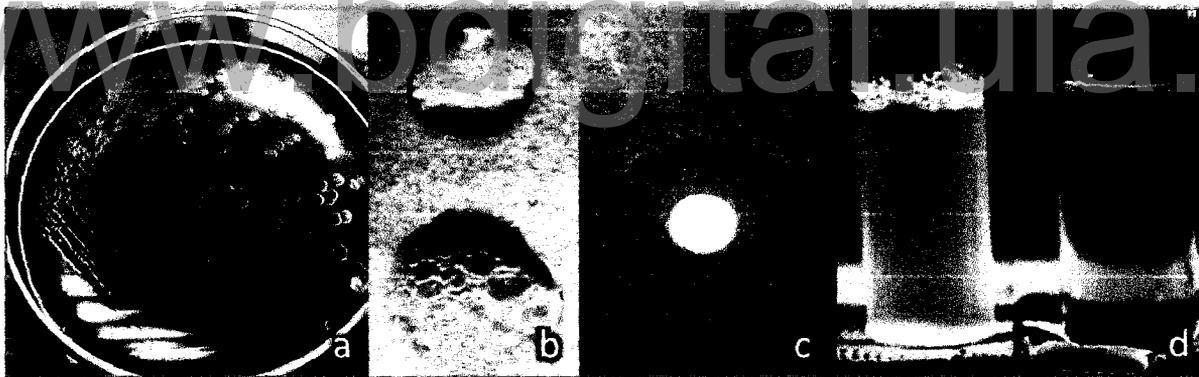
Al microscopio esta especie bacteriana se observa como un coco grampositivo oval con extremidad distal lanceolada. Su tamaño varía de 0,7 a 1,4  $\mu\text{m}$  de diámetro, se une en parejas o cadenas cortas por su extremo distal (Fig. 1). Este microorganismo es inmóvil, no produce flagelos ni endosporas, es catalasa negativo (Fig. 2). Es capaz de formar una cápsula de gran espesor si las condiciones son favorables, posee pili y es anaerobio facultativo (Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

Las colonias de neumococo, en un medio sólido suplementado con sangre comúnmente son  $\alpha$ -hemolíticas, pequeñas, grisáceas y en su mayoría mucoides debido a la presencia de la cápsula, aquellas cepas que no expresan cápsula se observan secas y rugosas (Fig. 2). Por lo general, las colonias jóvenes son convexas. Sin embargo, después de transcurridas 24-48 horas el centro de las mismas se vuelven deprimidas con una apariencia umbilical, debido a la autólisis ocasionada por la neumolisina propia del microorganismo (Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

Dentro de las pruebas bioquímicas comúnmente utilizadas para la identificación de *S. pneumoniae* se encuentran la negatividad en la prueba de la catalasa, la susceptibilidad a la optoquina, y la solubilidad en sales biliares (Fig. 2) (Martín y col., 2000; Murray y col., 2006; Koneman y col., 2006). Como prueba confirmatoria, se puede utilizar la detección por la reacción en cadena a la polimerasa (PCR) del gen *lytA* que codifica para la autolisina, una enzima común en todos los neumococo (Mandell y col., 2010).



**Figura 1. Morfología de *S. pneumoniae* al microscopio óptico. Cocos grampositivos lanceolados en pares (Tomado de: <http://www.sciencephotolibrary.com/view>).**



**Figura 2. Pruebas para la identificación de *S. pneumoniae*. a) Crecimiento de *S. pneumoniae* con  $\alpha$ -hemólisis en agar sangre. b) Prueba de la catalasa. En la parte inferior se observa la positividad de la prueba y en la superior la negatividad de la misma. c) Prueba de susceptibilidad a la optoquina. d) Prueba de la solubilidad en bilis. En el tubo de la izquierda se observa el crecimiento de *S. pneumoniae* en caldo Todd Hewitt. En el tubo de la derecha se observa la dilución de las colonias de *S. pneumoniae* en presencia de desoxicolato de sodio, lo que indica un resultado positivo (Modificado de: <http://www.sciencephotolibrary.com> ).**

### 1.3 MECANISMOS DE PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA

El neumococo, a pesar de ser un comensal habitual de la nasofaringe humana, también puede convertirse en un microorganismo oportunista. Para poder sobrevivir en el hospedero *S. pneumoniae* posee mecanismos de adaptación que incluyen factores de adherencia y colonización. Dentro de los cuales destacan la cápsula, hialuronidasa, la neumolisina, las proteínas de unión a la colina, la autilisina, entre otras (Tuomanen y col., 1995; Weiser, 2010).

No obstante, la cápsula en *S. pneumoniae* se considera el principal factor de virulencia. Esta es una matriz de polisacárido espesa, que rodea por completo a la célula bacteriana y está compuesta por largos polímeros de alto peso molecular. Estas estructuras están hechas a partir de unidades repetidas de oligosacáridos, que pueden contener entre 2 y 8 monosacáridos formando geles hidrófilos en las superficies de los organismos. Por su localización externa, la cápsula representa el primer componente bacteriano al que reacciona el hospedero y le confiere un valor significativo en la virulencia, debido a su capacidad antigénica y antifagocítica (Musher, 2000; Prado, 2008). Se ha comprobado que las cepas capsuladas son aproximadamente  $10^5$  veces más virulentas que las no capsuladas. Del mismo modo, la cápsula permite la serotipificación de este microorganismo (Tuomanen y col., 1995; Weiser, 2010).

Recientes investigaciones han puesto de manifiesto la producción de biopelícula o estado sésil de *S. pneumoniae* como un importante factor de virulencia. La participación de los neumococos en un ambiente sésil le permite un amplio intercambio genético horizontal a través de la transformación promoviendo de esta manera la acumulación de determinantes de resistencia, de recambio del serotipo capsular y del material genético para la defensa ante el sistema inmune del hospedero. Estudios recientes han demostrado que algunas enfermedades causadas por neumococo como la rinosinusitis o la otitis media crónica están relacionadas con el crecimiento sésil de esta especie bacteriana. Los detalles de este factor de virulencia se presentaran en un aparte posterior (Moscoso y col., 2006; Domenech y col., 2009; Marks y col., 2012; Wei y Havarstein, 2012).

## **2. DIVERSIDAD ANTIGÉNICA, PATOGENICA Y GENÉTICA DE *S. pneumoniae***

### **2.1 SEROTIPOS CAPSULARES DE *S. pneumoniae***

La cápsula del neumococo está compuesta por polisacáridos complejos que a su vez, está conformada por unidades repetidas de azúcares, lo cual ha permitido la diferenciación y clasificación de al menos 94 tipos capsulares, denominados serotipos (Wyres y col., 2012). Durante muchos años, la prueba de “Quellung” descrita por Neufeld en 1902, fue considerada la herramienta más importante para la tipificación de esta especie bacteriana. Esta técnica se basa específicamente, en las diferencias antigénicas entre los polisacáridos capsulares expresados por cepas diferentes (Hanage y col., 2005).

Diversos estudios han mostrado que ciertos serotipos están más frecuentemente relacionados con los procesos de colonización tales como: 3, 6B, 19F y 23F, por lo que se han llamado “serotipos colonizadores”. Por otra parte, los procesos de enfermedad invasiva se han asociado más frecuentemente a los serotipos: 1, 4, 5, 6A, 7F, 14, 18C y 19A, conocidos entonces como “serotipos invasivos” (Brueggemann y col., 2003; Sandgren y col., 2004; Hausdorff y col., 2005; Henriques y col., 2008).

Es importante recordar, que los tipos capsulares predominantes varían de acuerdo con las características del hospedero como la edad, el tipo de patología y con la región geográfica estudiada (Velazco y col., 1995; Musher, 2000; García y col., 2006; Prado, 2008; WHO, 2009). Diversos estudios epidemiológicos clínicos y patológicos han dejado como evidencia que el tipo capsular no es suficiente para determinar el potencial invasivo de una cepa neumocócica y al parecer existen otras características genéticas que podrían condicionar el éxito patogénico de algunas cepas sobre otras. Como se describe en el apartado siguiente (Hsieh y col., 2008).

## 2.2 CLONES DE *S. pneumoniae*

A partir del año 1998, se inició la caracterización de los neumococos mediante la técnica molecular conocida como secuenciación de múltiples locus (MLST del inglés "*multi-locus sequence typing*") establecida por Enright y Spratt. Para ello, los autores seleccionaron 7 fragmentos genéticos polimórficos: el *aroE* (shikimate deshidrogenasa), *GDH* (deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato), *gki* (glucosa quinasa), *recP* (transcetolasa), *spi* (señal peptidasa I), *xpt* (xantina fosforibosiltransferasa), *ddl* (D-alanina-D-alanina ligasa). La divergencia en la secuencia de estos genes fue suficiente para distinguir 18-34 alelos, muchos de los cuales diferían entre sí en uno o varios nucleótidos. La combinación de los alelos de los 7 locus permitió obtener un perfil alélico más ampliamente conocido como Secuencia Tipo (ST). Actualmente, las variantes alélicas conocidas, ha permitido construir un dendograma con más de 6 billones de ST disponible en la página <http://www.sph.emory.edu/PMEN>, en adelante referida como PMEN (Enright y Spratt, 1998; PMEN, 2006).

La técnica MLST ha sido utilizada para la asignación de cepas a clones internacionales. Esto se realiza mediante una comparación computarizada entre el ST de un aislado de cualquier laboratorio a nivel mundial con los datos de referencia disponibles en internet, que hasta la fecha incluyen 8.797 ST. La página web para la caracterización de los neumococos por MLST es <http://spneumoniae.mlst.net/>. Las cepas que muestran idénticas ST se consideran parte de un clon. Aquellos aislados que se diferencian en uno de los siete locus se denominan "variante de un solo locus" (SLV, por sus siglas en inglés *single locus variant*). Por otra parte, cepas con dos locus distintos forman una "variante de doble locus" (DLV, por sus siglas en inglés *double locus variant*). Finalmente, las cepas con diferencia en tres o más locus se consideran pertenecientes a clones distintos (McGee y col., 2001; Klugman, 2002; PMEN, 2006).

Esta nueva clasificación ha permitido a la epidemiología moderna enfocarse en estos clones que tienen una distribución geográfica muy amplia y parecen ser responsables, en gran medida, de la diseminación global de la resistencia neumocócica a múltiples antimicrobianos (Klugman, 2002; Sjöström y col., 2006; Henriques y col., 2008).

Hasta el momento se han descrito 43 clones internacionales registrados en la Red de Epidemiología Molecular de Neumococo (Tabla 1). Estos grupos genéticos se han distribuido ampliamente, tal es el caso de el Spain<sup>6B</sup>-2 (España, Francia, Países bajos de Europa, Islandia, Portugal, Alemania, Finlandia, Reino Unido, Estados Unidos, Taiwán, Hong Kong, Australia, Colombia, Chile, Brasil y Venezuela), England<sup>14</sup>-9 (Reino Unido, Portugal, Italia, Grecia, Bélgica, Alemania, Estados Unidos, Australia, Argentina), Taiwan<sup>19F</sup>-14 (Taiwán, Hong Kong, Vietnam, Sudáfrica, Reino Unido, Grecia, Estados Unidos, Australia) y Tennessee<sup>23F</sup>-4 (Alemania, Holanda, Estados Unidos, Venezuela) (PMEN, 2006).

Los criterios para que un grupo de cepas genéticamente relacionadas sean considerado un clon neumocócico internacional son: i) el clon debe tener una amplia distribución geográfica y haber sido aislado en al menos dos continentes ii) el clon debe ser resistente a uno o más antibióticos de amplio uso terapéutico en la práctica clínica o un clon susceptible pero productor de enfermedad iii) los datos del clon deben ser publicados o estar en imprenta antes de su ratificación en la red (PMEN, 2006).

La consideración de nuevos clones deben ser propuestos en la reunión anual de PMEN iv) el clon debe estar disponible para que la red haga análisis de tipificación y confirmación antes de ser aceptado v) el clon debe estar disponible para ser depositado en la colección ATCC de clones vi) los clones estarán disponibles a través del Laboratorio de Referencia de *Streptococcus* en Alemania y en la Universidad de Emory en Estados Unidos (PMEN, 2006).

La nomenclatura sugerida de clones neumocócicos incluye: el país en el que se aisló el primer clon, el primer serotipo aislado, la numeración secuencial en red y finalmente el serotipo de la cepa aislada (en el caso de cambio de cápsula). Un ejemplo es el clon Spain<sup>23F</sup>-1-19F, el cual describe una cepa del serotipo 19F que surgió como variante de un clon del serotipo 23F. Esta cepa era multirresistente y aunque fue inicialmente detectada en España, se ha diseminado a diferentes países (Klugman, 2002; PMEN, 2006).

Es de hacer notar, que para las cepas no capsuladas (carentes del locus *cpsA*), existe otro sistema de clasificación establecida por Parck y col., (2012) quienes categorizaron las cepas a través del estudio de tres genes estructurales. La agrupación fue establecida como Clados<sup>1</sup> de Cápsula Nula (NCC, por sus siglas en inglés “*Null Capsule Clade*”). Dos de los genes utilizados para esta clasificación son el *aliC* y *aliD* que codifican para ciertas lipoproteínas. Además, se emplea el recientemente descubierto gen *pspK*, el cual se cree codifica para una adhesina involucrada en la colonización de la nasofaringe humana.

Las NCC1 se caracterizan por poseer el gen *pspK* pero no los genes *aliC* y *aliD* y tienen las ST: 1106, 6151, 6152 y 1406, El clon NCC2 posee los genes *aliC* y *aliD*, pero no el gen *pspK*, con las ST: 448, ST2315, 6153. El clon NCC3 posee el gen *aliD*, pero no los genes *pspK* y *aliC* y hasta el momento solo tiene asignadas ST provisionales. Cepas relacionadas con estos clones acapsulados han sido halladas en diferentes regiones del mundo, tal es el caso del NCC1 y el NCC2 en Corea del sur, Estados Unidos y Brasil. El NCC3 en Estados Unidos (Parck y col., 2012).

www.bdigital.ula.ve

---

<sup>1</sup>Clados: grupo de organismos cuyos miembros comparten características homólogas derivadas de un ancestro común.

**Tabla 1. Listado de clones internacionales PMEN y cepas de referencia.**

Nº	ST	Clon Global de PMEN	Serotipo
1	81	Spain <sup>23F</sup> -1	23F
2	90	Spain <sup>6B</sup> -2	6B
3	156	Spain <sup>9V</sup> -3	9V
4	37	Tennessee <sup>23F</sup> -4	23F
5	18	Spain <sup>14</sup> -5	14
6	268	Hungary <sup>19A</sup> -6	19A
7	75	S. Africa <sup>19A</sup> -7	19A
8	185	S. Africa <sup>6B</sup> -8	6B
9	9	England <sup>14</sup> -9	14
10	20	CSR <sup>14</sup> -10	14
11	175	CSR <sup>19A</sup> -11	19A
12	270	Finland <sup>6B</sup> -12	6B
13	41	S. Africa <sup>19A</sup> -13	19A
14	236	Taiwan <sup>19F</sup> -14	19F
15	242	Taiwan <sup>23F</sup> -15	23F
16	173	Poland <sup>23F</sup> -16	23F
17	384	Maryland <sup>6B</sup> -17	6B
18	67	Tennessee <sup>14</sup> -18	14
19	289	Columbia <sup>5</sup> -19	5
20	315	Poland <sup>6B</sup> -20	6B
21	177	Portugal <sup>19F</sup> -21	19F
22	273	Greece <sup>6B</sup> -22	6B
23	376	N. Carolina <sup>6A</sup> -23	6A
24	377	Utah <sup>35B</sup> -24	35B
25	63	Sweden <sup>15A</sup> -25	15A
26	338	Colombia <sup>23F</sup> -26	23F
27	217	Sweden <sup>1</sup> -27	1
28	306	Sweden <sup>1</sup> -28	1
29	615	USA <sup>1</sup> -29	1
30	193	Greece <sup>21</sup> -30	21
31	180	Netherlands <sup>3</sup> -31	3
32	230	Denmark <sup>14</sup> -32	14
33	53	Netherlands <sup>8</sup> -33	8
34	218	Denmark <sup>12F</sup> -34	12F
35	124	Netherlands <sup>14</sup> -35	14
36	113	Netherlands <sup>18C</sup> -36	18C
37	199	Netherlands <sup>15B</sup> -37	15B
38	205	Sweden <sup>4</sup> -38	4
39	191	Netherlands <sup>7F</sup> -39	7F
40	304	Sweden <sup>1</sup> -40	1
41	327	Portugal <sup>6A</sup> -41	6A
42	344	Norway <sup>NT</sup> -42	NT
43	448	USA <sup>NT</sup> -43	NT

(Tomado de: <http://www.sph.emory.edu/PMEN> ).

### 3. CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES Y DE CRECIMIENTO DE *S. pneumoniae*

#### 3.1 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES Y DE CRECIMIENTO DE *S. pneumoniae*

*S. pneumoniae* es una especie bacteriana nutricionalmente exigente. Algunos de los elementos que favorecen su crecimiento son el complejo de vitamina B (biotina, nicotinamida, pantotenato, piridoxal, riboflavina y tiamina) y en especial la colina. De allí que, para su crecimiento en el laboratorio se empleen diferentes medios suplementados con los productos sanguíneos tales como: el BHI (Brain-Heart-Infusion), Columbia, Tripticasa Soya, entre otros (Gerhardt y col., 1994; Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

*S. pneumoniae* es considerado un microorganismo anaerobio facultativo. Puede vivir en presencia de oxígeno pero es incapaz de reducir totalmente los radicales tóxicos del mismo, por lo cual se desarrolla mejor en presencia de una fuente de catalasa como las células rojas de la sangre (WHO, 2003; Restrepo y col., 2005).

Además al neumococo se le considera microaerofílico, ya que algunas cepas (5-8%) requieren de un 5% de CO<sub>2</sub> para su crecimiento. Este microorganismo puede crecer en un rango de temperatura entre 25° a 42°C, aunque lo ideal es cultivarlo a 35±2°C. (WHO, 2003; CLSI, 2012).

Un elemento crucial para el desarrollo de *S. pneumoniae* es proporcionarle un pH óptimo de 7,8 (rango de 6,5 a 8,3). Esta bacteria obtiene su energía a través de la fermentación de azúcares hasta producir lactato, provocando la acidificación del medio y finalmente el detenimiento del crecimiento. Además, en un medio altamente ácido, el neumococo activará sus autolisinas y dará origen a la muerte temprana de las bacterias. Se ha demostrado que la adición de glucosa en caldos de fermentación tiene un efecto significativo sobre la productividad de los polisacáridos capsulares, siempre que se ajusten los valores de pH a los requerimientos de esta especie bacteriana (Brock y Madigan, 1993; Hoskins y col., 2001; Moura y col., 2011).

En la práctica clínica y de investigación, el caldo de enriquecimiento Todd Hewitt se utiliza para la recuperación de especies del género *Streptococcus*. Este caldo se encuentra disponible comercialmente como un medio deshidratado para ser reconstituido en agua a un pH 7,8±2. Entre sus componentes se incluyen la infusión cerebro corazón (0,31%), peptona (2%), glucosa (0,2%), cloruro de sodio (0,2%), fosfato disódico (0,04%) y carbonato de sodio (0,25%). Las fuentes nutritivas del medio de cultivo que estimulan el crecimiento microbiano son la infusión cerebro corazón y la peptona, las cuales proveen nitrógeno, vitaminas y aminoácidos. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cual produce ácidos que son neutralizados por las sales fosfato de sodio y carbonato de sodio (Todd y Hewitt, 1932; MacFadin, 1985; CLSI, 2012).

### 3.2 LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO

El crecimiento bacteriano se define como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de la célula. Es un proceso complejo que supone la replicación de todas las estructuras y componentes celulares a partir de nutrientes exógenos. Sin embargo, el crecimiento de una célula individual y una población es diferente. En lo que se refiere al crecimiento de células individuales, este consiste en el aumento del tamaño y peso de las células que precede a la división celular. Esta división trae aparejada un aumento en el número de células (proliferación de la población) y este puede ser cuantificado directamente (contando el número de células), o indirectamente (midiendo la masa celular) (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002; Koneman y col., 2006).

En el laboratorio el crecimiento de las poblaciones bacterianas se realiza a partir de un sistema de cultivo cerrado (sin entrada ni salida de los componentes del sistema), está limitado por el agotamiento de los nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. La consecuencia es que el crecimiento al cabo de un cierto tiempo llega a disminuir hasta detenerse. Este proceso se expresa gráficamente en la denominada curva de crecimiento, en la que se describen cuatro fases i) fase de latencia, ii) fase exponencial, iii) fase estacionaria y iv) fase de muerte o deceso (Fig. 3) (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002; Koneman y col., 2006).

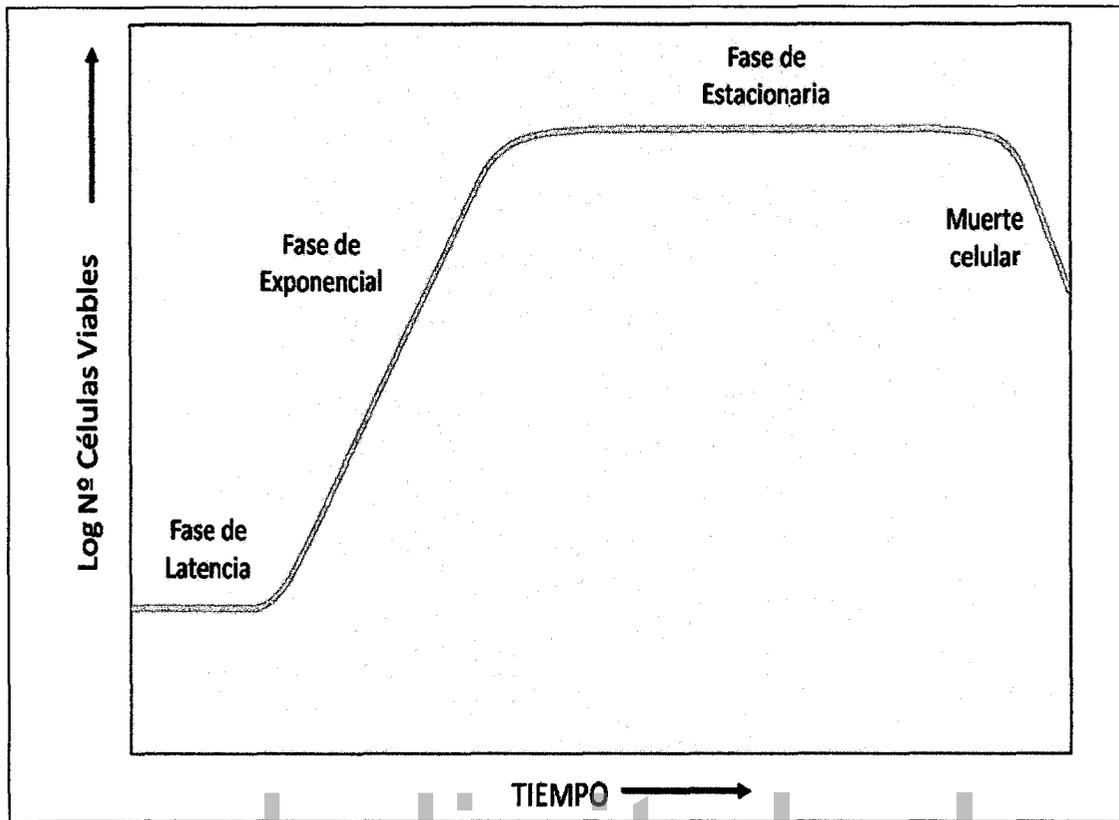


Figura 3. Curva de crecimiento bacteriano (Tomado de: Forbes y col., 2002).

