

Influencia del sistema autolítico en la muerte bacteriana inducida por antibióticos beta-lactámicos

R. López, P. García, C. Ronda y A. Portolés

Instituto de Inmunología y
Biología Microbiana. C.S.I.C.
Velázquez, 144 - Madrid-6

(Recibido el 9 de octubre de 1979)

R. LOPEZ, P. GARCIA, C. RONDA y A. PORTOLES. *Influence of the Autolytic System on the Bactericidal Effect Induced by β -Lactamic Antibiotics*. Rev. esp. Fisiol., 36, 163-170. 1980.

New experimental conditions showing the phenomena of «antibiotic tolerance», are described. In *Streptococcus pneumoniae*, a strong protection against the loss of viability induced by penicillin was obtained when TRIS (hydroxymethyl amino-methane), instead of potassium phosphate, was used as buffer of the growth medium.

The main pneumococcal autolysin (N-acetyl-muramyl amidase) present in *S. pneumoniae* was found to be, at least partially, responsible for the loss of viability induced by beta-lactamic molecules.

TOMASZ *et al.* (12) encontraron que en *Streptococcus pneumoniae* la respuesta bacteriolítica de estos organismos frente a diversos antibióticos que actúan a nivel de pared se convertía en respuesta bacteriostática bajo determinadas condiciones experimentales. Este comportamiento ha recibido desde entonces el nombre de tolerancia antibiótica. Más recientemente, SABBATH *et al.* (9) han puesto de relieve la importancia clínica de este nuevo tipo de respuesta bacteriana, al describir la presencia de bacterias patógenas penicilín-tolerantes (defectivas en hidrolasas) en pacientes con infecciones recurrentes.

Las condiciones que generan la respuesta tolerante en *S. pneumoniae* tienen en común el que la actividad autolítica queda

suprimida por no existir autolisina biológicamente activa (2) o porque dicho enzima existe en cantidades muy bajas en determinadas estirpes mutantes (15). Asimismo, nosotros hemos encontrado que el efecto lítico de las moléculas β -lactámicas sobre diversas estirpes bacterianas es una función del pH del medio de cultivo. En estas condiciones, la tolerancia frente a penicilina y otras moléculas de este tipo dependiente del pH ha podido ser demostrada en *E. coli* (1), *S. pneumoniae*, *S. faecium*, *Staph. aureus* y *B. subtilis* (6). En todas las especies estudiadas los valores de pH permisivos para la lisis estaban próximos a los pH óptimos de actividad de las principales enzimas autolíticas de dichas especies, cuando estas

enzimas eran utilizadas *in vitro*; por el contrario, la tolerancia se corresponde con valores de pH a los cuales las actividades de tales enzimas están suprimidas.

Este tipo de experimentos permitió distinguir un efecto primario del antibiótico (inhibición de la multiplicación celular) que puede ser separado, experimentalmente, del efecto secundario o lítico (1, 6). Sin embargo, la acción bactericida producida por los antibióticos que se acaba de señalar, es tan sólo parcialmente inhibida cuando *E. coli* se multiplica a pH 5, particularmente en lo que se refiere a penicilina y cefaloridina. Esta es una situación similar a la descrita por TOMASZ *et al.* (12) en el caso de la tolerancia antibiótica inducida mediante el empleo de mutantes deficientes en autolisina.

En el presente trabajo damos cuenta del desarrollo de condiciones experimentales a través de las cuales se obtiene nuevamente una respuesta tolerante frente a antibióticos β -lactámicos pero, a diferencia de las condiciones de tolerancia señaladas anteriormente, en las que aquí se describen aparece una marcada protección frente al efecto bactericida inducido por moléculas β -lactámicas.

Material y métodos

Estirpes bacterianas. Se emplearon dos estirpes de *S. pneumoniae*, la estirpe salvaje R₆ (amablemente cedida por el Prof. Tomasz, de la Universidad Rockefeller) y su mutante (cw-1) defectivo en la principal autolisina (N-acetil-muramyl-L-alanil amidasa) (12).