En la fase de latencia existe un aparente reposo en el que las células sintetizan las enzimas necesarias para la actividad metabólica que deben llevar a cabo. Cuando se hacen mediciones del número de células en distintos tiempos dentro de esta fase, el valor no cambia sustancialmente. En cambio, interiormente las células trabajan activamente adaptando el equipo enzimático al medio de cultivo. La bacteria se prepara para hacer uso de los nutrientes que este medio le aporta, por lo tanto es la fase de adaptación al medio, con aumento de la masa celular pero no del número de células. Pasado este período, el cultivo entra en una fase de crecimiento máximo del número de células denominada fase exponencial. Durante esta fase, la velocidad de crecimiento depende del tipo de microorganismo y de diversos factores ambientales como temperatura, pH, oxigenación, entre otros (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002; Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

Seguidamente, la velocidad de crecimiento comenzará a disminuir hasta hacerse nula y alcanzar la fase estacionaria, la cual se desarrolla debido a cambios en la composición y concentración de nutrientes. Esta fase se presenta por agotamiento del suministro de algún nutriente esencial o por acumulación de productos metabólicos que sean tóxicos. También puede deberse por la disminución de la oxigenación o cambios en las condiciones de pH del medio de cultivo (acidificación o alcalinización). En esta fase se equilibran el número de células nuevas con el número de células que mueren (Forbes y col., 2002; Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

Finalmente, el cultivo entra en la fase de declinación, en la que el número de células que mueren se va haciendo mayor que las células nuevas. La pendiente de esta fase puede ser más o menos pronunciada de acuerdo al tipo de microorganismo. Así por ejemplo, se observan pendientes menos bruscas cuando el microorganismo presenta alguna forma de resistencia como la formación de esporas y/o glicocalix (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002; Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

En el caso particular de *S. pneumoniae*, los eventos relacionados con la cinética de crecimiento han sido escasamente estudiados. A ese respecto, Finkle, en 1931, evaluó la respiración y fermentación de glucosa en cepas de los serotipos I, II y III y concluyó que existía un comportamiento diferente frente a estos procesos entre las cepas de neumococo estudiadas.

Por su parte, Bättig y col., en 2006 examinaron el crecimiento de diversos serotipos capsulares de neumococo entre las fases de latencia y exponencial. Los resultados mostraron variaciones importantes en el crecimiento entre cepas de esta especie bacteriana, y que los neumococos con serotipos colonizadores tenían un crecimiento *in vitro* mayor que los serotipos invasivos. Estos autores sugieren que el potencial de una cepa neumocócica para colonizar o producir enfermedad invasiva podría estar relacionado con su capacidad de crecimiento *in vitro*.

### 3.3 MÉTODOS PARA LA EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

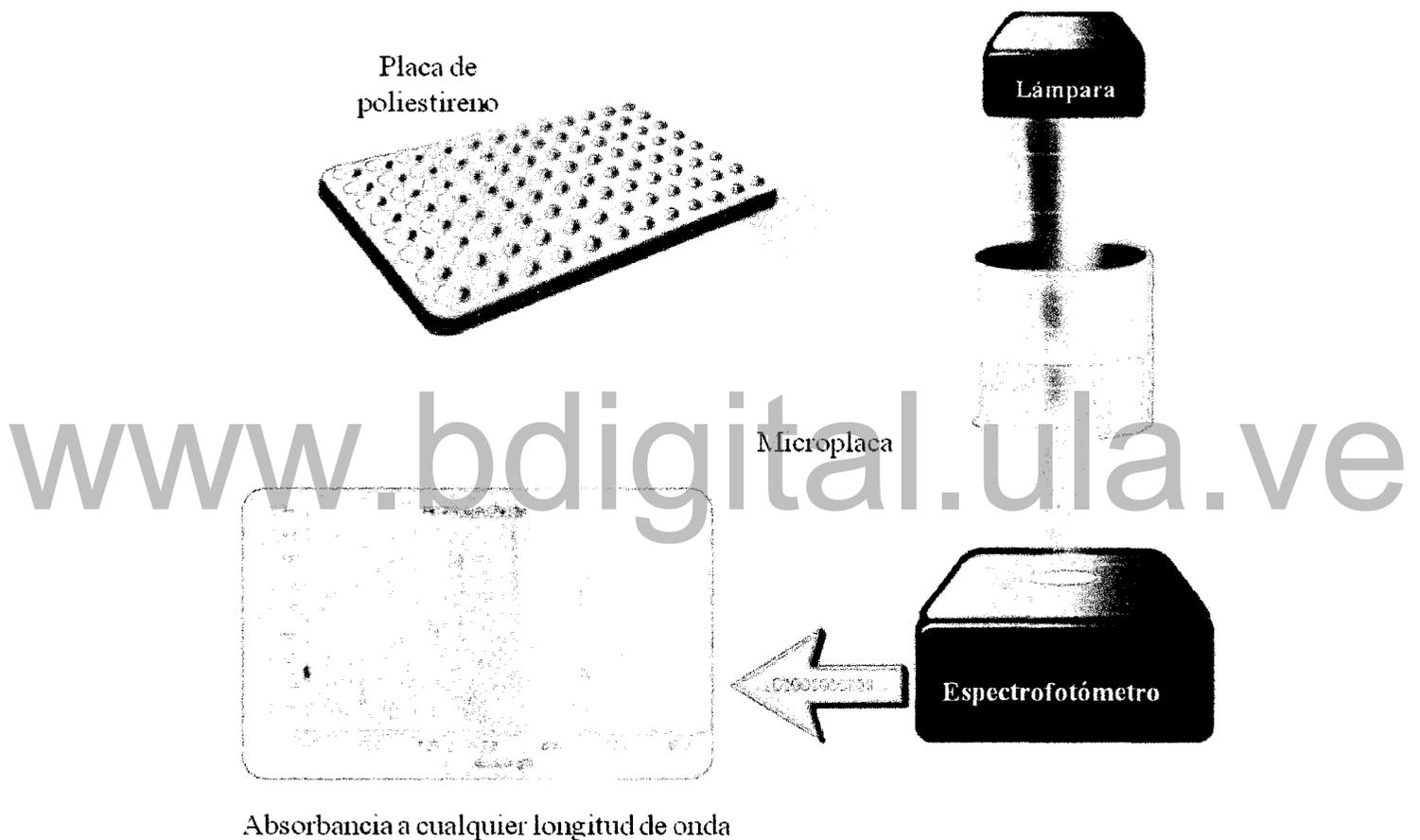
El crecimiento bacteriano se evalúa haciendo mediciones sucesivas en tiempos determinados de la población en estudio. Existen diversas formas de calcular la población bacteriana, entre ellos destacan: - el conteo microscópico directo, - el conteo de células vivas y - la medición de la densidad bacteriana por turbidimetría (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002).

El conteo microscópico directo es una técnica común, rápida y económica que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología. Este procedimiento consiste en contar con un microscopio la cantidad de células presentes en un volumen determinado. Para estos recuentos se utilizan generalmente cámaras de recuentos (cámara de Neubaver). Una de las mayores ventajas de esta técnica es que brinda información adicional sobre el tamaño y la morfología de las células contadas. Para contar células provenientes de un medio líquido la muestra puede utilizarse directamente, mientras que, en el caso de células procedentes de medios sólidos, debe prepararse una dilución de la misma para ser contabilizada (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002).

El conteo de células viables es un método que se basa en el recuento de los microorganismos capaces de formar colonias en medios sólidos. En este procedimiento se determinan sólo las células microbianas viables en las condiciones de trabajo predeterminadas (nutrientes, atmósfera, temperatura, entre otros). Para ello, se siembra una cantidad conocida de la suspensión bacteriana en un medio sólido. La bacteria se multiplicará formando colonias visibles a simple vista, las cuales pueden ser contadas y se denominan unidades formadoras de colonias (UFC) (Joklik y col., 1994; Forbes y col., 2002).

La turbidimetría permite estudiar el crecimiento bacteriano y hacer un seguimiento del mismo a través del tiempo. Este método es rápido, reproducible, no destructivo y económico para monitorizar el crecimiento de cultivos microbianos (Bajaj y col., 1991; Baumgart, 1992; Neumeyer y col., 1997; Presser y col., 1998). Con la turbidimetría, la concentración de la masa celular se mide en densidades ópticas (DO) o absorbancias. Para ello, pequeñas cantidades de medio de cultivo se colocan en placas de poliestireno y se obtienen las DO en el

espectrofotómetro. Esta técnica se basa en el hecho de que partículas pequeñas difractan la luz, dentro de ciertos límites, de manera proporcional a su concentración. Entonces, cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, la reducción en cantidad de luz transmitida, se utiliza como una medida de la masa bacteriana presente (Fig. 4) (Joklik y col., 1994; Gerhardt y col., 1995; Forbes y col., 2002).



**Figura 4.** Esquema del funcionamiento de la turbidimetría (Tomado de: <http://www.calibracion.com.mx/espectrofotometro.html>).

## 4. BIOPELÍCULAS

### 4.1 GENERALIDADES DE LAS BIOPELÍCULAS

Las biopelículas son ecosistemas microbianos constituidos, por uno o varios microorganismos adheridos a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructurales complejas, tales estructuras son consideradas la forma más exitosa de colonización, son ubicuas en la naturaleza y responsables de muchas enfermedades. Las bacterias que forman parte de una biopelícula exhiben un fenotipo alterado con respecto a sus equivalentes de vida libre o planctónica, en cuanto a su tasa de crecimiento y patrones de expresión génica (Costerton y col., 1995; Nazar, 2007; Castrillón y col., 2010).

La formación de las biopelículas se produce en superficies bióticas y abióticas en respuesta a diferentes condiciones ambientales tales como: la disminución o aumento de la disponibilidad de nutrientes y de hierro, cambios en la osmolaridad, el pH, la tensión de oxígeno y la temperatura. Otro factor importante que influye en la producción de biopelícula es la existencia de componentes de transferencia que comunican las señales ambientales al interior del microorganismo, lo cual permite la expresión de proteínas que favorecen la adaptación de las bacterias a la nueva situación ambiental, transformando el crecimiento de fase planctónica al desarrollo en fase sésil (Castrillón y col., 2010; López y col., 2010).

Por otra parte, se ha descrito que las biopelículas formadas por múltiples especies, proporcionan una asociación entre organismos metabólicamente cooperativos, que facilita el cambio de sustratos y la distribución de productos metabólicos. Asimismo, la cercanía entre las células facilita la transferencia horizontal de genes, plásmidos o fagos, lo cual es importante para favorecer la diversidad genética de las comunidades microbianas naturales. Esto se lleva a cabo a través de una comunicación entre los microorganismos, el cual se ha denominado *quorum sensing*. Este sistema involucra la regulación y expresión de genes específicos a través de moléculas de señalización que median la comunicación intra e intercelular y es dependiente de la densidad celular que exista (Castrillón y col., 2010; López y col., 2010).

Hasta el momento, se ha descrito que los microorganismos bacterianos asociados a las biopelículas colonizan una amplia variedad de tejidos naturales, dispositivos médicos e implantes artificiales. Asimismo, se ha considerado que las biopelículas están involucradas en más del 60% de las enfermedades infecciosas e inflamatorias crónicas incluyendo la periodontitis, la otitis media, sinusitis, amigdalitis, endocarditis, úlceras gastrointestinales, infecciones del tracto urinario e infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, entre otras (Reisner y col., 2005; Sauer y col., 2007; Lewis, 2008; Jensen y col., 2010).

La importancia de las biopelículas en la microbiología clínica, radica significativamente en la disminución de la susceptibilidad a los antimicrobianos que presentan las bacterias que adoptan este fenotipo y a su mayor capacidad para evadir los sistemas de defensa del hospedador (Reisner y col., 2005; Sauer y col., 2007; Lewis, 2008; Jensen y col., 2010). La mayoría de las infecciones humanas asociadas a este modo de crecimiento bacteriano están causadas por sistemas monoespecie, siendo éstos los más estudiados (O'Toole, 2004).

Asimismo, las bacterias que constituyen las biopelículas han demostrado tener la capacidad de resistir a los antibióticos y biocidas en concentraciones de 100 a 1000 veces mayores que las bacterias en fase planctónica (El-Azizi y col., 2005). Esta mayor resistencia se atribuye a la dificultad que podrían tener los agentes antimicrobianos de penetrar a los estratos más profundos de la biopelícula, a la disminución del metabolismo bacteriano así como a la generación de células persistentes (Anderson y O'Toole, 2008).

## 4.2 FORMACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

La formación de las biopelículas ocurre como un proceso continuo de acuerdo con varias fases de desarrollo i) acondicionamiento, ii) adhesión, iii) síntesis de matriz extracelular, iv) maduración y v) dispersión, lo que conlleva a la formación de una estructura uniforme en forma de depósitos homogéneos y acumulaciones celulares viscosas rodeadas de una matriz de polímeros que forman canales para la circulación de agua y nutrientes (Castrillón y col., 2010; López y col. 2010).

### i) Fase de acondicionamiento

Durante la fase de acondicionamiento, los componentes orgánicos del medio ambiente o de los tejidos bien sea biótico o abióticos, forman una cubierta que neutraliza la carga aniónica excesiva de la superficie, dando inicio a la fase de adhesión. Es importante resaltar que la interacción inicial entre las bacterias y superficies inertes, como material protésico, puede ocurrir tanto en un material virgen como en un material cubierto con macromoléculas derivadas del hospedador (Vila y col., 2008). Las macromoléculas de fluidos corporales se adsorben extremadamente rápido sobre los materiales implantados en el cuerpo formando una película condicionante (Gorman y Jones, 2003).

### ii) Fase de adhesión

Los microorganismos libres o conocidos como en estado planctónico, forman una capa que se adsorbe a la superficie por periodos cortos. Este fenómeno es conocido como fase de adhesión y ocurre pasivamente por movimiento browniano y simple sedimentación o por movimiento activo de bacterias flageladas, lo que permite el establecimiento de interacciones físicas y electrostáticas entre la superficie bacteriana y el sustrato (Lindsay y von Holy, 2006).

Por otra parte, los microorganismos en suspensión se agregan y ocurre la adhesión de las células bacterianas de forma reversibles a la superficie condicionada, bien sea de la misma especie o multiespecie (co-agregación), este proceso es favorecido por varios componentes bacterianos como los pili, flagelos y polímeros superficiales como el lipopolisacárido en

bacterias gramnegativas. En el caso de bacterias grampositivas no móviles, son las proteínas de superficie las que intervienen en los procesos de adhesión venciendo las fuerzas de repulsión. Las propiedades fisico-químicas de la superficie pueden ejercer gran influencia en el grado y extensión de la adhesión, los microorganismos se adhieren más rápidamente a superficies hidrófobas, no polarizadas como plásticos, en comparación con superficies hidrofílicas como el vidrio o el metal (Nazar, 2007; Castrillón y col., 2010; López y col., 2010).

### **iii) Síntesis de matriz extracelular**

El cambio desde la adhesión reversible a irreversible se produce por la transición desde una interacción débil de la célula con el sustrato hasta un enlace permanente, frecuentemente mediado por la presencia de polímeros y apéndices extracelulares. Una vez que se logra la adhesión, las células se dividen y colonizan la superficie hasta formar microcolonias. Este proceso es muy importante, pues cuando se alcanza una densidad celular límite, la concentración de moléculas autoinducidas liberadas al medio extracelular alcanzan el nivel umbral y se establece la regulación de la formación de la biopelícula mediante la comunicación célula a célula (*quorum sensing*) (Herrera, 2004; Lasa y col., 2005; Castrillón y col., 2010; López y col., 2010).

Bajo estas circunstancias, los microorganismos que forman la biopelícula comienzan a secretar sustancias poliméricas extracelulares (ESP) las cuales se sintetizan para constituir la matriz de la biopelícula o mejor conocida como matriz extracelular o glucocalix. La composición de estas sustancias suelen ser polisacáridos extracelulares que varían desde alginato en *Pseudomonas aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, rico en galactosa en *Vibrio cholerae* y poli-N-acetilglucosamina en *Staphylococcus aureus* (Herrera, 2004; Lasa y col., 2005; Castrillón y col., 2010; López y col., 2010).

En muchas especies, esta matriz extracelular es predominantemente aniónica y crea un sistema eficiente para atrapar y concentrar nutrientes esenciales y minerales del entorno, lo que le aporta cierto grado de protección contra amenazas del ambiente que lo rodea como biocidas, antibióticos, anticuerpos, surfactantes, bacteriófagos y predadores externos como los

leucocitos. Esencialmente este biopolímero crea un ambiente tridimensional que rodea, ancla y protege las bacterias unidas, generando una colonización irreversible (Herrera, 2004; Lasa y col., 2005; Castrillón y col., 2010; López y col., 2010).

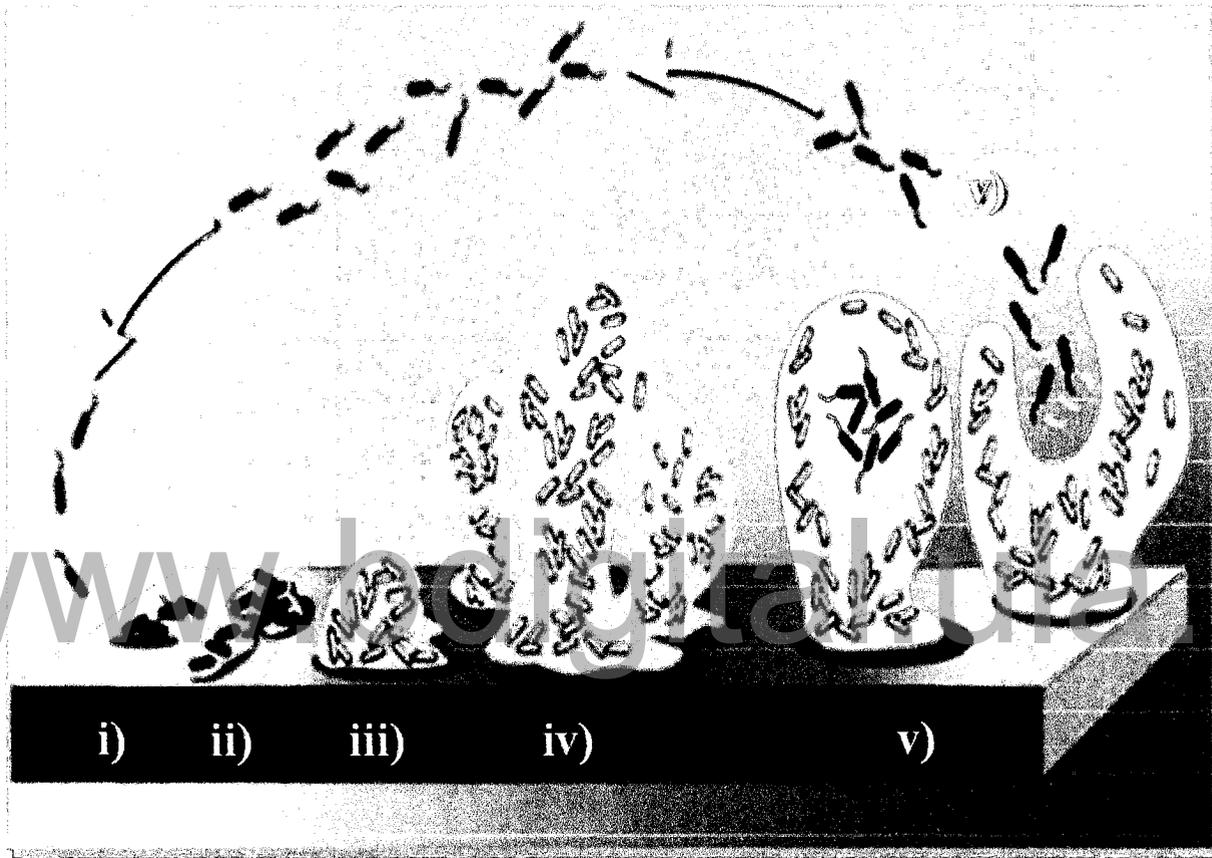
#### **iv) Maduración de la biopelícula**

La siguiente etapa del desarrollo de la biopelícula corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. La densidad global y la complejidad de la biopelícula aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante (Lindsay y von Holy, 2006).

#### **v) Dispersión**

Finalmente, después de la maduración de la biopelícula, ocurre la dispersión por células aisladas o en conglomerados que colonizan nuevas superficies y se inicia un nuevo ciclo de formación de biopelículas. Existen diferencias en las características de las células que se desprenden, ya que las células sésiles (adheridas) pueden conservar la funcionalidad de la biopelícula como lo es la resistencia a antibióticos, en cambio, las células aisladas pueden tener el fenotipo planctónico (libre) y ser susceptible a los mecanismos de defensa del hospedero (Fig. 5) (Lindsay y von Holy, 2006).

Inicialmente se pensó que ese proceso era pasivo y dependiente de las fuerzas de arrastre del medio, pero diferentes estudios sugieren que la dispersión es un proceso activo y estrictamente regulado por las células adheridas (Lindsay y von Holy, 2006). Asimismo, las condiciones ambientales interfieren en la dispersión de la biopelícula entre esas se incluyen la disponibilidad de nutrientes, niveles de oxígeno, pH y la presencia de determinados compuestos químicos (Goller y Romeo, 2008).



**Figura 5. Etapas de formación de la biopelícula. i) Acondicionamiento, ii) Adhesión, iii) Síntesis de matriz extracelular, iv) Maduración y v) Dispersión (Tomado de: Balaban y col., 2007).**

## 5. BIOPELÍCULAS EN *S. pneumoniae*

La formación de biopelícula en *S. pneumoniae*, se describió recientemente y poca es la literatura que existe sobre este mecanismo de virulencia, sin embargo se relaciona con los procesos de colonización y producción de enfermedad. Estudios recientes, han demostrado la asociación de este microorganismo y la producción de biopelícula en algunas enfermedades neumocócicas crónicas. Se han detectado cepas de *S. pneumoniae* asociadas a este exopolisacárido, en la superficie de las adenoides, así como en la mucosa nasofaríngea de niños con infecciones recurrentes y crónicas de senos paranasales y del oído medio (Hall-Stoodley y col., 2006; Sanderson y col., 2006; Coates y col., 2008; Hoa y col., 2009; Nistico y col., 2011). De igual forma, se ha puesto de manifiesto la presencia de biopelículas en los pulmones de ratones infectados con neumococo (Sánchez y col., 2010).

### 5.1 MATRIZ EXTRACELULAR DE LA BIOPELÍCULA DE *S. pneumoniae*

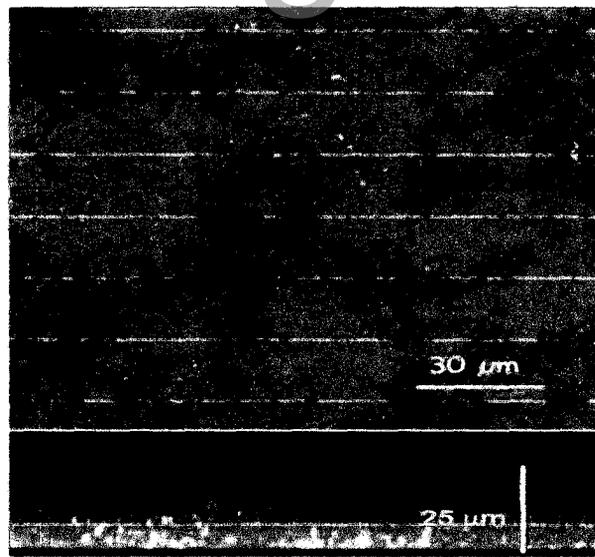
Las células bacterianas en una biopelícula están embebidas en una matriz extracelular que está compuesta por diversas sustancias poliméricas, incluyendo exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Esta matriz determina la arquitectura tridimensional de la biopelícula y proporciona la integridad estructural y la cohesión del mismo. Además, las sustancias poliméricas también contribuyen a: - la resistencia a los antimicrobianos evitando la penetración del fármaco a los estratos más profundos de la biopelícula, - la defensa frente al hospedero ya que impide la fagocitosis por parte del sistema inmune, - la acumulación de nutrientes del medio ambiente y - la eliminación de material celular. Por otra parte, la presencia de ADN en la matriz extracelular facilita la transferencia horizontal de genes entre las células embebidas en la biopelícula (Flemming y Wingender, 2010).

Actualmente, se ha demostrado que la presencia de ADN y de proteínas extracelulares o expuestas en la superficie bacteriana son elementos importantes de la matriz extracelular de la biopelícula de *S. pneumoniae*, necesarios tanto para la adhesión inicial como para el mantenimiento de la biopelícula. De hecho, durante la formación de este exopolisacárido, la adición de ADNasa I y/o proteasas genera un efecto inhibitor y/o desintegrador de la

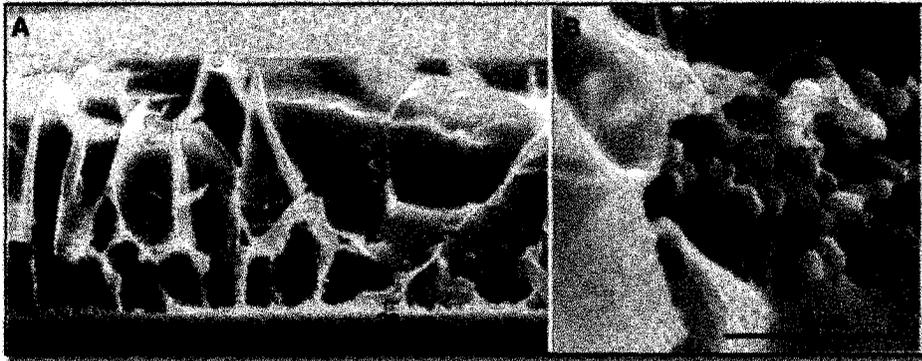
estructura de la biopelícula (Hall-Stoodley y col., 2008; Moscoso y col., 2009; Carrolo y col., 2010).

Moscoso y col, en 2009 estudiaron la formación de biopelículas en neumococo sobre superficies abióticas como poliestireno y vidrio, revelando que este microorganismo forma estructuras tridimensionales de aproximadamente 25–30  $\mu\text{m}$  de espesor. Tales resultados fueron obtenidos en observaciones con microscopio confocal de barrido láser (CLSM) y con microscopio electrónico de barrido a bajas temperaturas.

El estudio mencionado anteriormente, mostró detalles importantes acerca de la estructura de las biopelículas en neumococo. Observando la presencia de pequeños canales que separaban las microcolonias y agrupaciones bacterianas que adoptaban formas semejantes a panales de abeja (Fig. 6 y 7). Presumiendo que tales estructuras proporcionarían estabilidad mecánica a la biopelícula neumocócica y podría servir como un importante factor de virulencia, ayudando a mantener a las bacterias protegidas del sistema inmune del hospedador (Schaudinn y col., 2007; Moscoso y col., 2009).



**Figura 6. Imagen tomada con el microscopio confocal de barrido láser donde se evidencia la viabilidad de una biopelícula de *S. pneumoniae* R6. Las bacterias viables se observan con fluorescencia en verde y las no viables con fluorescencia en rojo (Tomado de: Moscoso y col., 2009).**



**Figura 7. Imagen de microscopía electrónica de barrido a bajas temperaturas de una biopelícula de *S. pneumoniae*. a) Estructuras de biopelícula en forma de panal producida por *S. pneumoniae*. b) Detalle de la zona de la biopelícula en las que las células bacterianas están en el interior de una estructura de panal (Tomado de: Moscoso y col., 2009).**

## 5.2 REGULACIÓN DEL PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOPELÍCULA EN *S. pneumoniae*

La formación de biopelícula por *S. pneumoniae* es regulada a través de una señal peptídica, que interviene en la competencia bacteriana durante el proceso de transformación. Este péptido activador denominado Factor de Competencia o Péptido Estimulador de la Competencia (CSP por sus siglas en inglés), es un péptido de 17 aminoácidos, que se produce por la escisión proteolítica de otro péptido precursor de 41 aminoácidos. En los neumococos la competencia no es constitutiva, sino que está regulada por los productos génicos del operón *com* (Kleerebezem y col., 1997; Cvitkovitch y col., 2003; Moscoso y col., 2009).

Este operón contiene tres genes, el gen *comC*, *comD* y *comE*, directamente implicados en la regulación de la competencia. El gen *comC* codifica la feromona peptídica o autoinductora CSP (induce la transformación genética), el cual es polimórfico y posee dos variantes alélicas el *comC1* y *comC2*, lo que genera dos fenotipos el CSP-1 y el CSP2, respectivamente (Martin y col., 2000; Vestheim y col., 2011).

El gen *comD* codifica una proteína transmembranal denominada histidina quinasa (ComD) y el gen *comE* media la producción de una proteína que funciona como un regulador transcripcional (ComE). A esta última proteína se le atribuye dicha función debido a que media la expresión de los productos ComCDE, ComAB y ComX. Existe otro operón denominado *comAB* (producto ComAB), que codifica un casete ATP transportador (ComA) y una proteína accesoria a ComA (ComB), regulada por los productos secretores ComA y ComB. Estas proteínas accesorias están involucradas en el procesamiento y secreción del péptido CSP (Martin y col., 2000; Cvitkovitch y col., 2003).

La figura 8, representa un esquema del desarrollo de la competencia en el neumococo y de los genes implicados en ese proceso. El péptido CSP (codificado por *comC*) es activado y luego secretado por el sistema de transporte ComAB al exterior de la célula, este ciclo se repite hasta alcanzar un umbral que es percibido por el receptor de CSP (Havarstein y col., 1997; Whatmore y col., 1999).

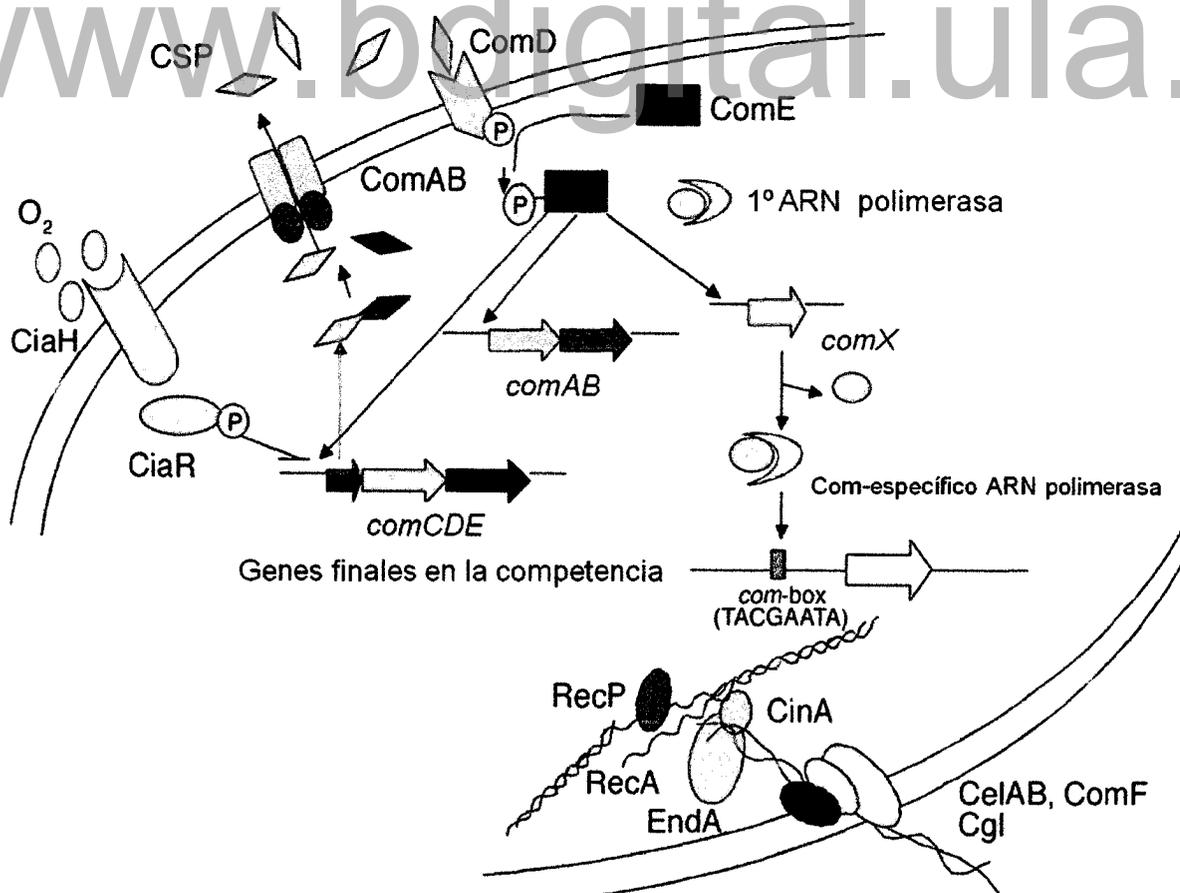


Figura 8. Esquema simplificado del desarrollo de la competencia en *S. pneumoniae* (Tomado de: Cvitkovitch y col., 2003).

La proteína ComD, unida a la membrana citoplasmática actúa como el receptor del CSP, que a su vez activa a ComE por transferencia de un grupo fosfato al módulo receptor conservado de este regulador de respuesta. De igual manera, activa al regulador *comX*, un modulador de la transcripción global, que actúa como un factor sigma alternativo. Este factor sigma inicia la transcripción de operones específicos de la competencia implicados en la captación de ADN y la recombinación mediante el reconocimiento de un *com-box* que comparten una secuencia consenso no habitual en sus regiones promotoras (TACGAATA). (Cheng y col., 1997; Cvitkovitch y col., 2003; Luo y Morrison, 2003). La homeostasis de este mecanismo es dado por un segundo sistema regulador de dos componentes, CiaH-CiaR, el cual afecta al desarrollo de la competencia mediante la regulación negativa *comCDE* expresión (Cvitkovitch y col., 2003).

Por otra parte, se ha demostrado que el sistema de quórum puede influir en la producción de biopelículas en especies del género *Streptococcus*. Este hecho fue demostrado en cepas mutantes de *Streptococcus gordonii* portador del transposón Tn916, donde se observó la producción defectuosa de biopelícula debido a una alteración en el gen *comD* por la inserción del transposón. El gen *comD* codifica la proteína transmembranal histidina quinasa receptora del péptido autoinductor CSP necesaria para la competencia (Li y col., 2002; Cvitkovitch y col., 2003). Asimismo, se ha demostrado que la inactivación de cualquiera de los genes que codifican los componentes del sistema ComCDE en cepas de *Streptococcus mutans* genera biopelículas defectuosas. En particular, al deleccionar el gen *comC*, la cepa mutante es incapaz de producir o secretar el péptido señal (CSP), formando una biopelícula que carece de arquitectura, mientras que los mutantes con alteración en el gen *comD* generan biopelículas con disminución en la biomasa, en vista de que existe una modificación en la proteína transmembranal, encargada de reconocer el péptido señal. Este hecho demuestra que la percepción de quórum para la competencia está asociado con la producción de biopelículas en cepas del género *Streptococcus* (Cvitkovitch y col., 2003).

### 5.3 LAS BIOPELÍCULAS Y LA TRANSFORMACIÓN EN *S. pneumoniae*

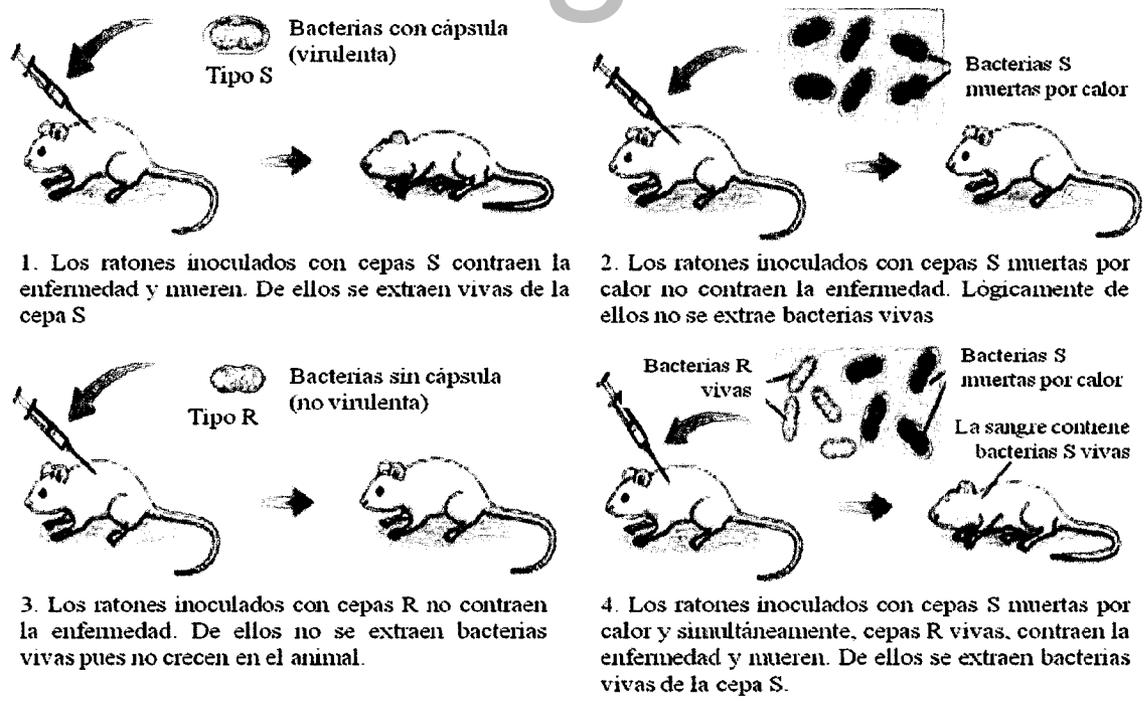
La transferencia horizontal de genes mediada por la transformación es crítica para la evolución bacteriana. Esta facilita y acelera la aparición de nuevos rasgos de virulencia y permite la propagación de la resistencia a los antimicrobianos. La transformación genética es un proceso a través del cual una célula capta ADN extracelular que se encuentra en el medio circundante y lo incorpora en su citoplasma. Eventualmente, el ADN exógeno se combina con el ADN cromosómico, agregando la nueva información genética (Lorenz y Wackernagel, 1994; Koneman y col., 2006; Murray y col., 2006).

La primera demostración de la existencia de la transformación bacteriana fue a través de un experimento *in vivo*, realizado en 1928 por el bacteriólogo inglés Fred Griffith. Este investigador inoculó cepas de *S. pneumoniae* avirulentas (formas R) y virulentas (formas S) muertas por calor, en ratones sanos. Luego, los ratones enfermaron y murieron, por lo que, Griffith concluyó que las formas R avirulentas habían adquirido la capacidad de virulencia de las formas S. A este proceso se le denominó transformación (Fig. 9) (Lorenz y Wackernagel, 1994; Marks y col., 2012). Finalmente, en 1944 Oswald Avery y sus colegas en el Instituto Rockefeller en Nueva York, demostraron que el principio transformador descrito por Griffith era el ADN (Morison, 1997).

La transformación no es un rasgo presente en todas las cepas de neumococo, sino que existen cepas que son naturalmente no competentes. La competencia es regulada estrictamente por el mecanismo de *quorum sensing*. Al parecer, la presencia de capsula tiene una influencia importante en la transformación, ya que, en las cepas sin capsula la competencia es más común que en las cepas capsuladas (Morison, 1997). De igual manera, las cepas de laboratorio avirulentas e hipercompetentes descendientes de los experimentos originales de Avery, son más competentes que los aislados clínicos. Por tal motivo, en los experimentos de transformación artificial, se induce la competencia con el uso de altas concentraciones del CSP (Marks y col., 2012; Wei y Havarstein, 2012).

Es posible que la dificultad para lograr la transformación en cepas clínicas se deba a defectos en la secreción del CSP o, a la captación del mismo dentro de los polisacáridos capsulares. Las dificultades para la transformación también podrían estar relacionadas con la existencia de dos variantes alélicas del CSP (CSP-1, CSP-2). Las cepas con una variedad alélica constituyen un ferotipo que, al parecer, solo establece transferencia genética con cepas del mismo ferotipo (Lorenz y Wackernagel, 1994; Morison, 1997; Whatmore y col., 1999; Wei y Havarstein, 2012).

Durante la colonización nasofaríngea, los neumococos se organizan en comunidades multicelulares, encerradas en una matriz polimérica de producción propia. Los estudios epidemiológicos sugieren que entre las cepas de neumococos que colonizan la nasofaringe, se realiza la mayor transferencia horizontal de genes de resistencia y de serotipo capsular. Aunque la transferencia horizontal de genes se asocia principalmente con la colonización por neumococos, poco se ha hecho para abordar el papel del medio ambiente, el proceso de enfermedad y otros factores que podrían afectar la eficiencia de la transformación en *S. pneumoniae* (Marks y col., 2012).



**Figura 9. Experimento de transformación llevado a cabo por Griffith en el año 1928. (Tomado de: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema19.pdf> ).**

## 6. METODOLOGÍA PARA EL ESTUDIO DE LAS BIOPELÍCULAS

Existe una gran cantidad de condiciones experimentales que favorecen la formación de las biopelículas. Como consecuencia de la diversidad de técnicas y de microorganismos como objeto de estudio, además de la necesidad de reproducibilidad de los experimentos entre distintos laboratorios. Se han empleado en la investigación principalmente cuatro sistemas generales: i) cultivos continuos asociados a visualizaciones por microscopía confocal (reactor), ii) cultivos estáticos en placas poliestireno, iii) obtención de biopelículas flotantes en interfase líquido-aire y iv) visualización de la morfología de colonias en la superficie de medios sólidos (Branda y col., 2005).

El aumento en el conocimiento de las biopelículas ocurre paralelamente a la implementación de nuevos métodos de estudio. Actualmente, los métodos más utilizados comprenden técnicas de observación directa con la visualización microscópica de la biopelícula o técnicas de observación indirecta con método convencional de recuentos bacterianos o el uso de indicadores de metabolismo (Donlan y col., 2002).

Las técnicas que se basan en la observación directa de la adherencia y colonización microbiana utilizan microscopios ópticos, confocales o electrónicos, permitiendo evaluar las características estructurales de las biopelículas. Los primeros consisten en la opción más antigua y asequible para estudio del exopolisacárido y es considerada una de las más versátiles pese a que presente limitaciones como la necesidad de tinción y/o fijación de las muestras y consecuente muerte de los microorganismos, producción de artefactos e imposibilidad de estudiar la estructura tridimensional de la biopelícula (Christensen y col., 2000).

La microscopía confocal suprime varias de las limitaciones de la microscopía óptica, los microscopios confocales combinan la iluminación láser, las imágenes, el uso de objetivos apocromáticos y el procesamiento de las imágenes por ordenador, que genera reconstrucciones tridimensionales del espécimen visualizado. De esta manera se puede estudiar la arquitectura de la biopelícula, las interacciones entre las bacterias y la superficie, y con el uso combinado de determinados marcadores se evidencia y se cuantifica el contenido de células viables o componentes de la matriz celular *in situ* (Christensen y col., 2000).

La microscopía electrónica puede ser de transmisión y de barrido, en ambos casos se necesita la preparación previa de las muestras, lo que podría generar artefactos o distorsiones en la estructura normal de una biopelícula. Por otra parte, destruye los microorganismos y no proporcionan informaciones sobre la viabilidad celular, sin embargo es útil para observar la estructura de la biopelícula. Aunque presenta dichas limitaciones, el microscopio electrónico de barrido permite la cuantificación de microorganismos adheridos a superficies opacas como plásticos, metales, cerámicas o catéteres, lo que sería difícil realizar por los otros métodos. A pesar de las grandes ventajas que ofrece el uso de la microscopía electrónica, esta técnica no se usa comúnmente por su alto costo en reactivo, equipos y la necesidad de un personal altamente calificado (Christensen y col., 2000).

Por otra parte, los métodos indirectos permiten la cuantificación de microorganismos adheridos a superficies por su retirada en etapas abrasivas con rascados, agitación o sonicación de los materiales y posterior dilución y recuentos bacterianos. Las principales limitaciones residen en el hecho de que esas técnicas no permiten el análisis de la estructura de la biopelícula. Las etapas abrasivas podrían arrojar resultados falsos, debido a la disminución del número de células viables tomando en consideración de que no todos los microorganismos de la biopelícula son cultivables (Lindsay y von Holy., 2006).

La utilización de tinciones y de indicadores metabólicos se presenta como alternativa viable para el estudio y cuantificación de la formación de biopelículas por diversos microorganismos (Christensen y col., 2000). Estos ensayos son ejecutados en placas de poliestireno para determinar tanto la biomasa total (matriz, células vivas y muertas), componentes específicos de la matriz por su tinción o para la cuantificación de viabilidad (Peeters y col., 2008).

Los estudios que miden la biomasa total tienen limitaciones en los análisis de disrupción de biopelículas, en vista de que no permiten la diferenciación entre células viables y muertas, lo que dificulta la evaluación de la acción de antimicrobianos contra las bacterias asociadas a la biopelícula. Para la discriminación entre células viables y muertas se emplean técnicas que cuantifican la actividad metabólica con tinciones vitales como las sales de tetrazolio, diacetato de fluoresceína y resazurina o azul de alamar (Peeters y col., 2008).

El uso del azul de alamar fue descrito por Drummond y Waigh en el año 2000 y desde entonces viene siendo modificado, con el objetivo de mejorar su precisión y aplicabilidad en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversos compuestos (Sarker y col., 2007). Este método permite determinar la viabilidad en sistemas de cultivo planctónico o sésil, por lo que se considera un método fiable, reproducible y con una excelente correlación con la determinación de los recuentos bacterianos. Las principales limitaciones del método son la sensibilidad del colorante-vital a la luz y al calor y alto costo. Sin embargo, son condiciones fácilmente controlables en el laboratorio (Pettit y col., 2005).