Medios de cultivo. Un medio sintético (C) que contiene hidrolizado de caseína (5, 10) se empleó en todos los experimentos. Normalmente contiene un tampón fosfato a una concentración final de 0,05 M con un valor inicial de pH de 8. En la mayor parte de los experimentos descritos aquí, el medio C fue tamponado con Tris-hidroxi metil amino metano

(TRIS) a una concentración final de 0,05 M con un valor inicial de pH 8.

La multiplicación de los cultivos fue medida por turbidimetría empleando un nefocolorímetro Coleman Mod. Junior (6). Las unidades nefelométricas arbitrarias (N) del aparato fueron calibradas determinando las correspondientes unidades formadoras de colonias (UFC) de la bacteria ($1 N = 2,5 \times 10^5$ células/ml). La viabilidad fue determinada por métodos habituales de siembra en placas de agar (6).

Antibióticos. Benzylpenicilina (E. R. Squibb and Sons, N. Y.) y beta-cloro-D-alanina obtenida del Dr. James Manning, de la Universidad Rockefeller.

Otros métodos. El procedimiento de sensibilización de *S. pneumoniae* a la enzima autolítica añadida al medio («curación fenotípica») ha sido descrito en detalle por TOMASZ y WAKS (15). La preparación de las paredes celulares marcadas radiactivamente con (metil-H³) colina (4,22 Ci/mmol) así como su obtención y purificación (7), la preparación de autolisina electroforéticamente pura (3) y el método de ensayo de dicha autolisina (2) han sido descritos previamente. El método de marcado de las proteínas intracelulares de *S. pneumoniae* con 1-(G-H³) fenil-alanina (10 Ci/mmol, 2-5 μ Ci y 6 μ g/ml de medio) también ha sido publicado recientemente (4).

Resultados

El medio de cultivo empleado habitualmente en nuestro laboratorio para la multiplicación de *S. pneumoniae* es un medio semisintético descrito por TOMASZ (10) y ampliamente usado en la literatura (6, 8). Este medio de cultivo está habitualmente tamponado con fosfato (50 mM); la modificación fundamental introducida consistió en sustituir el fosfato por TRIS (50 mM) como tampón del medio de cultivo de *S. pneumoniae*. El planteamien-

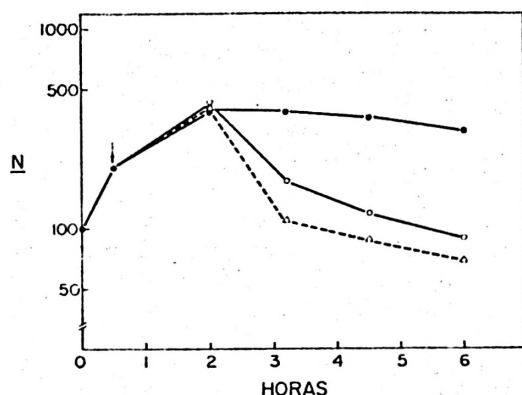


Fig. 1. Respuesta de *S. pneumoniae* (R_6) multiplicándose en medio tamponado con TRIS o con fosfato frente a penicilina.

Células de neumococo (5×10^7 UFC/ml) en medio C tamponado con TRIS (●—●) o con fosfato (Δ—Δ) recibieron penicilina (0,1 U/ml) (↓). Un tercer cultivo fue multiplicado en medio tamponado con TRIS y antes de añadir la penicilina fue centrifugado y resuspendido en el mismo medio tamponado con fosfato (○—○). Las variaciones de densidad del cultivo se siguieron por nefelometría (N).

to experimental dio lugar a una clara respuesta antibiótico-tolerante en *S. pneumoniae* (fig. 1) y que se hace patente en la estirpe R_6 , multiplicándose en medio tamponado con TRIS o con fosfato, frente a diferentes concentraciones de penicilina o beta-cloro-D-alanina (fig. 2). De esta figura se deduce claramente que el tampón TRIS no altera la viabilidad celular, y el efecto lítico en medio tamponado con fosfato resulta sustituido por una simple inhibición de la multiplicación bacteriana cuando el medio de cultivo está tamponado con TRIS.