En orden general, la comunidad científica se ha abocado a utilizar una variedad de enfoques para desarrollar *in vitro* las biopelículas de patógenos humanos con la finalidad de obtener una herramienta adecuada que simule el ambiente de la infección *in vivo*. En 1997, se describió el primer sistema *in vitro* para el estudio de las biopelículas de neumococo, y su vinculación con la susceptibilidad a los antimicrobianos y se basó en el uso de filtros de celulosa llamados Sorbarods (Budhani y Struthers, 1997). Para el año 2001, el crecimiento de neumococo se realizó sobre filtros Sorbarod en un sistema de cultivo continuo para imitar las condiciones que se producen durante la colonización nasofaríngea (Waite y col., 2001).

Más recientemente, se han desarrollado reactores biológicos para poder estudiar así el proceso de formación de biopelícula *in situ* en tiempo real (Donlan y col., 2004; Goeres y col., 2005). Del mismo modo, se ha utilizado un sistema de cultivo continuo a través de una celda de flujo para describir la adaptabilidad de *S. pneumoniae* a múltiples fenotipos a lo largo del desarrollo de la biopelícula. A pesar de las ventajas que ofrecen estas técnicas para la visualización y cuantificación de las biopelículas, poseen desventajas en vista del alto costo de los equipos, su mantenimiento, los reactivos a utilizar, así como la necesidad de un personal calificado para maniobrarlo (Allegrucci y col., 2006).

El sistema estático para la producción de biopelícula más empleado, reproduce el crecimiento bacteriano en medios líquidos sobre placas de poliestireno. Este sistema permite evaluar el efecto de diversos factores ambientales en el desarrollo de las biopelículas y la detección rápida de mutantes defectivos en su formación (Moscoso y col., 2006; Muñoz y col., 2008). En esta técnica la formación de biopelícula es detectada con el uso de colorantes y la

medición de densidades ópticas por espectrofotometrías. Las densidades ópticas expresan la cantidad de exopolisacárido formado, así como la masa de células embebidas en la biopelícula. Este método es relativamente más económico, fácil de realizar y reproducible en comparación con las técnicas descritas previamente (Pitts y col., 2003).

Otro aspecto a considerar para la formación de biopelícula, son los medios de cultivos y/o requerimientos nutricionales de cada microorganismo en particular. Así, por ejemplo, la adición de glucosa favorece la producción de biopelícula en algunas especies de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, entre otras. A ese respecto, se cree que existen regiones de consenso de la familia de reguladores transcripcionales como en el caso de *araC/xylS* en los *Staphylococcus*, regulador que modula la formación de biopelícula en respuesta a la glucosa (Lim y col., 2004).

www.bdigital.ula.ve

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Se analizó una colección de 15 cepas de *S. pneumoniae* obtenidas durante un estudio de colonización de niños menores de 5 años, realizado en el Municipio Libertador de la Ciudad de Mérida del estado Mérida, entre Enero y Agosto de 2007 (Quintero, 2011). El aislamiento y la identificación de las cepas, así como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) a los antimicrobianos fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (2003), así como las recomendaciones y puntos de corte sugeridos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Por otra parte, la serotipificación y los estudios moleculares de las cepas se llevaron a cabo en el Laboratory of Pediatric Infectious Diseases UMC, Saint Radboud, Nijmegen, Holanda y en el Centro Nacional de Referencia para los Estreptococos, Alemania (Quintero y col., 2011). El resto de los estudios fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular de la facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

La identificación genética de las cepas de *S. pneumoniae* se realizó mediante la detección del gen *lytA*, a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés "*polymerase chain reaction*") utilizando los oligonucleotidos, mezcla de reactivos y condiciones de amplificación descritos por Nagai y col., (2001). La relación de las cepas en estudio con los clones internacionales de neumococo se exploró mediante la técnica de secuenciación de múltiples locus (MLST del inglés "*multi-locus sequence typing*") el cual fue realizado siguiendo las instrucciones de Enright y Spratt, (1998). Luego los tipos de secuencias (ST) y los clones internacionales fueron identificados comparando las secuencias obtenidas por MLST con la base de datos disponible en la página web de la red epidemiológica molecular

del neumococo (PMEN del inglés "*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*") <http://spneumoniae.mlst.net> (Quintero y col., 2011).

Las características fenotípicas y genéticas de las cepas se muestran en la tabla 2. Las 15 cepas fueron multirresistentes a drogas (resistentes a 3 o más clases de antimicrobianos). Los serotipos capsulares expresados por las cepas estudiadas fueron el serotipo 6B (5 cepas), 14 (4 cepas), 19F (1 cepa) y 23A (2 cepas), y otras 3 cepas fueron no tipificables. Con respecto a su relación con los clones internacionales de neumococo, las cepas no tipificables tenían SLV/DLV de la ST1106 y estaban relacionadas con el clon de cepas sin cápsula NCC1 (del inglés "*Null Capsule Clade*") descrito por Park y col. (2012). Las otras cepas poseían ST relacionadas con los clones PMEN Tennessee<sup>23F</sup>-4, England<sup>14</sup>-9, Taiwan<sup>19F</sup>-14 y Spain<sup>6B</sup>-2 (Quintero y col., 2011).

**Tabla 2. Serotipos, perfiles de resistencia y secuencias tipo de las cepas de**

*S. pneumoniae.*

Nº	Cepa	Serotipo	Perfil de resistencia	Secuencia tipo (MLST)	Relación con clon internacional PMEN o NCC
1	I-29	NT	Pi, E, T, T/S	5168	SLV de la ST 1106 – Clon NCC1
2	I-34	NT	Pi, E, T, T/S	4837	DLV de la ST 1106 – Clon NCC1
3	H-22	NT	Pi, E, T, T/S	4836	SLV de la ST 1106 – Clon NCC1
4	I-121	6B	P, CXM, CRO, FEP, E, T, MEM, ERT, CD, T/S	90	Spain <sup>6B</sup> -2
5	H-64	6B	P, E, CD, C, T, T/S	135	Por clasificar
6	H-141	6B	P, E, CD, C, T, T/S	135	Por clasificar
7	H-183	6B	P, E, CD, T, T/S	135	Por clasificar
8	H-222	6B	P, C, T/S	135	Por clasificar
9	H-12	14	P, E, CD, C, T, T/S	15	SLV del Clon PMEN England <sup>14</sup> -9
10	H-95	14	E, CD, T/S	15	SLV del Clon PMEN England <sup>14</sup> -9
11	H-215	14	E, CD, T/S	15	SLV del Clon PMEN England <sup>14</sup> -9
12	I-206	14	E, CD, T/S	15	SLV del Clon PMEN England <sup>14</sup> -9
13	I-248	19F	P, MEM, ETP, E, CD, T, T/S	5167	SLV del Clon PMEN Taiwan <sup>19F</sup> -14
14	I-76	23A	E, CD, T, T/S	42	DLV del Clon PMEN Tennessee <sup>23F</sup> -4
15	I-120	23A	E, CD, T, T/S	42	DLV del Clon PMEN Tennessee <sup>23F</sup> -4

**MLST:** Multi-locus sequence typing. **PMEN:** Clon descrito por la PMEN NCC: Clado de cápsula nula descrito por Park y col, 2012. **NT:** No Tipificable. **Pi:** Penicilina con nivel intermedio de resistencia. **E:** Eritromicina. **Cd:** Clindamicina. **T:** Tetraciclina, **T/S:** Trimetoprim-Sulfametoxazol. **CXM:** Cefuroxime, **CRO:** Ceftrizoxone, **FEP:** Cefepime, **MEM:** Meropenem, **ETR:** Ertapenem, **C:** Cloranfenicol, **SLV:** Variante de un solo locus (*single locus variant*). **DLV:** Variante de doble locus (*double locus variant*) (Quintero y col., 2011).

## 2. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

### 2.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO

La evaluación del crecimiento se realizó en 6 cepas pertenecientes a tres clones neumocócicos: PMEN England<sup>14</sup>-9 (cepas H-95 y H-215), PMEN Tennessee<sup>23F</sup>-4 (cepas I-76 y I-120) y dos cepas no tipificables SLV/DLV - ST1106 del clon NCC1 (cepas I-34 y H-22).

Se llevaron a cabo varios ensayos del crecimiento. La primera de ellas se realizó en Caldo Todd Hewitt (Himedia®) el cual fue preparado siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Para las siguientes evaluaciones, sobre el Caldo Todd Hewitt se añadieron las siguientes sustancias: glucosa (0,4%); y sangre de carnero lisada y centrifugada (5%). Tales compuestos fueron adicionados por separado y en combinación siguiendo el esquema mostrado en la tabla 3. Luego de la preparación de los medios, el pH fue revisado y ajustado a 7,8, como recomienda la casa comercial para el Caldo Todd Hewitt. Finalmente, se siguieron los procesos de esterilización y vaciado de los medios, así como los controles de calidad de esterilidad y crecimiento.

**Tabla 3. Esquema para la adición de sustancias al Caldo Todd Hewitt utilizado en las evaluaciones de la cinética de crecimiento.**

<b>Evaluación</b>	<b>Sustancia añadida</b>
1	Ninguna (solo caldo Todd Hewitt)
2	Glucosa (0,4%)
3	Sangre de carnero lisada (5%.)
4	Glucosa (0,4%) y sangre de carnero lisada (5%.)

Para la sangre se utilizó la concentración recomendada en la preparación de medios de cultivo descritas para bacterias del género *Streptococcus* (Gerhardt y col., 1994). Para definir la concentración de glucosa, se realizó un ensayo piloto en caldo Todd Hewitt, al cual se añadieron diferentes concentraciones del carbohidrato entre 0,1% a 0,6%. Para ello, se utilizaron tres cepas de *S. pneumoniae*, dos capsuladas pertenecientes al clon Spain<sup>6B</sup>-2 (cepa I-121, serotipo 6B), clon Taiwan<sup>19F</sup>-14 (cepa I-248, serotipo 19F) y un *S. pneumoniae* acapsular del clon NCC1 (cepa I-29). El procedimiento utilizado para este estudio fue el mismo que se describe posteriormente para la evaluación del crecimiento. Los resultados obtenidos (datos no mostrados) revelaron que se obtuvo un mayor crecimiento de las cepas con la adición de glucosa al 0,4%, que con cualquiera de las otras concentraciones de glucosa evaluadas.

## **2.2 REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS Y PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO**

Las cepas se mantuvieron congeladas a -20°C en viales con 1 mL de leche descremada al 20%, hasta el comienzo de la investigación. La reactivación de las cepas se realizó inoculando 100 µL de cada vial en tubos con 5 mL de caldo Todd Hewitt. Los tubos se colocaron en microaerofilia y se incubaron a 37°C por 48 horas. Luego se colocaron 30 µL de cada caldo en placas de agar Columbia (Himedia®) suplementadas con 5% de sangre de carnero, se estriaron y se incubaron en microaerofilia a 37°C por 24 horas. En esta etapa se examinó la pureza de los cultivos, para lo cual se revisaron la morfología colonial, la tinción de Gram y la susceptibilidad a la optoquina.

Finalmente, el crecimiento total del microorganismo obtenido en una placa de agar sangre fue inoculado en un tubo con 7 mL de caldo Todd Hewitt e incubado en microaerofilia a 37°C durante 24 horas. Los inóculos bacterianos utilizados para la evaluación del crecimiento, se prepararon en los diferentes medios de cultivo en estudio. Para ello se prepararon suspensiones bacterianas transfiriendo 1 mL del cultivo anterior, en un tubo con 5 mL del caldo a evaluar. Para conocer la densidad celular de la suspensión bacteriana se colocaron 200 µL del caldo en un pozo de una placa de poliestireno de fondo plano y se leyeron las densidades ópticas en un espectrofotómetro (Microplate Reader model 550 Bio-Rad) a 595 nm. Luego, se obtuvo una

concentración celular uniforme del Inóculo bacteriano para todas las cepas, diluyendo la suspensión bacteriana hasta lograr igualar las densidades ópticas (DO), utilizando como solvente el medio de cultivo correspondiente (Fig.10). La dilución se realizó utilizando la fórmula siguiente:

$$\text{Factor de dilución (FD)} = \frac{\text{Concentración concentrada (Cc)}}{\text{Concentración diluida (Cd)}}$$

$$\text{Volumen requerido (Vr)} = \frac{\text{Volumen final (Vf)}}{\text{FD}}$$

$$\text{Volumen del solvente a utilizar} = \text{Vf} - \text{Vr}$$

www.bdigital.ula.ve

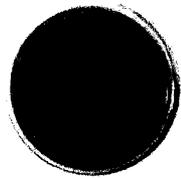
Cepas de *S. pneumoniae* congeladas -20°C  
(Leche descremada)

↓ 100 µL



Caldo Todd Hewitt  
Microaerofilia  
(37°C x 48h)

↓ 30 µL



Microaerofilia  
(37°C x 24h)



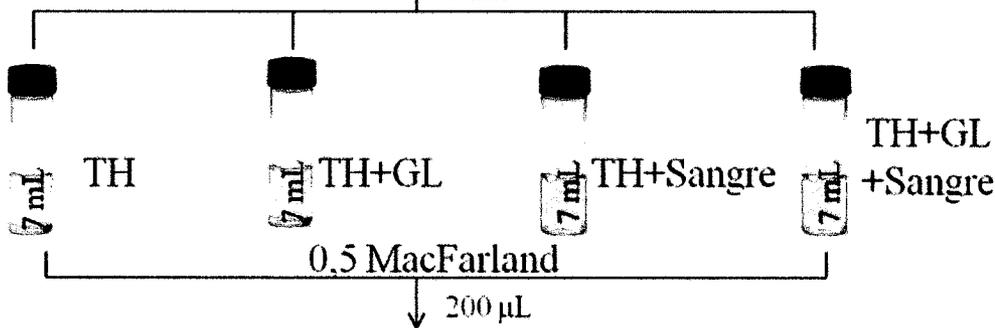
- Morfología colonial  
- Coloración de Gram  
- Susceptibilidad Optoquina

Todo el crecimiento  
en placa



1 mL de la  
Suspensión bacteriana

Caldo Todd Hewitt  
Microaerofilia  
(37°C x 48h)



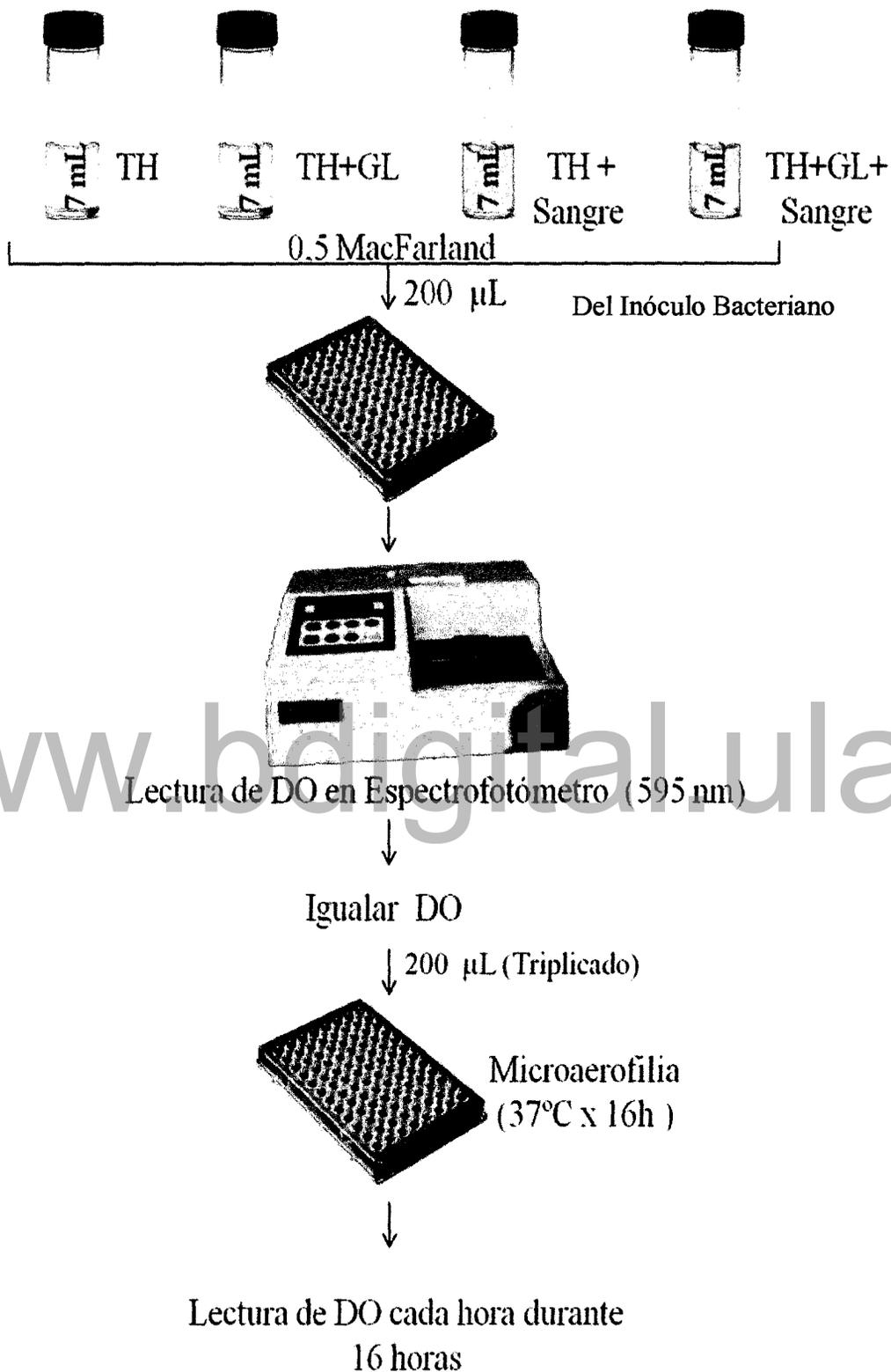
Lectura DO en Espectrofotómetro

Figura 10. Esquema para la reactivación de las cepas y preparación del Inóculo bacteriano.

## 1.1 EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO

Finalmente, el crecimiento bacteriano se determinó por la densidad celular, a través de la medición de las densidades ópticas en un espectrofotómetro a 595 nm. Para ello, en una placa de poliestireno se añadieron por separado 200  $\mu\text{L}$  de cada una de las suspensiones bacterianas, este paso se realizó por triplicado. Asimismo, se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de los medios de cultivos sin inocular, lo cuales se utilizaron como blanco control. Posteriormente, la placa fue incubada en microaerofilia durante 16 horas a 37°C y en el transcurso de cada hora se midieron las densidades ópticas. Este ensayo se repitió bajo las mismas condiciones en tres ocasiones diferentes. Los resultados de la cinética de crecimiento se presentaron en gráficos que muestran las densidades ópticas promedio obtenidos en cada medio de cultivo durante las 16 horas evaluadas, representados en DO por tiempo (Fig. 11).

www.bdigital.ula.ve



**Figura 11. Esquema para la evaluación de la cinética de crecimiento.**

## **2. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULAS**

### **2.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO**

La capacidad de formación de biopelículas fue evaluada en las 15 cepas de *S. pneumoniae* utilizando el caldo Todd Hewitt y el caldo Todd Hewitt suplementado con glucosa (0,4%) (Fig. 12).

### **2.2 INÓCULO BACTERIANO Y PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA**

La reactivación de las cepas y la preparación de los inóculos bacterianos se realizaron de la manera descrita previamente para la cinética de crecimiento. De la misma manera se determinó la concentración celular y se realizaron los ajustes para obtener una concentración celular uniforme del Inóculo bacteriano para todas las cepas.

Para la producción de biopelícula, se añadieron 200  $\mu$ L del inóculo bacteriano en un pozo de una placa de poliestireno de fondo plano por triplicado. Este procedimiento se repitió para todas las cepas. Asimismo, se colocó medio de cultivo sin inocular en un pozo como control, por triplicado. Posteriormente, la placa de poliestireno fue incubada en microaerofilia durante 48 horas a 37°C, transcurrido el periodo de incubación, se verificó el crecimiento en el espectrofotómetro a 595 nm.

Para detectar la producción de biopelículas, se descartó el medio de cultivo y la placa fue lavada con agua destilada por inmersión, este paso se repitió tres veces. Luego de lavar la placa, esta se sacudió levemente y se colocó invertida sobre un papel absorbente y se dejó secar durante 20 minutos. Seguidamente, se añadieron 200  $\mu$ L de cristal violeta al 1% en cada pozo por 20 minutos, luego el colorante fue retirado y los pozos lavados por inmersión con agua destilada en tres oportunidades. Finalmente, se dejó secar la placa y se agregaron 200  $\mu$ L de etanol al 95% para disolver la biopelícula y se llevó al espectrofotómetro a 595 nm para medir las densidades ópticas. Estos experimentos se repitieron bajo las mismas condiciones en tres días diferentes.

En esta investigación se utilizó el punto de corte para la formación de biopelícula establecido por Soto y col., (2006). Por lo cual, se consideró que había formación de biopelícula cuando el pozo evaluado tenía densidades ópticas 4 veces por encima de las obtenidas en el pozo control, como se muestra en la fórmula siguiente:

$$J \text{ Punto de corte para la formación de biopelícula} = \text{DO obtenidas en el pozo control} \times 4$$

Los puntos de cortes fueron el resultado del promedio de tres evaluaciones para cada experimento, los cuales se muestran en la tabla 4.

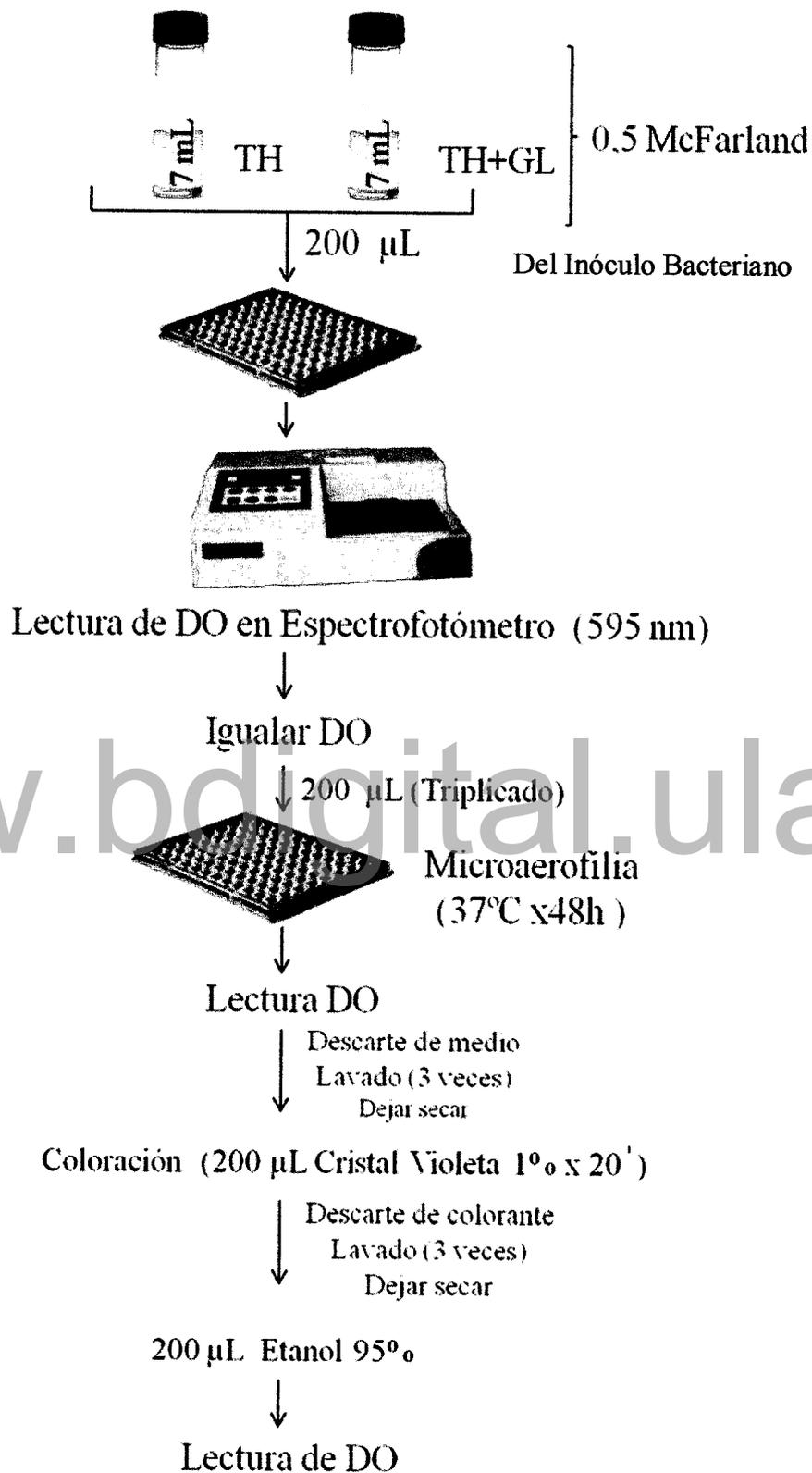
**Tabla 4. Puntos de corte establecidos para la producción de biopelícula en los medios de cultivo utilizados.**

Medio	DO obtenidas en el pozo control*	x	4	Punto de corte para la formación de biopelícula
TH	0,035	x	4	0,140
TH+GL	0,054	x	4	0,216

\*Promedio de las densidades ópticas obtenidas

La cantidad de biopelícula formada se estableció como la proporción de densidades óptica por encima del punto de corte.

$$\text{Cantidad de biopelícula formada (Nº de veces)} = \frac{\text{DO obtenidas en el pozo evaluado}}{\text{Punto de corte}}$$



**Figura 12. Esquema para la producción de biopelículas.**

### 3. INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

#### 3.1 CEPAS BACTERIANAS Y MEDIOS DE CULTIVO

La capacidad para la formación de biopelícula fue inducida por una cepa de *S. pneumoniae* productora del exopolisacárido. Esta fue evaluada a partir del ADN de una cepa acapsular (NCC1) capaz de generar biopelícula y dos cepas capsuladas pertenecientes al clon Spain<sup>6B</sup>-2 (serotipo 6B) y Taiwan<sup>19F</sup>-14 (serotipo 19F), utilizando el caldo Todd Hewitt y el mismo suplementado con glucosa (0,4%).

#### 3.2 EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

Para ello, cada cepa se cultivo en 3 placas de agar sangre y se incubó por 24 horas en microaerofilia a 37°C. El contenido de una placa fue colocada en un tubo con un volumen de 7 mL de caldo Todd Hewitt y se incubó a 37°C en microaerofilia durante 24 horas. El crecimiento completo de las 2 placas restantes se suspendió en 250 µL de agua destilada en un eppendorf. Una vez contenida la muestra en el eppendorf se homogeneizó con un toque de vortex y fue llevada a ebullición en baño de maría durante 20 minutos. Posterior a este paso, se centrifugó a 13.000 rpm por 5 minutos y posteriormente se colocó el sobrenadante, que contenía el ADN bacteriano, en dos tubos eppendorf estériles (Fig. 13).

#### 3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Se realizó una PCR para detectar el gen *lytA*. Las mezclas estuvieron compuestas por oligonucleótidos a 100 pmol/µL (tabla 5); dNTP's a 10mM; MgCl<sub>2</sub> a 25mM; Buffer 10X, agua destilada; *Taq* polimerasa 5 U/µL y 2 µL de ADN. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 y la visualización de los amplicones se realizó mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (Sigma) 0,5 mg/ mL y fotografiados a través del sistema UVP Biodoc-It System. Como marcador del tamaño molecular se utilizó una escalera de 1 Kb (BIONEER). Cada reacción contó con el uso de controles positivos y negativos que aseguraron el buen funcionamiento del equipo y la correcta amplificación de los oligonucleótidos.

**Tabla 1. Condiciones de amplificación para la detección por PCR del gen *lytA***

Etapas	<i>lytA</i>		
	°C	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	1
Desnaturalización	94	15 seg	30
Alineación	53	15 seg	
Extensión	72	15 seg	
Extensión final	72	5 min	1

(Tomado de Nagai y col., 2001).

### 3.4 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE *S. pneumoniae* DETECCIÓN DEL GEN *lytA*

Antes de iniciar los estudios de inducción fue necesario corroborar la identificación genética de todas las cepas en estudio. Para ello se determinó por amplificación de PCR el gen *lytA*. Los iniciadores, mezcla y condiciones de amplificación se llevaron a cabo según lo descrito por Nagai y col. (2001) (Tabla 6). En esta prueba se utilizó como control positivo el ADN de la cepa *S. pneumoniae* ATCC<sub>49619</sub> y como controles negativos, la mezcla de reacción sin ADN y el ADN de la cepa *E. coli* ATCC<sub>25922</sub>. Por otra parte, estos ensayos permitieron determinar la calidad de ADN obtenido para los siguientes ensayos.

**Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados para la detección del gen *lytA***

Gen a detectar	Tamaño Banda (pb)	Oligonucleótido original	Secuencia 5'- 3'	Referencia
<i>lytA</i>	319	681-701	F-CAACCGTACAGAATGAAGCGG	Nagai y col., 2001
		999-978	R-TTATTCGTGCAATACTCGTGCG	

(Tomado de Nagai y col., 2001).

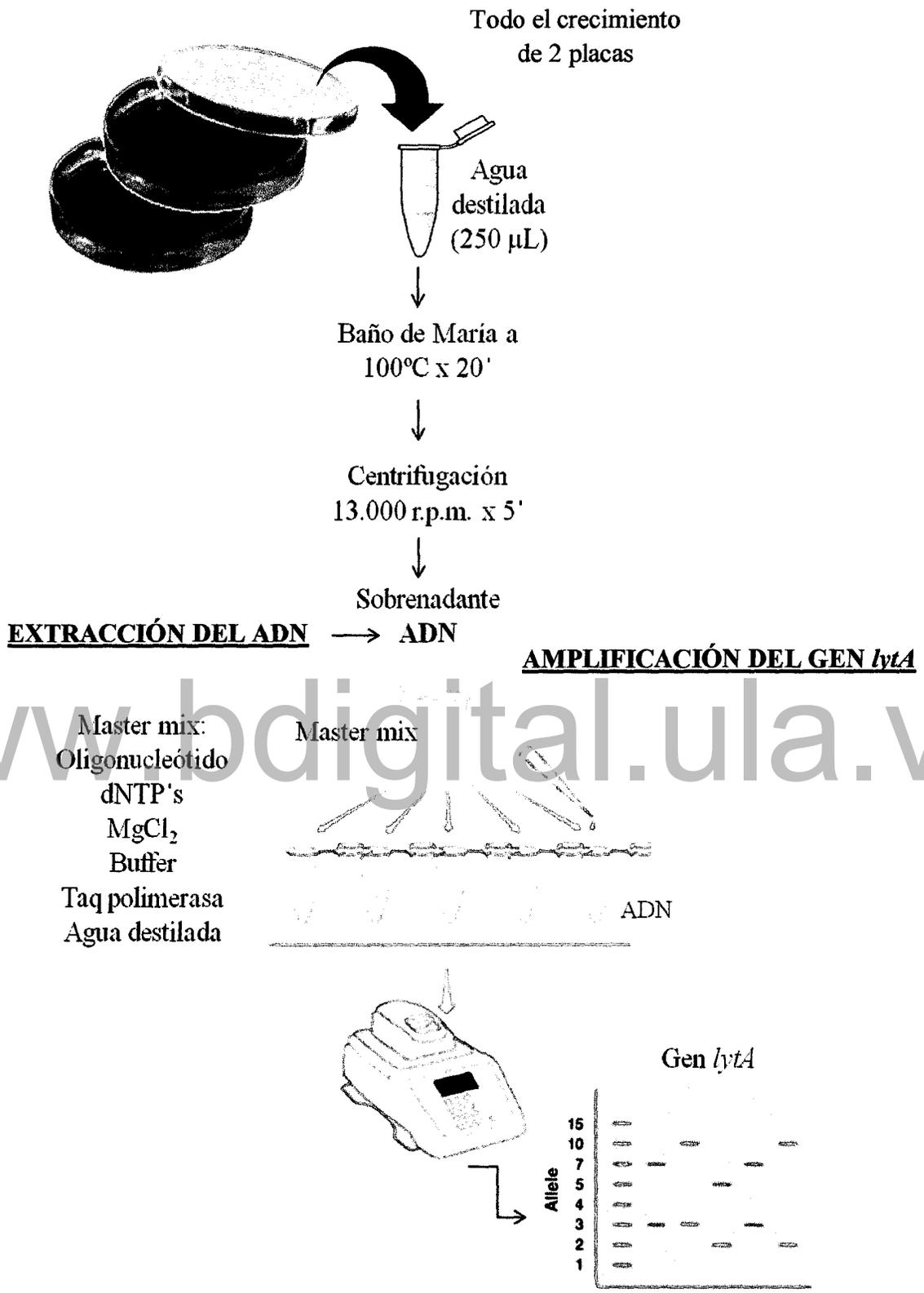


Figura 13. Esquema para la extracción del ADN genómico y detección del gen *lytA* en las cepas de *S. pneumoniae*.

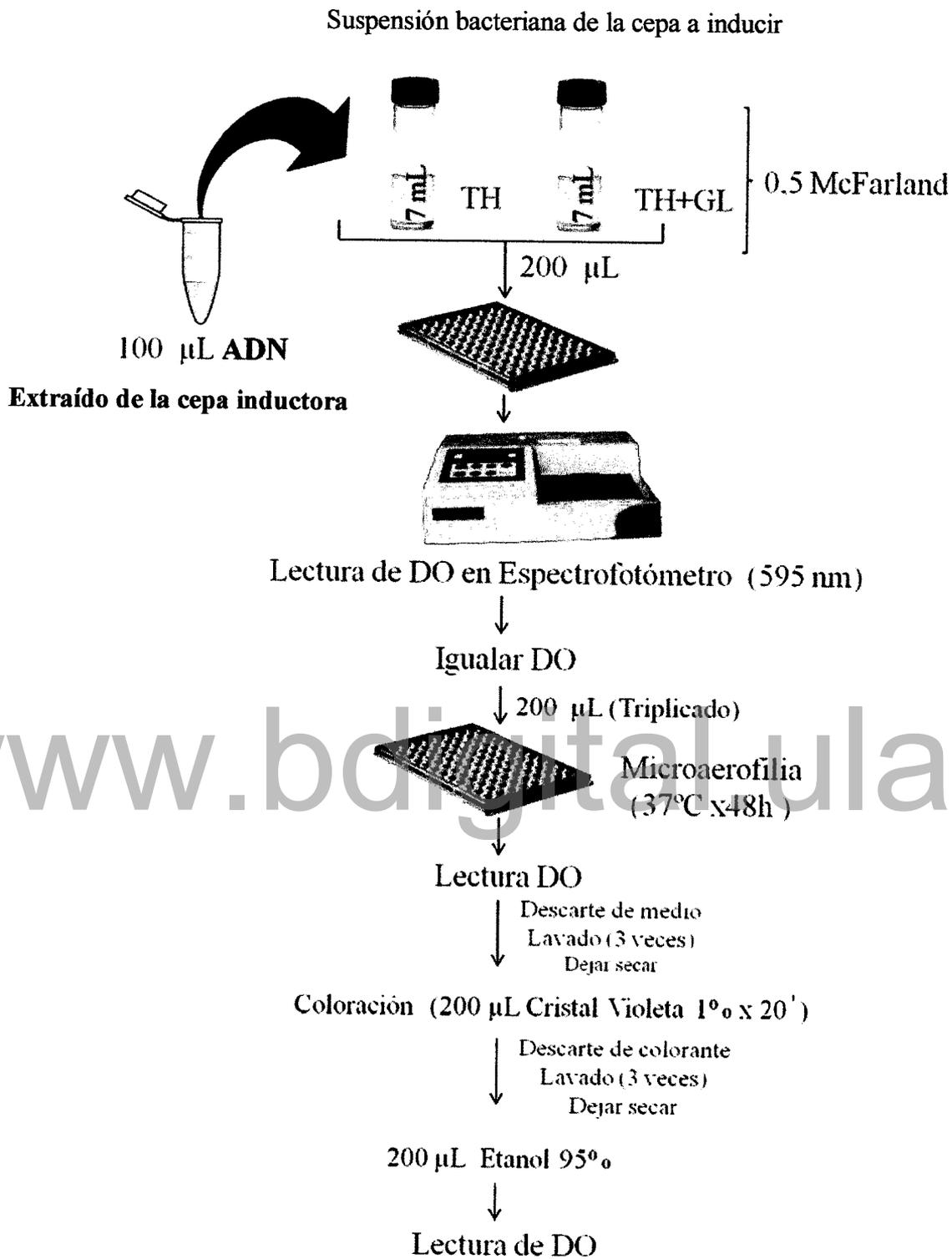
### 3.5 PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO Y PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

A partir del caldo Todd Hewitt que contenía las cepas seleccionadas se ajustaron al patrón 0,5 de McFarland, realizando la dilución correspondiente para igualar las densidades ópticas. A estas cepas se les añadió 100µL del ADN de la cepa de acuerdo a la combinación establecida (Tabla 7). Seguidamente, partiendo del inóculo preparado se añadió 200µL (cepa viva + cepa muerta o ADN de la muestra) en una placa de poliestireno para la producción de biopelículas, siguiendo los pasos descritos anteriormente. Las combinaciones de las cepas de *S. pneumoniae* se detallan en la tabla 7 (Fig. 14).

**Tabla 7. Cepas receptoras, donadoras de ADN y puntos de corte utilizados en los experimentos de inducción de la producción de biopelículas.**

Clon (Cepa)		TH	TH+GL
Receptora de ADN	+ Donadora de ADN	DO (PC: 0,140)	DO (PC:0,216)
Taiwan <sup>19F</sup> -14 No productora	+ INDUCIDA NCC1	-----	-----
	+ Productora INDUCIDA Spain <sup>6B</sup> -2 No productora	-----	-----
Spain <sup>6B</sup> -2 No productora	+ INDUCIDA NCC1	-----	-----
	+ Productora	-----	-----
	+ INDUCIDA Taiwan <sup>19F</sup> -14 No productora	-----	-----
NCC1 Productora	+ INDUCIDA Taiwan <sup>19F</sup> -14 No productora	-----	-----
	+ INDUCIDA Spain <sup>6B</sup> -2 No productora	-----	-----

**TH:** Todd Hewitt; **GL:** Glucosa; **DO:** Densidades ópticas; **PC:** Punto de corte



**Figura 14. Esquema para la inducción de la producción de biopelículas.**

#### 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Mediante un Modelo Lineal General de Medidas Repetidas se comparó la cinética de crecimiento de las cepas de *S. pneumoniae*. Como factores fijos se evaluó la presencia de glucosa y sangre de carnero lisada en los medios de cultivo. Se ajustó un modelo de mayor parsimonia con interacciones de segundo nivel, eliminando todos aquellos efectos no significativos al 5%. Para analizar los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 17.0 para Windows. Los resultados de la cinética de crecimiento se presentaron en gráficos que muestran las densidades ópticas promedio obtenidos en cada medio de cultivo durante las 16 horas evaluadas. Los resultados de los experimentos de formación de biopelícula se presentaron en tablas y gráficos, mostrando las densidades ópticas promedio. La cantidad de biopelícula formada como el número de veces sobre el punto de corte.

www.bdigital.ula.ve

## RESULTADOS

### 1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO

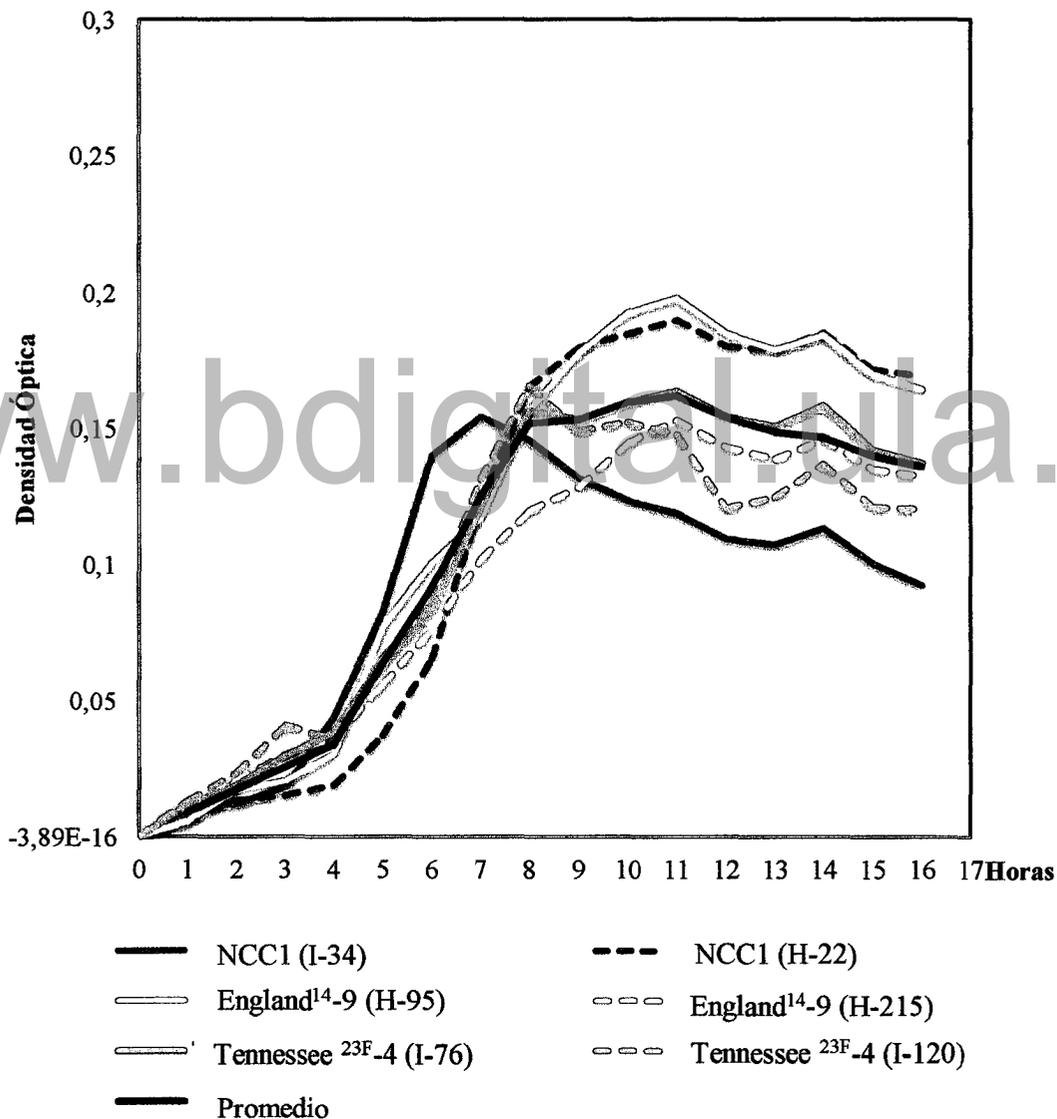
La cinética de crecimiento en caldo Todd Hewitt de las seis cepas de *S. pneumoniae* relacionadas con tres clones internacionales; el acapsular NCC1 y los capsulares England<sup>14</sup>-9 y Tennessee<sup>23F</sup>-4 mostró variaciones importantes (Tabla 8). Los crecimientos máximos se alcanzaron entre las 7 y 11 horas, con un crecimiento máximo promedio de 0,162 DO (rango 0,009-0,162 DO) a las 11 horas.

**Tabla 8. Crecimiento máximo promedio en el caldo Todd Hewitt de seis cepas relacionadas con tres clones internacionales neumocócicos.**

Clon (cepa)	Crecimiento Máximo	
	Tiempo	DO
NCC1(I-34)	7h	0,154
NCC1(H-22)	11h	0,190
England <sup>14</sup> -9 (H-95)	11h	0,198
England <sup>14</sup> -9 (H-215)	11h	0,153
Tennessee <sup>23F</sup> -4 (I-76)	11h	0,163
Tennessee <sup>23F</sup> -4 (I-120)	10h	0,152
Promedio	11h	0,162

DO: Densidad Óptica; h: hora

La curva de crecimiento mostró una fase de adaptación que se extendió durante las primeras 4 horas de incubación (DO: 0,009-0,034), seguida por una fase de crecimiento exponencial hasta las 6 a 8 horas (DO: 0,092 y 0,152, respectivamente) (Gráfico 1). Luego, las cepas alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento que se mantuvo por un período de 7 a 9 horas con densidades ópticas que oscilaron entre 0,147-0,162. En general, a las 15 horas comenzó la fase de declinación o muerte y, al final del experimento, se observaron densidades ópticas entre 0,136-0,140.