A diferencia de lo que sucede en las condiciones de tolerancia hasta ahora descritas (empleo de mutantes autolisín-deficientes, células-EA y efecto protector del pH), lo que hace a estas nuevas condiciones de tolerancia particularmente interesante es la fuerte protección que proporcionan frente al efecto bactericida, indu-

cido por los antibióticos que actúan a nivel de pared. La multiplicación de *S. pneumoniae* en medio tamponado con TRIS o con fosfato, alcanza una concentración celular de 8×10^7 células y recibe diferentes concentraciones de penicilina. La pérdida de viabilidad en medios tampona-

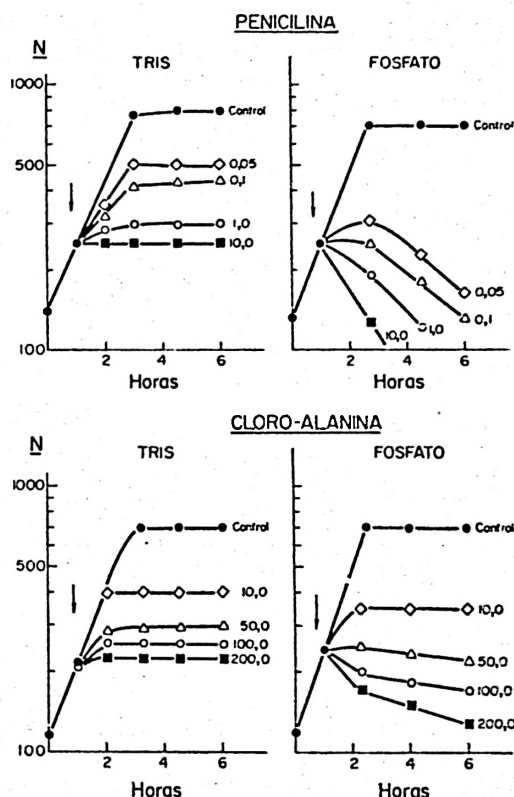


Fig. 2. Efecto de dos antibióticos inhibidores de la síntesis de pared sobre cultivos de *S. pneumoniae* (R_6) multiplicándose en medio tamponado con TRIS o con fosfato.

Cultivos de neumococo en fase exponencial de multiplicación (5×10^7 UFC/ml) en medio C tamponado con TRIS o con fosfato recibieron diferentes dosis de penicilina (U/ml) o de beta-cloro-D-alanina (μ g/ml) y se siguieron las variaciones de densidad de los cultivos por nefelometría (N). En todos los casos se incluyeron cultivos controles (●) que no recibieron antibióticos.

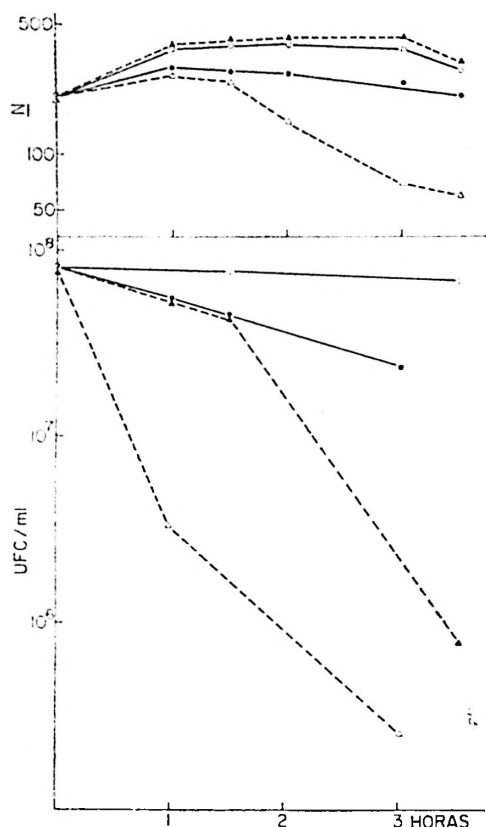


Fig. 3. Respuesta de *S. pneumoniae* (R_6) frente a la muerte celular y a la lisis inducida por penicilina en medio tamponado con TRIS o con fosfato.

Células de neumococo en fase exponencial de multiplicación ($7,5 \times 10^7$ UFC/ml) en medio C tamponado con TRIS (—) o con fosfato (---) recibieron penicilina a la concentración mínima inhibidora (0,02 U/ml; ▲, ○) o a una concentración superior (0,1 U/ml; △, ●). Las variaciones en las densidades de los cultivos fueron seguidas por nefelometría (N) y el número de células viables fue determinado por recuento en placa (UFC/ml).

dos con TRIS resulta mucho más lenta (fig. 3).

En la tolerancia por el empleo de TRIS el antibiótico alcanza su objetivo metabólico normal (fig. 4), probablemente una

enzima (*penicillin binding protein*) que interviene en el metabolismo de la pared celular (14) puesto que las células presentan los efectos morfológicos característicos producidos por la penicilina (formación de *bulges*) (1).

La figura 5 A muestra los resultados de incubar paredes radiactivas obtenidas a partir de células que se multiplican en medio tamponado con TRIS, en presencia de H^3 -colina, con cantidades variables de extractos crudos procedentes de células multiplicándose en medio tamponado con TRIS o fosfato. En la figura 5 B se ensayaron paredes radiactivamente marcadas obtenidas a partir de células multiplicándose en medios tamponados con fosfato frente a ambos tipos de extractos celulares. Los resultados muestran que las células multiplicándose en TRIS poseen una actividad autolítica normal y que sus paredes presentan una sensibilidad también normal, frente a las autolisinas obtenidas a partir de R_6 .

Cuando un mutante defectivo en la



Fig. 4. Multiplicación de *S. pneumoniae* (R_6) en medio C tamponado con TRIS (5×10^7 UFC por ml).

Recibió penicilina (0,1 U/ml) y se incubaron a 37°C durante 3 horas; en ese momento se observaron y fotografiaron con un microscopio de contraste de fases ($\times 6.500$).

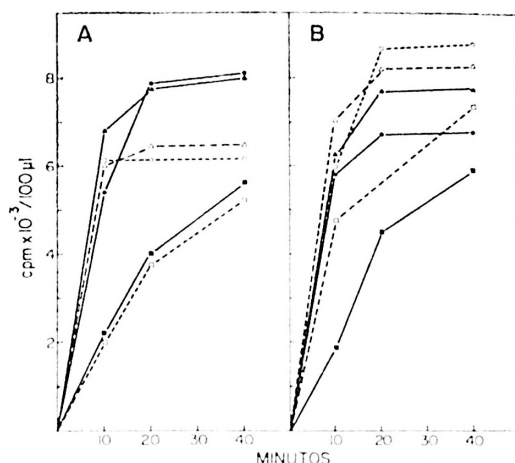


Fig. 5. Cinética de la degradación de paredes de *S. pneumoniae* obtenidas en medio tamponado con TRIS o con fosfato.

Paredes de *S. pneumoniae* (R_0) multiplicándose en medio C tamponado con TRIS (A) o con fosfato (B) fueron marcadas con (3 H)-colina (radiactividad total 10^5 cpm/100 μ l), purificadas (7) e incubadas con diferentes concentraciones de crudos de autolisina ($\blacksquare$, $\square$ = 5 μ l; $\blacktriangle$, $\triangle$ = 20 μ l; $\bullet$, $\circ$ = 100 μ l) obtenidos a partir de células multiplicándose en medio C tamponado con TRIS ($\blacksquare$, $\blacktriangle$, $\bullet$) o con fosfato ($\square$, $\triangle$, $\circ$). La degradación de las paredes fue seguida por la liberación de radiactividad no precipitable por ácido tricloroacético en el sobrenadante (3).