**Gráfico 1. Curva de crecimiento individual y promedio en caldo Todd Hewitt de seis cepas relacionadas con tres clones internacionales neumocócicos.**

En general, las variaciones en el crecimiento de las cepas fueron independientes del genotipo estudiado. Así por ejemplo, se evidenció que el crecimiento fue estadísticamente diferente entre cepas de clones distintos (Tabla 9), tal fue el caso del NCC1 versus el Tennessee<sup>23F</sup>-4 ( $p < 0,05$ ), entre el NCC1 versus el England<sup>14</sup>-9 ( $p < 0,05$ ) y en el caso del Tennessee<sup>23F</sup>-4 versus el England<sup>14</sup>-9 ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 9. Diferencias en el crecimiento en caldo Todd Hewitt entre cepas pertenecientes a distintos clones internacionales neumocócicos.**

Clon (cepa)	Versus	Clon (cepa)	Diferencia Promedio	Valor <i>p</i>	Intervalo de confianza del 95%		
NCC1 (H-22)	vs	Tennessee <sup>23F</sup> -4	(I-120)	-0,023*	0,008 **	-0,043	-0,004
			(I-76)	-0,013	0,382	-0,033	0,006
	vs	England <sup>14</sup> -9	H-215	-0,004	0,990	-0,024	0,016
			H-95	-0,036*	0,000 **	-0,056	-0,016
NCC1 (I-34)	vs	Tennessee <sup>23F</sup> -4	I-120	0,034*	0,000 **	0,014	0,055
			I-76	0,045*	0,000 **	0,025	0,065
	vs	England <sup>14</sup> -9	H-215	0,054*	0,000 **	0,034	0,074
			H-95	0,022*	0,015 *	0,002	0,042
Tennessee <sup>23F</sup> -4 (I-76)	vs	NCC1	H-22	0,013	0,382	-0,006	0,033
			I-34	-0,045*	0,000 **	-0,065	-0,025
	vs	England <sup>14</sup> -9	H-215	0,009	0,778	-0,010	0,029
			H-95	-0,022*	0,015 *	-0,042	-0,002
Tennessee <sup>23F</sup> -4 (I-120)	vs	NCC1	H-22	0,023*	0,008 **	0,004	0,043
			I-34	-0,034*	0,000 **	-0,054	-0,014
	vs	England <sup>14</sup> -9	H-215	0,019	0,055	-0,001	0,039
			H-95	-0,012	0,500	-0,032	0,007
England <sup>14</sup> -9 (H-215)	vs	NCC1	H-22	0,004	0,990	-0,015	0,024
			I-34	-0,054*	0,000 **	-0,074	-0,034
	vs	Tennessee <sup>23F</sup> -4	I-120	-0,019	0,055	-0,039	0,000
			I-76	-0,009	0,778	-0,029	0,010
England <sup>14</sup> -9 (H-95)	vs	NCC1	H-22	0,036*	0,000 **	0,016	0,056
			I-34	-0,022*	0,015 *	-0,042	-0,002
	vs	Tennessee <sup>23F</sup> -4	I-120	0,012	0,500	-0,007	0,032
			I-76	0,022*	0,015 *	0,002	0,042

Basado sobre el comportamiento de las cepas en los medios de cultivos utilizados. \* La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

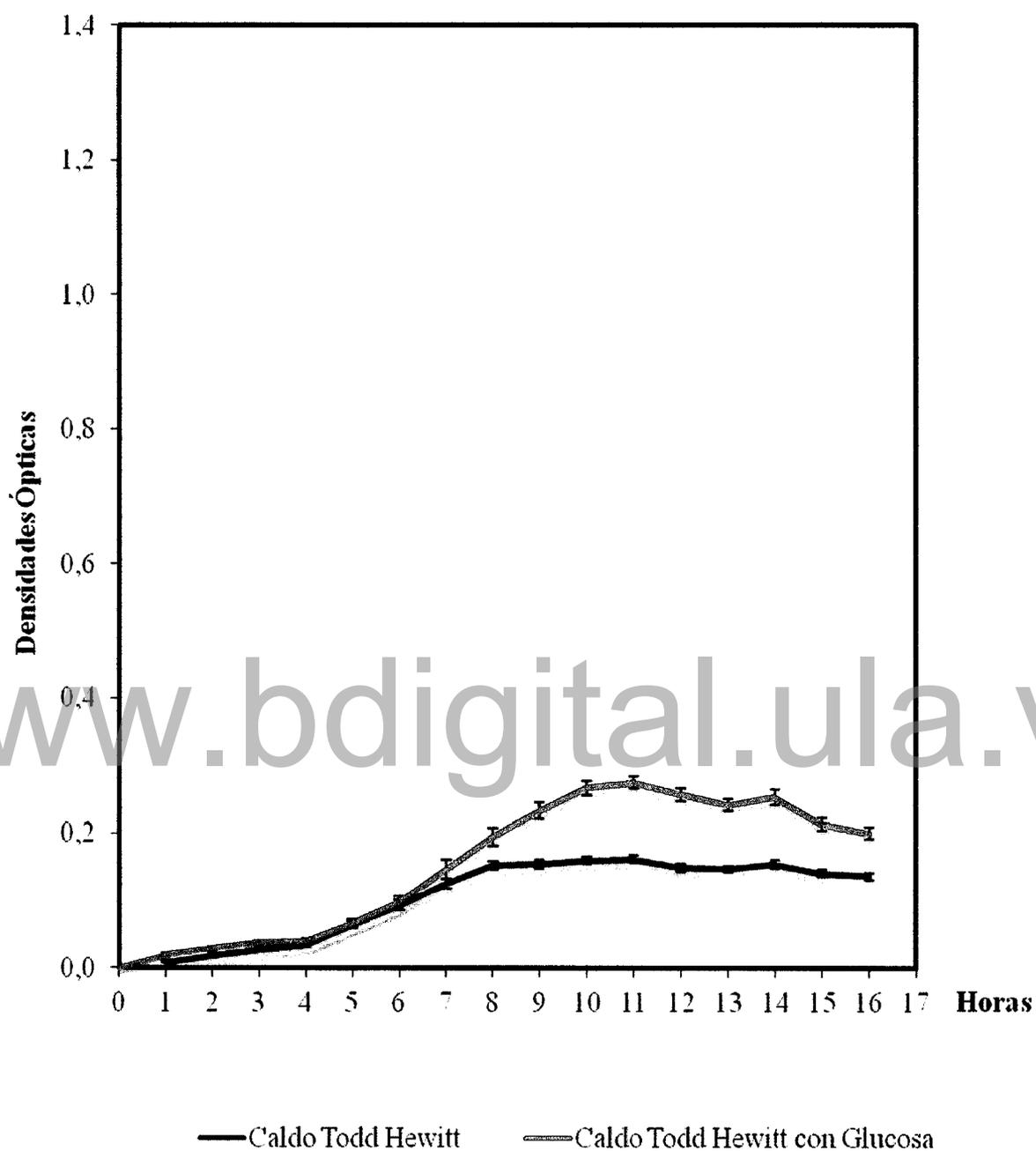
Del mismo modo se observaron marcadas diferencias de crecimiento entre cepas de un mismo clon (Tabla 10). De hecho, el crecimiento de las cepas dentro del clon NCC1 ( $p=0,000$ ) y dentro del genotipo England<sup>14</sup>-9 ( $p=0,000$ ) fueron muy diferentes. Aunque se observaron variaciones en el crecimiento de las cepas pertenecientes al genotipo Tennessee<sup>23F</sup>-4, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,656$ ).

**Tabla 10. Diferencias en el crecimiento en caldo Todd Hewitt entre cepas pertenecientes a un mismo clon internacional neumocócico.**

Clon (cepa)	versus	Clon (cepa)	Diferencia Promedio (OD)	Valor $p^*$	Intervalo de confianza del 95%	
NCC1 (I-34)	versus	NCC1 (H-22)	0,059	0,000*	0,039	0,078
Tennessee <sup>23F</sup> -4, (I-120)	versus	Tennessee <sup>23F</sup> -4 (I-76)	0,011	0,656	-0,009	0,030
England <sup>14</sup> -9 (H-95)	versus	England <sup>14</sup> -9 (H-215)	0,032	0,000*	0,012	0,051

\* Nivel de significancia  $p < 0,05$

Con respecto a la adición de sustancias al caldo Todd Hewitt, los efectos sobre la curva de crecimiento fueron diferentes dependiendo del componente añadido. Así por ejemplo, la incorporación de glucosa permitió un aumento del crecimiento estadísticamente muy significativo en todas las cepas ( $p = 0,000$ ) (Tabla 11). El aumento del crecimiento se manifestó a partir de la séptima hora de incubación y trajo como consecuencia una prolongación de la fase exponencial la cual finalizó en promedio a las 10 horas (Gráfico 2). Por su parte, la fase estacionaria se prolongó hasta las 15 horas, observándose un crecimiento máximo a las 11 horas, el cual fue superior al obtenido en el medio sin suplementos (DO: promedio 0,275; rango 0,200-0,275). Finalmente la fase de declinación comenzó a las 14 horas y, para el final del período de incubación (16 horas), la densidad celular fue 1,5 veces superior a la observada en el medio sin glucosa (Gráfico 2).



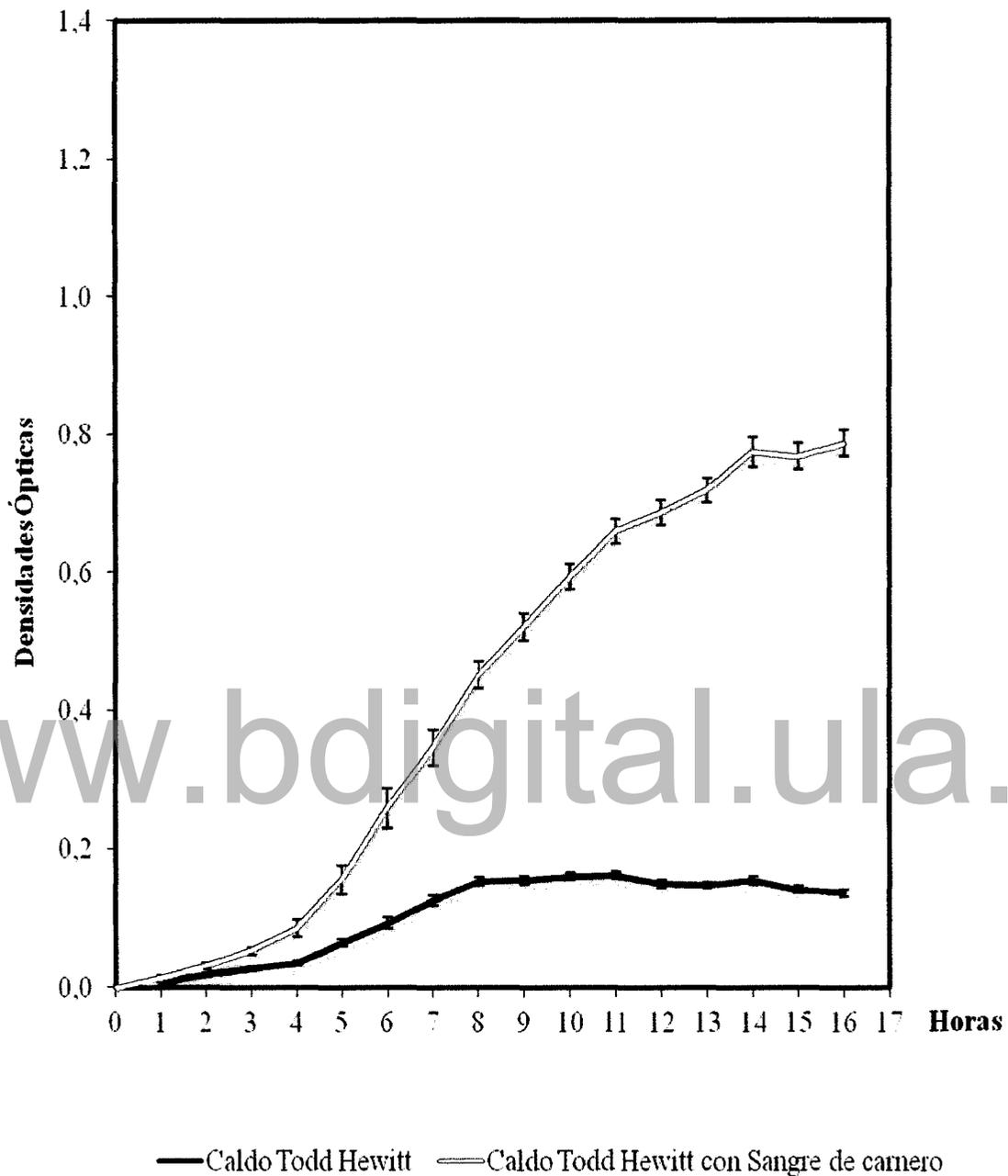
**Gráfico 2. Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt con y sin glucosa de seis cepas de *S. pneumoniae*.**

**Tabla 11. Modelo lineal general de medidas repetidas ajustado al crecimiento de las seis cepas de *S. pneumoniae*.**

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados Tipo III	Cuadrado Medio	F	Significancia*
GLUCOSA	1	44,069	44,069	1054,830	0,000
SANGRE	1	385,738	385,738	9233,059	0,000
GLUCOSA MAS SANGRE	1	16,873	16,873	403,883	0,000

\* Nivel de significancia  $p < 0,05$

Por otra parte, la incorporación de sangre de carnero al caldo Todd Hewitt provocó un aumento estadísticamente muy significativo del crecimiento de todas las cepas ( $p = 0,000$ ); el cual se manifestó tempranamente desde la tercera hora de incubación cuando comenzó la fase exponencial de crecimiento (Tabla 11 y Gráfico 3). Entre las 14 y 16 horas se obtuvo el crecimiento máximo con valores 5 veces por encima de las densidades obtenidas en el caldo sin suplementos (DO: promedio 0,776; rango 0,773-0,786). A diferencia de lo observado en el caldo con y sin glucosa, el crecimiento en el caldo Todd Hewitt suplementado con sangre de carnero fue constante y se mantuvo elevado hasta alcanzar las 16 horas, manteniendo una larga fase exponencial.

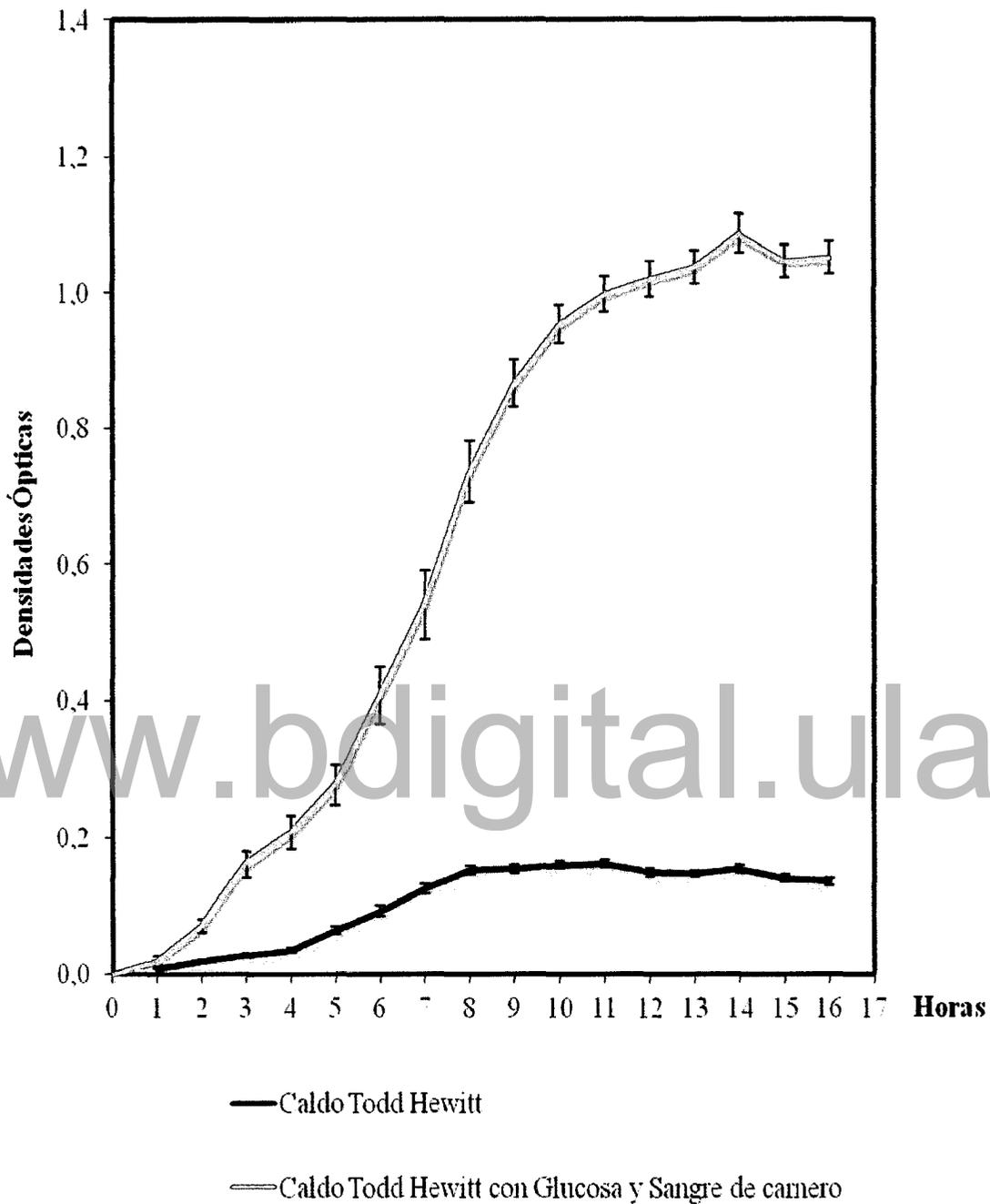


**Gráfico 3. Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt con y sin sangre de carnero de seis cepas de *S. pneumoniae*.**

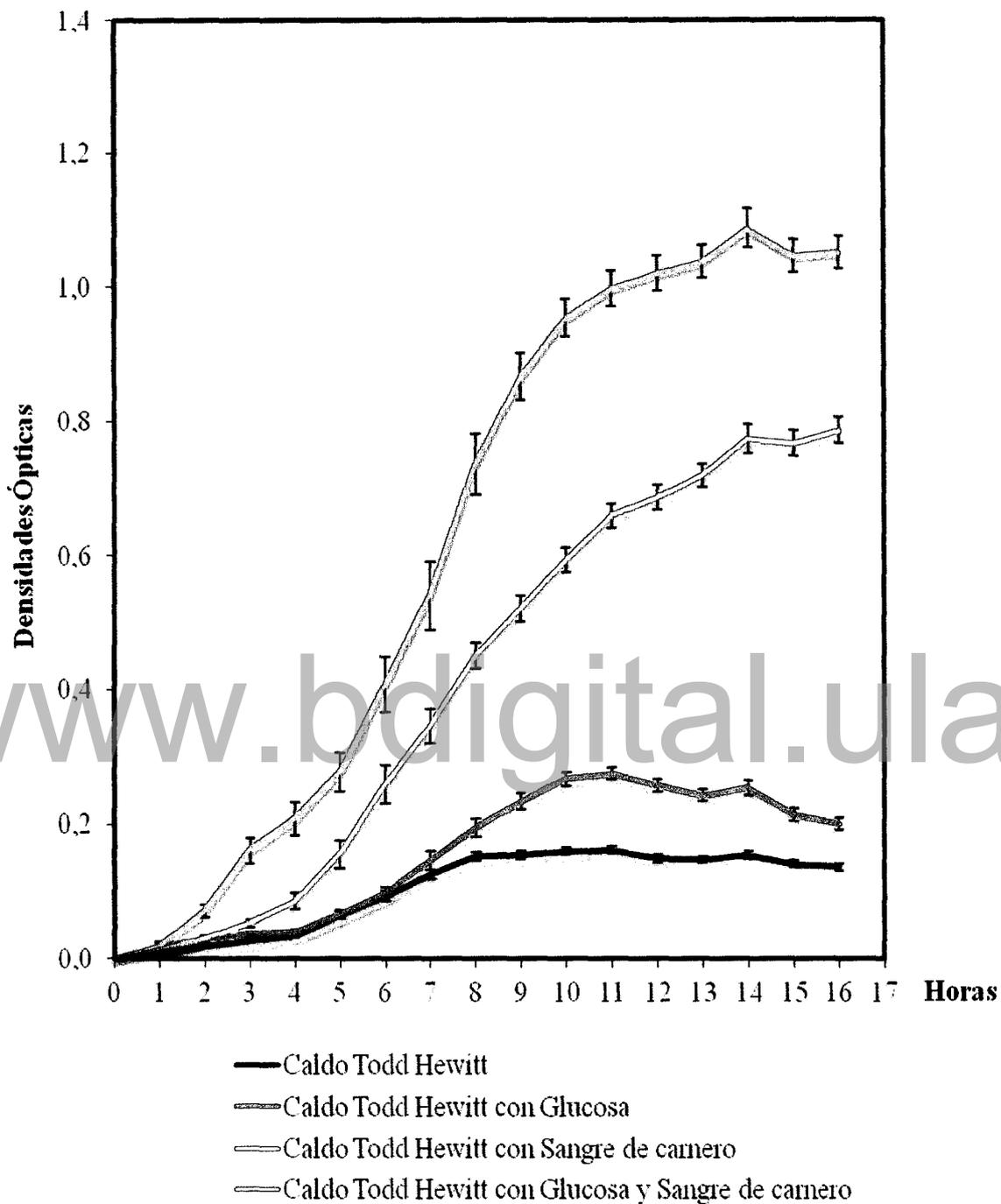
Es importante resaltar que, la adición conjunta de glucosa y sangre de carnero no solo provocó un aumento estadísticamente muy significativo del crecimiento ( $p = 0,000$ ); sino que además produjo un efecto sinérgico, permitiendo un crecimiento mayor que el obtenido con cualquiera de los 2 suplementos por separado (Tabla 11 y Gráfico 4).

El efecto sobre el aumento del crecimiento empezó a manifestarse luego de 2 horas de incubación, por lo que hubo un claro acortamiento de la fase estacionaria. El crecimiento máximo promedio de las cepas se elevó 7 veces por encima del valor obtenido en el medio sin suplementos (DO: promedio 1,087; rango 0,020-1,087). El uso de ambos suplementos permitió alcanzar una densidad celular elevada hasta el final de la incubación, extendiendo la fase exponencial de las cepas analizadas hasta las 16 horas.

Finalmente, además del aumento de la densidad celular, el uso de sangre con y sin glucosa aceleró dramáticamente el tiempo de crecimiento de los neumococos (Gráfico 5). Así por ejemplo, el valor de crecimiento máximo en el medio sin suplemento fue obtenido a las 11 horas, mientras que con el uso de glucosa, sangre y de sangre con glucosa, se obtuvieron densidades celulares superiores a las 8, 6 y 4 horas respectivamente.