principal autolisina (N-acetil-muramil-L-alanil amidasa) presente en *S. pneumoniae* se utiliza en un experimento similar al descrito en la figura 3 se observa (datos no presentados) que este mutante multiplicándose en tampón TRIS presenta una clara resistencia al efecto bactericida inducido por antibióticos β -lactámicos a diferencia de lo que sucede cuando el medio se tampona con fosfato. A través de este mutante TOMASZ *et al.* (15) han descrito un fenómeno consistente en que la respuesta bacteriostática que dicho mutante presenta frente a moléculas β -lactámicas puede ser convertida en bacteriolítica al añadir autolisina pura o extractos crudos de la

autolisina. Este tipo de «curación fenotípica» requiere cantidades sensiblemente superiores de autolisina para poder poner de manifiesto una actividad bacteriolítica y bactericida en células que se multiplican en medios tamponados con TRIS (fig. 6). Otro hecho a destacar es que este diseño experimental permite separar claramente el efecto bacteriolítico y bactericida y demostrar que la muramil-amidasa desempeña, al menos parcialmente, un papel directo en la muerte celular inducida por penicilinas.

El efecto lítico inducido por antibióticos β -lactámicos se pone normalmente de manifiesto por las variaciones en densi-

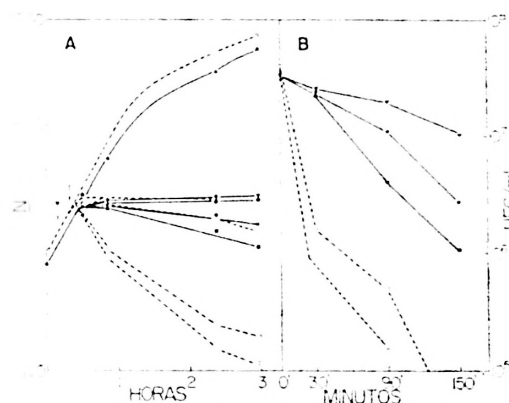


Fig. 6. Respuesta de un mutante de *S. pneumoniae* (CW-1) deficiente en autolisina, multiplicándose en medio tamponado con TRIS o con fosfato, frente a un tratamiento secuencial con penicilina y autolisina.

Células de CW-1 en fase exponencial de multiplicación (5×10^7 UFC/ml) en medio C tamponado con TRIS (—) o con fosfato (---), recibieron 0.1 U/ml de penicilina (∇) y después de 15 minutos de incubación a 37°C se dividió el cultivo en 3 porciones que recibieron ($\downarrow$) diferentes concentraciones de autolisina electroforéticamente pura (3); 1 μ l ($\blacklozenge$, $\blacklozenge$); 10 μ l ($\bullet$, $\circ$) y 40 μ l ($\blacksquare$, $\square$). Cultivos controles recibieron sólo autolisina ($\blacktriangle$, $\triangle$) o penicilina (∇ , ∇). A diferentes tiempos después de añadir el antibiótico, la enzima o ambos se controlaron las variaciones de densidad de los cultivos (A) y las modificaciones en la viabilidad celular (B).

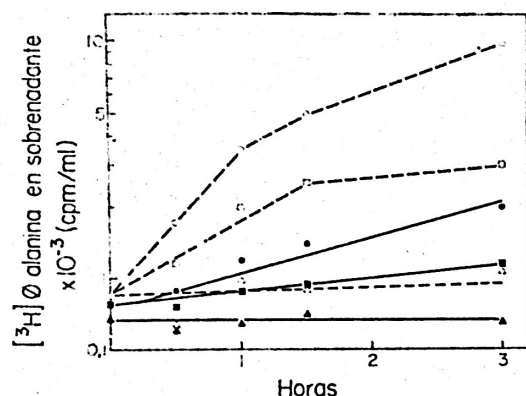


Fig. 7. Liberación de (^3H) -fenil-alanina a partir de células de mutante de *S. pneumoniae* (CW-1) multiplicándose en medio tamponado con TRIS o con fosfato como respuesta al tratamiento con penicilina y/o autolisina.