**Gráfico 4. Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt y caldo Todd Hewitt suplementado con glucosa y sangre de carnero en seis cepas de *S. pneumoniae*.**



**Gráfico 5. Crecimiento promedio y desviaciones estándar en caldo Todd Hewitt con y sin los diferentes suplementos en seis cepas de *S. pneumoniae*.**

## 2. PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

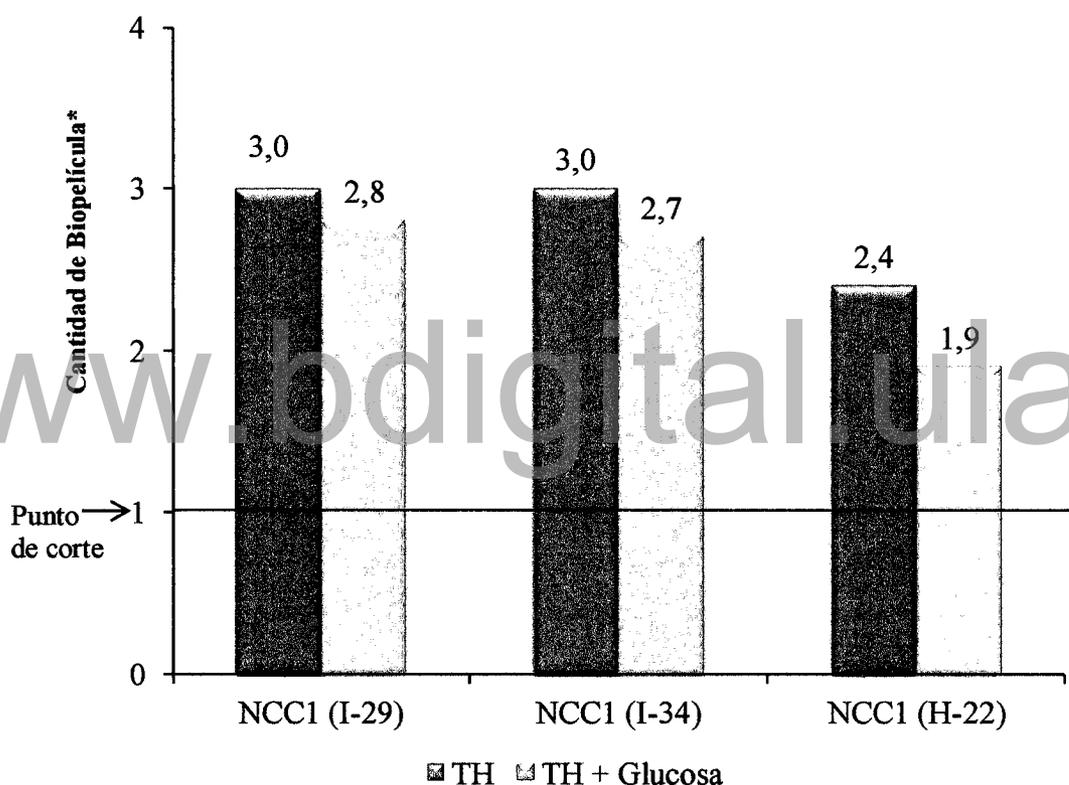
La capacidad para la formación de biopelícula se evaluó en las quince cepas relacionadas con seis clones neumocócicos y los resultados se muestran en la tabla 12 (Gráfico 6). Las tres cepas del clon acapsular NCC1: I-29, I-34 y H-22, formaron biopelícula en los medios de cultivos evaluados (rango DO: TH: 0,336-0,414; TH+GL: 0,401-0,599). En las doce cepas pertenecientes a los clones capsulados Spain<sup>6B</sup>-2, England<sup>14</sup>-9, Taiwan<sup>19F</sup>-14, Tennessee<sup>23F</sup>-4, ST135, se observaron densidades ópticas con un rango de TH: 0,094-0,412; TH+GL: 0,100-0,149. Debido a que estas densidades ópticas se encontraron por debajo del punto de corte, se consideró que estas cepas no produjeron biopelícula.

**Tabla 12. Densidades ópticas y cantidad de biopelícula producida en caldo Todd Hewitt con y sin glucosa por seis clones internacionales neumocócicos.**

Clon	Cepa	TH		TH+GL	
		DO (PC: 0,140)	Proporción respecto al punto de corte	DO (PC: 0,216)	Proporción respecto al punto de corte
NCC1	I-29	0,414*	3,0	0,599*	2,8
	I-34	0,412*	3,0	0,588*	2,7
	H-22	0,336*	2,4	0,401*	1,9
Spain <sup>6B</sup> -2	I-121	0,100	0,7	0,100	0,5
England <sup>14</sup> -9	H-12	0,107	0,8	0,103	0,5
	H-95	0,099	0,7	0,120	0,6
	H-215	0,104	0,7	0,100	0,5
	I-206	0,101	0,7	0,130	0,6
Taiwan <sup>19F</sup> -14	I-248	0,104	0,7	0,125	0,6
Tennessee <sup>23F</sup> -4	I-76	0,100	0,7	0,114	0,5
	I-120	0,107	0,8	0,110	0,5
ST135	H-64	0,094	0,7	0,139	0,6
	H-141	0,107	0,8	0,111	0,5
	H-183	0,095	0,7	0,105	0,5
	H-222	0,105	0,7	0,149	0,7

**TH:** Todd Hewitt; **GL:** Glucosa; **DO:** Densidades ópticas; **PC:** Punto de corte

De acuerdo a lo descrito en la metodología, la cantidad de biopelícula producida se estableció en base a la proporción de densidades ópticas observadas sobre el punto de corte. En el caldo Todd Hewitt las cepas I-29 e I-34 produjeron una cantidad de exopolisacárido tres veces mayor al punto de corte. En la cepa H-22, esta proporción fue de 2,4 veces. En el medio suplementado con glucosa la cantidad de biopelícula formada fue ligeramente menor al medio Todd Hewitt así por ejemplo se observó la siguiente proporción: 2,8 (I-29), 2,7(I-34) y 1,9 (H-22) veces sobre el punto de corte.



\*Cantidad de veces de formación de biopelícula sobre el punto de corte

**Gráfico 6. Cantidad de biopelícula producida en caldo Todd Hewitt con y sin glucosa por las tres cepas del clon acapsulado NCC1.**

### 3. INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA

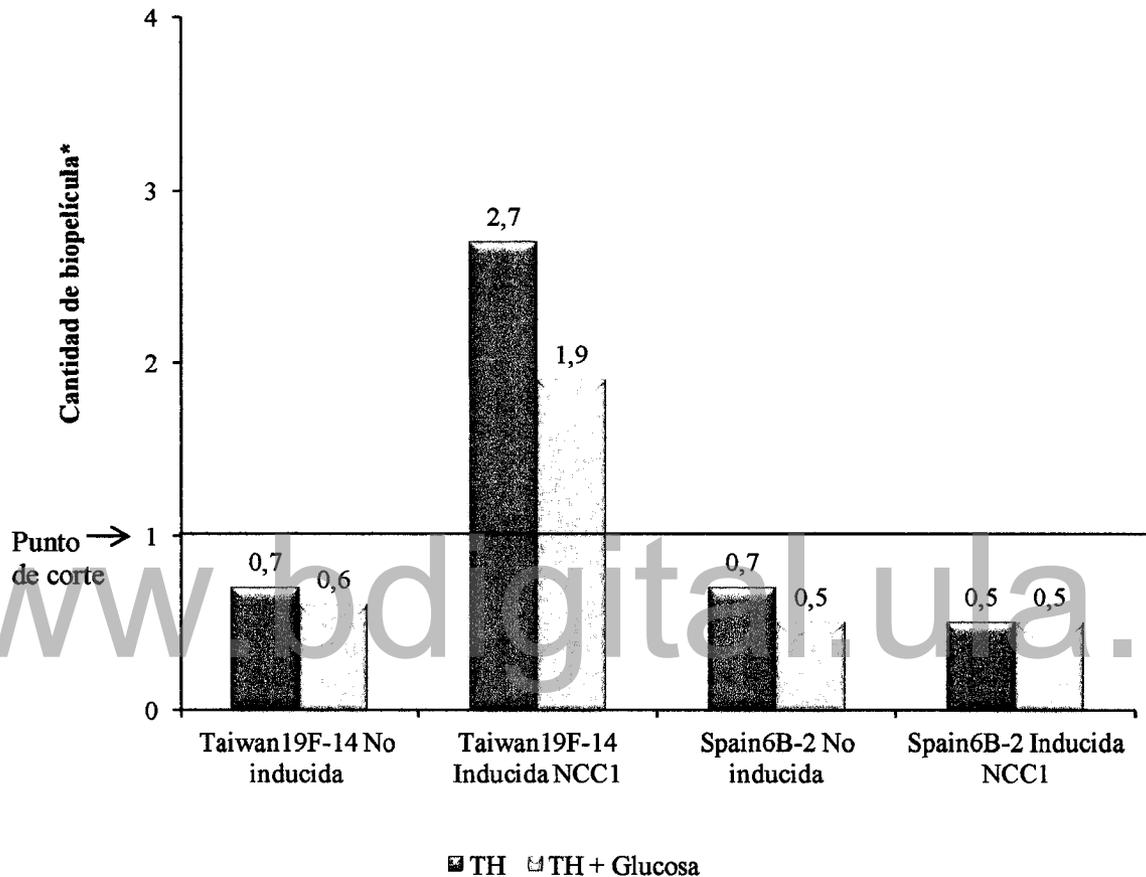
Con respecto a los experimentos de inducción, en los que dos cepas capsuladas (Taiwan<sup>19F</sup>-14, Spain<sup>6B</sup>-2) no productoras de biopelículas fueron expuestas al ADN de una cepa productora (I-29 clon NCC1) se obtuvieron resultados diferentes (Tabla 13). Así, por ejemplo, para la cepa Taiwan<sup>19F</sup>-14, la exposición al ADN de la cepa productora favoreció la formación de biopelícula en el medio TH con y sin glucosa, en una proporción cercana a dos veces sobre el punto de corte (Gráfico 7). Por el contrario, para la cepa Spain<sup>6B</sup>-2, esta exposición no indujo la formación de biopelícula en los medios de cultivo utilizados.

**Tabla 13. Producción de biopelícula en cepas capsuladas de *S. pneumoniae* al ser expuestas al ADN de una cepa productora del exopolisacárido.**

Clon (Cepa)		TH	TH+GL
Receptora de ADN	Donadora de ADN Productora	DO (PC: 0,140)	DO (PC:0,216)
Taiwan <sup>19F</sup> -14 No productora	No inducida	0,104	0,125
	Inducida por NCC1	0,378*	0,407*
Spain <sup>6B</sup> -2 No productora	No inducida	0,100	0,100
	Inducida por NCC1	0,066	0,100

DO: Densidad óptica; TH: Caldo Todd Hewitt; GL: Glucosa.

\*Densidades ópticas superiores al punto de corte



\*Cantidad de veces de formación de biopelícula sobre el punto de corte

**Gráfico 7. Cantidad de biopelícula producida en cepas capsuladas de *S. pneumoniae* al ser expuestas al ADN de una cepa productora del exopolisacárido.**

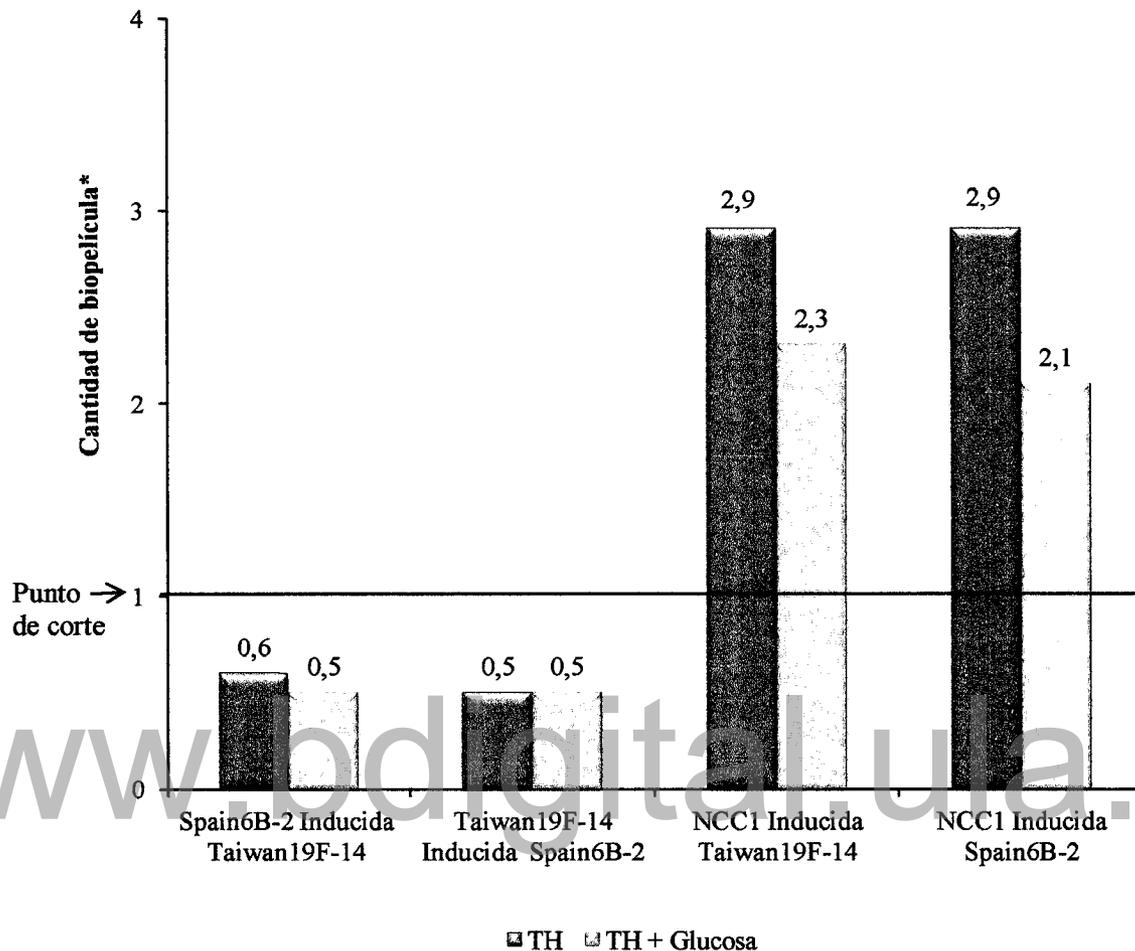
Como era de esperarse, los experimentos de inducción en los que, las cepas capsulares Taiwan<sup>19F</sup>-14 y Spain<sup>6B</sup>-2 al ser expuestas al ADN de una cepa no productora, no tuvieron efecto alguno sobre la producción de este exopolisacárido (Tabla 14). Asimismo, no se observó ningún efecto sobre la cantidad de biopelícula formada por la cepa NCC1 al ser expuesta al material genético de cepas no productoras. Las densidades ópticas obtenidas en todos los casos fueron inferiores en el medio suplementado con glucosa (Gráfico 8).

**Tabla 14. Producción de biopelícula en cepas capsuladas y acapsuladas de *S. pneumoniae* al ser expuestas al ADN de cepas no productoras del exopolisacárido.**

		Clon (Cepa)	TH	TH+GL
Receptora de ADN	+	Donadora de ADN no productora	DO (PC: 0,140)	DO (PC:0,216)
Spain <sup>6B</sup> -2 No productora	+	Taiwan <sup>19F</sup> -14	0,087	0,099
Taiwan <sup>19F</sup> -14 No productora	+	Spain <sup>6B</sup> -2	0,076	0,107
NCC1 Productora	+	Taiwan <sup>19F</sup> -14	<b>0,407*</b>	<b>0,490*</b>
NCC1 Productora	+	Spain <sup>6B</sup> -2	<b>0,412*</b>	<b>0,450*</b>

**DO:** Densidad óptica; **TH:** Caldo Todd Hewitt; **GL:** Glucosa.

\*Densidades ópticas superiores al punto de corte



\*Cantidad de veces de formación de biopelícula sobre el punto de corte

**Gráfico 8. Cantidad de biopelícula producida en cepas capsuladas y acapsuladas de *S. pneumoniae* al ser expuestas al ADN de cepas no productoras del exopolisacárido.**

## DISCUSIÓN

En los últimos años se ha acumulado una importante evidencia epidemiológica, clínica y patológica de la diversidad de comportamiento de las cepas de *S. pneumoniae*. Así por ejemplo, se reconoce que dentro de esta especie existen grupos de cepas más exitosos en los procesos de colonización, producción de enfermedad, invasividad y mortalidad. Entre las características asociadas a ese éxito se destacan el serotipo y el genotipo determinado por MLST (Klugman, 2002; Sjöström y col., 2006; Henriques y col., 2008).

Las investigaciones de Bättig y col. (2006) mostraron variaciones en el crecimiento entre cepas de *S. pneumoniae* que parecían estar relacionados con el potencial de virulencia de los serotipos capsulados, encontrando que los serotipos colonizadores crecieron más rápidamente que los serotipos invasivos. Sin embargo, estos autores plantean la hipótesis de que características diferentes a los serotipos capsulados, tales como el genotipo podrían estar relacionadas con las diferencias de crecimiento.

Los resultados de nuestra investigación apoyan esa hipótesis, al mostrar diferencias interclonales e intraclonales en el crecimiento de esta especie bacteriana. Las cepas evaluadas en la cinética de crecimiento están relacionadas con tres clones neumocócicos de amplia distribución mundial que tiene características antigénicas y de virulencia diferentes. De hecho, existe evidencia epidemiológica y patológica del gran potencial de colonización del clon NCC1 (ST1106), el cual se caracteriza por no desarrollar cápsula, su escaso potencial para producir enfermedad y su casi nulo potencial invasivo (Park y col., 2012).

Por su parte, los clones PMEN Tennessee<sup>23F</sup>-4 e England<sup>14</sup>-9 han sido frecuentemente asociados con enfermedad neumocócica, pero tienen potencial de colonización e invasividad distintos (McGee y col., 2001; Hausdorff y col., 2005; Imai, 2009). Así por ejemplo, las cepas del clon PMEN Tennessee<sup>23F</sup>-4 expresan el tipo capsular 23A, antigénicamente relacionado con el serotipo 23F, el cual se considera un serotipo colonizador, pero con un más bajo potencial de invasividad que otros serotipos capsulares. Al contrario, las cepas del clon

England<sup>14</sup>-9 expresan el serotipo 14, considerado epidemiológicamente como uno de los serotipos con más alto potencial de invasividad (Brueggemann y col., 2003).

En esta investigación, la evaluación en caldo Todd Hewitt con y sin suplementos mostró diferencias significativas en el crecimiento entre y dentro de clones con diferentes potenciales de colonización, producción de enfermedad y/o invasividad. Estos resultados sugieren que las variaciones de crecimiento podrían responder a diferencias individuales ya que las mismas fueron independientes del serotipo y genotipo estudiado. Por lo tanto, es probable que otras características genéticas aun desconocidas determinen las variaciones en el crecimiento dentro de esta especie bacteriana.

El caldo Todd Hewitt sin suplementos es recomendado ampliamente como un medio de enriquecimiento para los estreptococos incluyendo *S. pneumoniae*. Este estudio demostró, que el medio Todd Hewitt al cual se adicionó sangre y en especial sangre con glucosa, aumento la densidad celular y aceleró el tiempo de crecimiento de los diversos genotipos de neumococos estudiados, manteniendo una fase exponencial del microorganismo hasta las 16 horas de incubación (Gráficos 3 y 4). Por lo cual, recomendamos el uso de ambos suplementos para obtener una mayor y más rápida recuperación de neumococos en la práctica clínica y de investigación.

Para la preparación de los medios enriquecidos necesarios para el cultivo de neumococo, se utilizan formulaciones que contienen un 0,2% de glucosa. Los resultados de esta investigación sugieren que la adición de glucosa hasta obtener un valor de 0,6%, podría tener un impacto beneficioso en la recuperación e identificación temprana del microorganismo. Esto podría tener un especial impacto en las infecciones neumocócicas invasivas, como la sepsis y la meningitis, en las cuales el diagnostico etiológico temprano reduce las secuelas y la mortalidad (Bamberger, 2010).

Si bien en esta investigación el uso de Todd Hewitt con glucosa incrementó el crecimiento de las cepas de neumococo, hasta el momento, este efecto no se ha conseguido adicionando glucosa a otros medios de cultivo. Así por ejemplo, en un estudio realizado por Gonçalves y col., (2001) no se logro un mayor crecimiento en las cepas de neumococos del serotipo 23F al

adicionar glucosa al medio Hoerich`s. De manera que, una mayor capacidad del medio Todd Hewitt para mantener el pH podría explicar tales diferencias. A pesar de la utilización de un buffer adicional como el MOPS (3 - (N-morfolino) propanosulfónico, datos no mostrados) no favoreció significativamente al caldo Todd Hewitt suplementado con la glucosa para crecimiento bacteriano.

A pesar de los efectos beneficiosos obtenidos con la adición de glucosa, es necesario mencionar que el uso exclusivo de este carbohidrato produjo una densidad celular menor y una multiplicación bacteriana más lenta, que la obtenida con el uso de sangre de carnero y de sangre con glucosa. En acuerdo con lo descrito por Moura y col., (2011), consideramos que, la acidificación del medio de cultivo producto del metabolismo de la glucosa, podría haber ejercido un efecto tóxico y, en consecuencia, haber conducido a un proceso de autólisis y de disminución de la densidad celular. Entonces, el uso de sangre de carnero podría haber producido un efecto sinérgico, al mantener las cifras de pH en valores apropiados para el desarrollo del microorganismo.

En el caso particular de las infecciones sinusales y del oído medio, estos procesos pueden volverse crónicos favorecidos en parte por la capacidad de los agentes causales para desarrollar biopelícula. La producción de biopelícula es la expresión de una carga genética en un ambiente que lo propicie. En el caso particular de neumococo las bases genéticas y el ambiente que favorezca la producción de este mecanismo no se conoce claramente (Wei y Havarstein, 2012).

En este estudio se evaluó la capacidad de formación de biopelícula en un grupo de cepas de neumococos pertenecientes a diversos clones internacionales, aislados de la nasofaringe de niños sanos. Solamente las cepas acapsuladas del clon NCC1 formaron el exopolisacárido mientras que ninguno de los genotipos capsulares produjo biopelícula. Para explicar estos resultados podría considerarse que el polisacárido capsular es una barrera física que impide o al menos dificulta la adherencia a la superficie, la cual es una etapa crucial en formación de las biopelículas. De hecho, los aislados clínicos capsulados y los transformantes capsulados isogénicos forman una menor biopelícula que la cepa no capsulada según lo demostrado por Moscoso y col., (2006).

Se reconoce que el uso de glucosa favorece la producción de biopelícula en algunos microorganismos, como es en el caso de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* (Lim y col., 2004; Runnel y col., 2013). No obstante, en esta investigación la adición de glucosa disminuyó ligeramente la cantidad de biopelícula formada por las cepas acapsuladas del clon NCC1. De la misma manera en los resultados obtenidos por Moscoso y col., (2006).

Al parecer aquellas cepas de *S. pneumoniae* que espontáneamente no generan biopelícula, pueden adquirir esta capacidad tomando ADN de otros microorganismos que cohabitan en la nasofaringe. Las bases genéticas y el ambiente que propicie esta transformación en la nasofaringe no se conoce claramente. Luego de los experimentos de Griffith se ha avanzado mucho en las técnicas para lograr transformación, haciéndolas cada vez más sofisticadas y efectivas, produciendo una gran cantidad de conocimientos acerca del intercambio genético en una gran variedad microorganismos.

En el caso particular de *S. pneumoniae* estas técnicas regularmente utilizadas para la transformación *in vitro* tienen una buena efectividad o rendimiento en las cepas carentes de cápsula, pero muy escaso en las cepas capsuladas. Afortunadamente, Marks y col. en el año 2012, demostraron altos niveles de intercambio genético en cepas de neumococos capsulares en un ambiente que simula la producción de biopelícula. En esta investigación, las cepas capsuladas no lograron producir biopelículas de manera espontánea, sin embargo la inducción de transformación en un modelo *in vitro* para la producción de biopelícula fue exitoso en el clon capsulado Taiwan<sup>19F</sup>-14, pero no en el Spain<sup>6B</sup>-2. La evidente diferencia en la capacidad de adquisición de este mecanismo de virulencia sugiere una posible diferencia en la compatibilidad genética para la transformación.