Células de CW-1 multiplicándose en medio C tamponado con TRIS (—) o con fosfato (---) fueron marcadas con (^3H) -fenil-alanina, centrifugadas, lavadas y resuspendidas en los respectivos medios sin isótopo radiactivo. A una concentración celular de $7,5 \times 10^7$ UFC/ml, el cultivo recibió 0,1 U/ml de penicilina y se dividió en varias alícuotas a las cuales se añadieron 20 μl (●, ○) de autolisina electroforéticamente pura y cultivos controles que recibieron sólo penicilina (■, □) o ni penicilina ni autolisina (▲, △). La liberación de proteínas intracelulares marcadas fue determinada tomando muestras a diferentes tiempos, centrifugando ($6.000 \times g$) y determinando la radiactividad en los sobrenadantes.

dad celular determinada por métodos ópticos (nefelometría, densidad óptica, etc.); sin embargo, en experimentos en los que se emplea la estirpe autolisina-defectiva la lisis del cultivo queda suprimida en presencia de tales antibióticos; por el contrario, la liberación al medio de cultivo de proteínas de localización exclusivamente intracelular (4) en *S. pneumoniae* (proteínas marcadas radiactivamente con fenil-alanina) se produce de forma apreciable en presencia de penicilina en medio tamponado con fosfato mientras que

tal liberación es notablemente reducida cuando el medio fue tamponado con TRIS (fig. 7). Esta diferencia en la liberación de proteínas intracelulares se pone de manifiesto cuando células multiplicándose en presencia de uno u otro tampón fueron «curadas fenotípicamente» por la adición de autolisina exógena.

Discusión

El papel fundamental que la N-acetil-muramil amidasa de *S. pneumoniae* desempeña en la muerte por lisis de esta bacteria en presencia de penicilina y otros antibióticos que actúan a nivel de síntesis de pared bacteriana, ha sido ampliamente documentado por la literatura (11, 13). Sin embargo, la tasa de disminución de la viabilidad es mucho más rápida que la lisis del cultivo y este efecto bacteriostático se elimina tan sólo muy parcialmente cuando se producen las denominadas condiciones de tolerancia bacteriana descritas en la literatura, bien sea mediante la manipulación bioquímica de la célula (células-EA) (2), el uso de mutantes que carecen de autolisina (células cw-1) (15) o a través del empleo de determinadas condiciones fisiológicas (pH) (6). La inhibición de la síntesis de proteína durante el tratamiento de *S. pneumoniae* con penicilina protege frente a la lisis y frente a la pérdida de viabilidad; ello sugiere que la protección incompleta contra la pérdida de viabilidad en las condiciones de «tolerancia» señaladas podría ser consecuencia de la existencia de un sistema autolítico incompletamente inhibido (14).

Las condiciones descritas en este trabajo permiten hablar de un método de protección tanto contra la lisis como contra la pérdida de viabilidad de *S. pneumoniae* tratada con penicilina. Tanto la estirpe salvaje como un mutante defectivo en autolisina se multiplican en medio tamponado con TRIS con tasas de multiplicación que no se diferencian de las que apa-

recen en medios tamponados con fosfato. Asimismo, las variaciones del pH de ambos medios de cultivo son muy similares (datos no presentados) con lo cual se excluye la posibilidad de cualquier efecto del pH descrito previamente (1, 6).

El mecanismo de tolerancia en las condiciones experimentales aquí descritas no resulta todavía aclarado, aunque se ha demostrado que la afinidad de la autolisina de *S. pneumoniae* por las paredes obtenidas a partir de células multiplicándose en medios tamponados con TRIS parece normal frente a las autolisinas obtenidas a partir de R_6 , así como que tales bacterias contienen una enzima autolítica también normal (fig. 5). Resultados preliminares apuntan hacia una variación en la composición de membrana y/o a variaciones cuantitativas en el contenido de determinados componentes de la pared celular.

Aún más interesante es el hecho de que cuando el mutante defectivo en autolisina se cultivó en medio tamponado con TRIS y se trató con penicilina, u otros inhibidores de pared, se indujo la lisis y la pérdida de la viabilidad celular (fig. 6) por adición al medio de cultivo de autolisina purificada. Como ya se sabe (15), sin tratamiento paralelo con antibiótico, la autolisina no tiene efecto sobre la multiplicación bacteriana.

Cabe destacar que las concentraciones de autolisina exógena necesaria para inducir la lisis del mutante tratado con penicilina son alrededor de 5 veces más elevadas si la bacteria se multiplica en medio tamponado con TRIS; y que la tasa de disminución de la viabilidad y de la lisis son proporcionales a la concentración relativa de autolisina exógena.

Finalmente, el medio protector aquí descrito ha permitido poner a punto un procedimiento (fig. 6) que muestra una mayor sensibilidad que los métodos ópticos usados comúnmente, para detectar posibles daños (p. ej., lisis) en las estructuras periféricas ocasionadas por el tratamiento

de las células con antibióticos beta-lactámicos.

Las observaciones descritas en este trabajo representan la primera evidencia experimental directa de que las autolisinas están implicadas, al menos parcialmente, en el efecto bactericida inducido por la penicilina y otros antibióticos beta-lactámicos.

Agradecimientos

Queremos mostrar nuestro público agradecimiento a Smith-Kline and French por la ayuda económica concedida para realizar el presente trabajo. Asimismo agradecemos a la Srta. Montserrat Jorba su experta ayuda técnica y a la Sra. María Luisa del Pozo el haber mecanografiado el manuscrito.

Resumen

Se estudia el fenómeno de «tolerancia antibiótica» y se crean nuevas condiciones experimentales para producir dicho fenómeno en *Streptococcus pneumoniae*, frente a penicilina y beta-cloro-D-alanina. Con el empleo de trihidroximetil aminometano como tampón del medio de cultivo, en lugar de fosfato, se logra una fuerte protección de las bacterias frente al efecto bactericida inducido por la penicilina.

Por otra parte, mediante el uso de un mutante defectivo en la autolisina mayoritaria presente en pneumococos se llega a la conclusión de que estas enzimas están, al menos parcialmente, implicados en el efecto bactericida inducido por las moléculas beta-lactámicas.

Bibliografía

1. GOODELL, E. W., LÓPEZ, R. y TOMASZ, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **73**, 3293-3297, 1976.
2. HOLTJE, J. V. y TOMASZ, A.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 7032-7034, 1974.
3. HOLTJE, J. V. y TOMASZ, A.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 4199-4207, 1976.
4. HORNE, D. y TOMASZ, A.: *Ant. Agents Chemoth.*, **11**, 888-896, 1977.
5. LACKS, S. y HOTCHKISS, R. D.: *Biochem. Biophys. Acta*, **39**, 508-517, 1960.

6. LÓPEZ, R., RONDA-LAIN, C., TAPIA, A., WAKS, S. y TOMASZ, A.: *Ant. Agents Chemoth.*, 10, 697-706, 1976.
7. MOSSER, J. L. y TOMASZ, A.: *J. Biol. Chem.*, 245, 287-298, 1970.
8. PORTOLÉS, A., RONDA, C. y LÓPEZ, R.: *Current. Chemoth. Procced. of the 10th Intern. Congress of Chemoth.* 509-512, 1978.
9. SABBATH, L. D., WHEELER, N., LAVERDIERE, M., BLAZERIC, D. y WILKINSON, B.: *The Lancet*, 8009, 443-447, 1977.
10. TOMASZ, A.: *J. Bacteriol.*, 101, 860-871, 1970.
11. TOMASZ, A.: *Rev. Infect. Dis.*, 1, 434-467, 1979.
12. TOMASZ, A., ALBINO, A. y ZANATI, E.: *Nature*, 227, 138-140, 1970.
13. TOMASZ, A. y HOLTJE, J. V.: En: *Microbiology 1977* (Schlessinger, D. ed.), American Society for Microbiology. Washington DC 1977, p. 209-215.
14. TOMASZ, A., KITANO, K., LÓPEZ, R. y FREITAS, C.: En: *Drug Action and Design: Mechanism-Based Enzyme Inhibitors* (Kalman). Elsevier North-Holland, Inc. Amsterdam, 1979, p. 197-224.
15. TOMASZ, A. y WAKS, S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 65, 1131-1135 1975.