Como se mencionó previamente, la capacidad de producir biopelículas puede ser adquirida por transformación, este proceso requiere de ciertos elementos como la competencia y de la compatibilidad genética. En *S. pneumoniae* la competencia para la transformación no es constitutiva pero es regulada por un mecanismo de *quorum sensing*, el cual requiere de la expresión de una feromona conocida como el péptido estimulante de la competencia (CSP). Hasta el momento, se ha descrito la presencia de dos variantes alélicas del gen *comC* que

codifican el CSP-1 y CSP-2 (comC1 y comC2) (Carrolo y col., 2009, Moscoso y col., 2009; Vestrheim y col., 2011; Wei y Havarstein, 2012). Algunas investigaciones han demostrado que los neumococos se transforman con material genético de cepas que expresen la misma variante alélica. Esto implica que no todas las cepas de neumococos son capaces de realizar intercambio genético entre ellas si difieren de la variante alélica del CSP. Los resultados de esta investigación sugieren una posible diferencia en la compatibilidad genética entre la cepa Spain<sup>6B</sup>-2 y la cepa NCC1.

Finalmente, una extensa revisión de la literatura científica demuestra que este es el primer estudio que documenta la cinética de crecimiento de diferentes genotipos de neumococo. Los resultados de esta investigación hacen notar que las características de crecimiento y probablemente el éxito de algunas cepas neumocócicas podrían responder a características genéticas más allá del genotipo y serotipo. Además, la co-colonización nasofaríngea por cepas capsuladas y acapsuladas compatibles para el intercambio genético podría estar favoreciendo la adquisición de factores de virulencia como la producción de biopelícula, y por ende la persistencia de los neumococos en nasofaringe y en patología del tracto respiratorio superior.

## CONCLUSIONES

Luego de realizar la cinética de crecimiento y producción de biopelícula en diversos clones internacionales de *S. pneumoniae*, aislados de la nasofaringe de niños sanos se concluyó que:

1. La cinética de crecimiento *in vitro* mostró diferencias estadísticamente significativas interclonales e intraclonales en el crecimiento de los neumococos, sugiriendo que tales variaciones podrían responder a diferencias individuales independientes del serotipo y genotipo.
2. Se evidencio que la adición de glucosa, sangre de carnero y la combinación de estos suplementos, aumento significativamente la densidad celular y acorto el tiempo de crecimiento máximo, y por lo tanto, su utilidad para enriquecer aun más los medios utilizados para la recuperación del microorganismo.
3. Únicamente las cepas acapsuladas del clon NCC1 formaron biopelícula, mientras que ninguno de los clones capsulados estudiados fueron capaces de producir este exopolisacárido espontáneamente.
4. La utilización de glucosa al 0,4% en el caldo Todd Hewitt tuvo un efecto negativo sobre la producción de biopelícula.
5. Las cepas capsuladas no productoras de biopelícula (Taiwan<sup>19F</sup>-14 y Spain<sup>6B</sup>-2), durante los experimentos de inducción con el ADN de una cepa productora de biopelícula (clon NCC1) mostraron resultados diferentes, sugiriendo una posible diferencia para la competencia mediada por el péptido estimulante de la competencia (CSP).
6. Finalmente, estos resultados sugieren que la co-colonización nasofaríngea por cepas neumocócicas capsuladas y acapsuladas compatibles para el intercambio genético podría estar favoreciendo la adquisición de la capacidad de producción de biopelícula, y por ende, la persistencia de los neumococos en nasofaringe y en patología del tracto respiratorio superior.

## RECOMENDACIONES

1. Se recomienda suplementar el caldo Todd Hewitt con 0,4% glucosa y/o 5% de sangre de carnero para lograr un medio de enriquecimiento más efectivo para acelerar y aumentar el crecimiento de *S. pneumoniae*.
2. En los medios enriquecidos con sangre rutinariamente utilizados para el diagnóstico de las infecciones neumocócicas invasivas, como la sepsis y la meningitis, se recomienda la adición de 0,4% de glucosa para lograr una recuperación e identificación más tempranas del microorganismo.
3. Se recomienda la utilización de Caldo Todd Hewitt suplementado con 0,4% de glucosa y 5% de sangre de carnero para la recuperación de neumococos en los estudios de colonización.
4. No se recomienda el uso de glucosa al 0,4% en el caldo Todd Hewitt para estimular la producción de biopelícula en neumococo.
5. Se recomienda continuar las investigaciones sobre la cinética de crecimiento, producción de biopelícula, metabolismo e intercambio genético entre cepas de *S. pneumoniae* con diferentes serotipos, genotipos y variantes alélicas de CSP en un ambiente que simule el nicho ecológico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allegrucci M., Sauer K. (2007). Characterization of colony morphology variants isolated from *Streptococcus pneumoniae* biofilms. *J Bacteriol* 189: 2030–2038.
- Anderson G., O'Toole G. (2008). Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunology* 322: 85–105.
- Artz, A., Ersjhlr, W., Longo, D. (2003). Pneumococcal vaccination and revaccination of older adults. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2):208-318.
- Arredondo J., Calderón E, Echániz G., Soto A., Arzate P, Amabile C. (2011). Serotypes and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolates causative of invasive diseases in Mexican children *J Infect Dev Ctries.* 2;5(2):119-22.
- Bajaj V., Rai T., Kanawjia, S.(1991). Biotechnological applications for analysis of food and food additives. *Indian-Dairyman*, 43: 505 – 513.
- Balaban N., Ren D., Givskov M., Rasmussen T. (2008). Introduction. In: *Control of biofilm infections by signal manipulation*. Balaban N, Ed. Springer Series on Biofilms 2, 1-11.
- Banberger D. (2010). Diagnosis, initial management, and prevention of meningitis. *American Family Physician* 82 (12):1491-1498.
- Baumgart J. (1992). Rapid detection of microorganisms in factory laborories(Schellnachweis von Mikroorganismen im Betrieslabor).*Mitteilungen aus-dem-Gebiete-der Lebensmitteluntersuchung-und-Hygiene* 82:579 – 588.
- Bättig P., Hathaway L., Hofer S., Muhlemann K. (2006). Serotype-specific invasiveness and colonization prevalence in *Streptococcus pneumoniae* correlate with the lag phase during in vitro growth. *Microbes and Infection* 8:2612-2617.
- Branda S., Vik Å., Friedman L., Kolter R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 13:20–26.
- Bionova. (Octubre de 2013). Obtenido de Bionova: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema19.pdf>
- Brock T., Madigan M. (1993). *Microbiología*. 6ta edición. Pretince Hall Hispanoamérica S.A. México.

- Brueggemann A., Griffiths D., Meats E., Peto T., Crook D., Spratt B (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and Seotype - and clone- specific differences in invasive disease potential. *Journal of Infectious Diseases*. 187:1424-1432.
- Budhani R., Struthers, J. (1997). The use of Sorbarod biofilms to study the antimicrobial susceptibility of a strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 40: 601–602.
- Camilli R., Pantosti A., Baldassarri L. (2011). Contribution of serotype and genetic background to biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J. Clin Microbiol Infect Dis* 30: 97-102.
- Castrillón L., Palma A., Padilla M. (2010). Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Rev Mex* 54 (1): 14-24.
- Cheng Q., Campbell E., Naughton A., Johnson S., Masure H. (1997). The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiolog* 23:683-692.
- Christensen G., Simpson W., Anglen J., Gainor B. (2000). Methods for evaluating attached bacterial and biofilms an overview. In: *Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods, and Applications*. An YH, Friedman RJ, Eds. Humana Press Inc. USA 213-233.
- Carrolo M., Frias M., Pinto F., Melo-Cristino J., Ramirez, M. (2010). Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 5: e15678.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI (2012). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. 32 (3): M100-S22.
- Coates H., Thornton R., Langlands J., Filion P., Keil A.D., Vijayasekaran S., Richmond, P. (2008). The role of chronic infection in children with otitis media with effusion: evidence for intracellular persistence of bacteria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 138: 778–781.
- Costerton J., Lewandowski Z., Caldwell D., Korber, D., Lappin-Scott, H. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49: 711–745.
- Cvitkovitch D., Li Y., Ellen R. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Stretococcal infections. *J. Clin. Invest* 112: 1626-1632.

- Domenech M., García E., Moscoso M. (2009). Versatility of the capsular genes during biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*. *Environmental Microbiology* 11(10):2542-2555.
- Donlan R., Piede J., Heyes C., Sanii L., Murga R., Edmonds P. (2004). Model system for growing and quantifying *Streptococcus pneumoniae* biofilms in situ and in real time. *Appl Environ Microbiol* 70: 4980–4988.
- El-Azizi M., Rao S., Kanchanapoom T., Khardori, N. (2005). In vitro activity of vancomycin, quinupristin/ dalfopristin, and linezolid against intact and disrupted biofilms of staphylococci. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 4: 2.
- Echeverri F., Giraldo C. (2006). Distribución de serotipos y patrón de sensibilidad in vitro a diferentes antibióticos de cepas de *Streptococcus pneumoniae* obtenidas de niños menores de 15 años en aislamiento de Risaralda. *Infectio* 10(1)7-14.
- Enright M., Spratt B. (1998). A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 144:3049-3060.
- Finkle P. (1931). Metabolism of S and forms of pneumococcus. *Rockefeller Institute for Medical Research and the laboratories*. 2:661-676.
- Forbes B., Sahm D., Weissfeld A. (2002). Editors Bailey & Scott's. *Diagnostic Microbiology*. 11<sup>th</sup>. Ed. St. Lois, Missouri. Mosby.
- Flemming, H. y Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8: 623–633.
- García M., Vázquez F., Méndez F. (2006). *Streptococcus pneumoniae* virulence factors and their clinical impact: an update. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24: 512- 517.
- Gerhardt P., Murray R., Wood W., Krieg N. (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington D.C.: American Society for Microbiology.
- Goller C, Romeo T. (2008). Environmental influences on biofilm development. In: *Bacterial biofilms*. Romeo T, Ed. *Curr Top Microbiol Immun* 37-66.
- Goeres D., Loetterle L., Hamilton M., Murga R., Kirby D., Donlan R. (2005). Statistical assessment of a laboratory method for growing biofilms. *Microbiology* 151: 757–762.
- Gonçalves V., Zangirolami T., Giordano R., Raw Y., Tanizaki M., Giordano R. (2001). Optimization of medium and cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 23F. *Appl Microbiol Biotechnol* 59(6):713-717.

- Gorman S., Jones D. (2003). Biofilm complications of urinary tract devices. In: Medical Implications of Biofilms. Wilson M, Devine D, Eds. Cambridge University Press UK, 136-170.
- Hall-Stoodley L., Hu F., Gieseke A. (2006). Direct Detection of Bacterial Biofilms on the Middle-Ear Mucosa of Children with Chronic Otitis Medi JAMA 296(2):202-211
- Hall-Stoodley L., Nistico L., Sambanthamoorthy K., Dice B., Nguyen D., Mershon W. y col. (2008). Characterization of biofilm matrix, degradation by DNase treatment and evidence of capsule downregulation in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. BMC Microbiol 8: 173.
- Hanage W., Kaijalainen T., Herva E., Saukkoriipi A., Syrjänen R., Spratt, B. (2005). Using multilocus sequence data to define pneumococcus. Journal of Bacteriology, 187(17), 6223-6230.
- Hausdorff W., Feikin D., Klugman K. (2005). Epidemiological differences among pneumococcal serotypes. Review. Lancet. Infect. Dis. 5 (2):83-93.
- Havarstein L., Hakenbeck, Gaustad P. (1997). Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational Exchange. J. bacteriol 179: 6589-6594.
- Herrera M. (2004). El papel del biofilm en el proceso infeccioso y la Resistencia. Nova. Publicación científica. ISSN:1794-2370 2 (2):1-108
- Henriques B., Blomberg C., Dagerhamn J., Bättig P., Normark S. (2008). The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 6 (11):827-837.
- Hoa M., Tomovic S., Nistico L., Hall-Stoodley L., Stoodley P., Sachdeva, L. y col. (2009). Identification of adenoid biofilms with middle ear pathogens in otitis-prone children utilizing SEM and FISH. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 73: 1242–1248.
- Hoskins J., William E., Alborn J., Glass J. (2001) Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. J Bacterial. 19:5709-5717.
- Hsieh Y., Lee W., Shao P., Chang P., Huang L. (2008). The Transforming *Streptococcus pneumoniae* in the 21st Century. Review. Chang Gung Med J. 31(2): 117-124.
- Imai S, Ito1 Y, Ishida T., Hirail T., Ito1 I., Maekawa1 K. y col. (2009). High prevalence of multidrug-resistant Pneumococcal molecular epidemiology network clones among *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. Clin Microbiol Infect 15 (11):1039-1045.

Instru Met. (Septiembre de 2013). Obtenido de Instru Met:  
<http://www.calibracion.com.mx/espectrofotometro.html>

Jensen P., Givskov M., Bjarnsholt T., Moser, C. (2010). The immune system vs. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 292–305.

Joklik K., Willett H., Amos D., Wilgert C. (1994). Editors Zinsser. Microbiología, 20A ed. BsAs. Panamericana.

Kleerebezem M., Quadri L., Kuipers O., Vos W. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal- transduction systems in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 24 (5): 895-904.

Klugman K. (2002). The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 50 Suppl S2:1-5.

Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger P., Winn W. (2006). Diagnóstico Microbiológico. Texto y atlas color. 5ta ed. Madrid. Editorial Médica Panamericana.

Lasa I., del Pozo J., Penadés J., Leiva J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. *An Sist. Sanit. Navar* 28(2): 163-175.

Laufer A., Metlay J., Gent J., Fennie K., Kong Y., Pettigrew M. (2011). Microbial Communities of the Upper Respiratory Tract and Otitis Media in Children *mbio*. 2 Issue 1 e00245-10.

Lewis K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 107–131.

Li H., Tang N., Aspiras M., Lau P., Lee J., Ellen R., Cvitkovitch D.( 2002). A quorum sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology* 184(10): 2699-2708.

Lim Y., Jana M., Lee C. (2004). Control of glucose and NaCl induced biofilm formation by *rbf* in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 186 (3): 722-729 .

Lindsay D, von Holy A. (2008). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect*, 64: 313-325.

López D., Vlamakis H., Kolter R. (2010). Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a000398.

Lorenz M., Wackernagel W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol.Rev.* 58: 563-602.

- Luo P., Morrison A. (2003). Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. J. Bacteriol 185:349-358.
- Macfadin J. (1985). Media for isolation cultivation identification maintenance of medical bacteria. Volumen 1. Williams&Wilkins, Baltimore, Md.
- McGee L., McDougal L., Zhou J., Spratt B., Tenover F., George R, y col. (2001). Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. J Clin Microbiol. 39(7):2565-71.
- Mandell G., Bennett J., Dolin R. (2010). Principles and Practice of Infectious Diseases (Séptima edición ed.). Philadelphia, USA: Elsevier.
- Marks L., Ryan M., Hakansson A. High levels of genetic recombination during nasofaryngeal carriage and biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae* (2012). Mbio. 3 (5):1-13.
- Martin B., Prudhomme M., Alloing G., Granadel C., Claverys. (2000). Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol., 38:867-878.
- Meats E., Brueggemann A., Enright M., Sleeman K., Griffiths D., Crook D., Spratt B. (2003). Stability of serotypes during nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol.41(1):386-392.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. (2009). Anuario de Mortalidad 2007. Recuperado de <http://www.ovsalud.org/doc/Anuario07.pdf>
- Morison D. (1997). Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. Microb. Drug Resist. 3:27-37.
- Moscoso M., García E., López, R. (2006). Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae*: role of choline, extracellular DNA, and capsular polysaccharide in microbial accretion. J Bacteriol 188: 7785– 7795.
- Moscoso M., García E., López R. (2009). Pneumococcal biofilms review article. International Microbiology 12:77-85.
- Moura M., Gomes, D., Jessouroun, E., Peixoto C., M., Pereira Jr. (2011). Investigation of cultivation conditions for capsular polysaccharide production by *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. Electronic Journal of Biotechnology, 14 (5): 2908.
- Multi Locus Sequence Typing. (Junio de 2013). Obtenido de <http://spneumoniae.mlst.net/>

- Musher D. (2000). *Streptococcus pneumoniae*. En: Mandell, G.; Bennett, J. y Dolin, R. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Cap. 188, Pág. 2582-2604.
- Muñoz E., Marcano E., Camilli, A. (2008). Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infect Immun* 76: 5049–5061.
- Murray P., Rosenthal K., Kobayashi G., Pfaller M. (2006). Microbiología médica. 4ta ed. Madrid Editorial ELSEVIER SCIENCE.
- Nagai K., Shibasaki Y., Hasegawa K., Davies T., Jacobs M., Ubukata K. y otros (2001). Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and B-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 915-918.
- Nazar J. (2007). Biofilm bacteriano. *Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* 67: 61-72.
- Nistico L., Kreft R., Gieseke A., Coticchia J., Burrows A., Khampang P. y col., (2011). Adenoid reservoir for pathogenic biofilm bacteria. *J Clin Microbiol* 49: 1411–1420.
- Organización Mundial de la Salud. (2010). Estadísticas Sanitarias Mundiales. Organización Mundial de la Salud.
- O'Toole, G. (2004). Jekyll or hide? *Nature* 432: 680–681.
- Park I., Kim K., Andrade A., Briles D., McDaniel L., Nahm M. (2012). Nontypeable pneumococci can be divided into multiple *cps* types including one type expressing the novel gene *pspK*. *mBio asm.* 3 (3): 1-11.
- Peeters E., Nelis H., Coenye T. (2008). Comparisons of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J Microbial Methods* 72: 157-165.
- Pettit K., Weber C., Kean M., Hoffmann H., Pettit G., Tan R., Franks K., Horton M. (2005). Microplate Alamar Blue Assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 49:2612-2617.
- Pitts B, Hamilton M, Zilver N, Stewart P. (2003). A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbial Methods*, 54:269-276.
- PMEN. (2006). Pneumococcal Molecular Epidemiology Network (PMEN). Retrieved 2013, from <http://www.sph.emory.edu/PMEN/>.

Prado G. (2008). Adherencia de *Streptococcus pneumoniae* a poliestireno, patogenicidad e interferencia de antibióticos e ibuprofeno. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia Universidad de Barcelona ISBN: 978-84-692-2418-2.

Presser, K. A; Ross, T. and Ratkowsky (1998). Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, ph, lactic acid concentration and water activity. *Applied and Environmental Microbiology* 64:1773 – 1779.

Quintero B., Araque M., Van der Gaast C., Hemans W. (2011). Genetic diversity of Tn916-Related transposons among drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates colonizing healthy children in Venezuela. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (10):4930-4932.

Reisner A., Toiby N., Tolker-Nielsen T., Molin S. (2005). Microbial pathogenesis and biofilm development. In: *Concepts in bacterial virulence*. Russel W, Herwald H, Eds. *Contrib Microbiol Basel, Karger* 12: 114-131.

Restrepo A., Salazar B., Agudelo M., Rodríguez C., Zuluaga A., Vesga O. (2005). Optimisation of cultura conditions to obtain maximal growth of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *BMC Microbiology* 5(34):1-8.

Runnel R., Makinen k., Honkala S., Olak J., Makinen P., Nommela R., Vahlberg T., Honkala E., Saaq M. Effect of three year consumption of erythritol, xilitol and sorbitol candies on various plaque and salivary caries related variables. (2013). *J. Dent.* (13). 00245-5.

Ruvinsky R., Gentile A., Regueira M., Corso A., Pace J., Bakir J., Di Fabio J., Rossi A. (2004). Infecciones invasivas por *Streptococcus pneumoniae*: estudio epidemiológico e importancia del desarrollo de un sistema de vigilancia. *Arch Pediatr Urug* 2004; 75(1): 91-103.

Sánchez C., Shivshankar P., Stol K., Trakhtenbroit S., Sullam P., Sauer K. y col. (2010). The pneumococcal serine-rich repeat protein is an intra-species bacterial adhesin that promotes bacterial aggregation in vivo and in biofilms. *PLoS Pathog* 6: e1001044.

Sanderson A., Jeff M., Hunsaker D. (2006). Bacterial biofilm on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 116: 1121-1126.

Sandgren A., Sjöström K., Olsson B., Christensson B., Samuelsson A., Kronvall G., Henriques B. (2004). Effect of clonal and serotype specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *JID* 189:785-796.

- Sauer K., Rickard A., Davies D. (2007). Biofilm and biocomplexity. *Microbe* 7: 347-353.
- Sarker S, Nahar L, Kumarasamy. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-324.
- Schaudinn C., Stoodley P., Kainović A., O'Keeffe T., Costerton B., Robinson D. y col., (2007). Bacterial biofilms, other structures seen as mainstream concepts. *Microbe* 2: 231-237.
- Science Photo Library. (Julio de 2013). Obtenido de Science Photo Library: <http://www.sciencephotolibary.com/view>
- Sjöström K., Spindler C., Ortqvist A., Kalin M., Sandgren A., Kuhlmann-Berenzon S., Henriques B. (2006). Clonal and capsular types decide whether pneumococci will act as a primary or opportunistic pathogen. *Clinical Infectious Diseases*. 42: 451-459.
- Shiao, A., Guo, Y., Hsieh, S., Tsai, T. (2004). Bacteriology of medically refractory acute otitis media in children: a 9-year retrospective study. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 68(6):759-65.
- Soto S., Smithson A., Horcajada J., Martinez J., Mensa J., Vila J. (2006). Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12:1034-1036.
- Todd E., Hewitt L. (1932). A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. *J. Pathol. Bacteriol.* 35: 973-974.
- Tran T., Kwon H., Kim E., Kim K., Briles D., Pyo S., Rhee D. (2011). Decrease In Penicillin Susceptibility by Heat Shock Protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(6):2714-2728.
- Tuomanen E., Austrian R., Masure R. (1995). Pathogenesis of pneumococcal infection. *The New England Journal of Medicine.* 332(19), 1280-1281.
- Valenzuela M., O'Loughlin R., De La Hoz F., Gomez E., Constenla D., Sinha A. y col. (2009). The burden of pneumococcal disease among Latin American and Caribbean children: review of the evidence. *Rev Panam Salud Publica*, 25(3), 270-279.
- Velazco E., Verheul A., Verhoef J., Snippe H. (1995). *Streptococcus pneumoniae*: Virulence Factors, Pathogenesis and Vaccines. *Microbiol Rev.* December 4: 591-603.
- Vestrheim D., Gaustad P., Aaberge I., Caugant D. (2011). Phenotypes of pneumococcal strains co-existing in healthy children. *Infection Genetics and Evolution* 11:1703-1708.

- Vila J, Soriano A, Mensa J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 26: 48-55.
- Waite R., Struthers J., Dowson C. (2001). Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type 3 capsule locus causes high-frequency phase variation. *Mol Microbiol* 42: 1223–1232.
- Wei H., Havarstein L. (2012). Fratricide is essential for efficient gene transfer between pneumococci in biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (16):5897-5905.
- Weiser, J. (2010). The pneumococcus: why a commensal misbehaves. *Journal of Molecular Medicine*. 88, 97-102.
- Whatmore A., Barcus V., Dowson C. (1999). Genetic diversity of the streptococcal competence (*com*) gene locus. *J. Bacteriol* 3144-3154.
- World Health Organization. (2003). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la Salud pública en el mundo en desarrollo.
- World Health Organization and United Nations. (2009). Vaccina Preventable Deaths and the Global Immunization Vision and Strategy. *MMWR*; 55 (18): 511 – 515.
- Wyres K., Lambertsen L., Croucher N., McGee L., von Gottberg A., Liñares J., y col. (2012). Pneumococcal capsular switching: an historical perspective. *Journal of Infectious Diseases*, 1-31.