REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE BARCELONA

LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

DISCURSO
leído por el Académico Electo
Dr. D. AMADEO FOZ TENA
el día 6 de febrero de 1977
en el acto de su recepción

DISCURSO
de contestación del Académico Numerario
Dr. D. JORGE GRAS RIERA

BARCELONA
1977

LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

REAL ACADEMIA DE MEDICINA DE BARCELONA

LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

DISCURSO
leído por el Académico Electo
Dr. D. AMADEO FOZ TENA
el día 6 de febrero de 1977
en el acto de su recepción

DISCURSO
de contestación del Académico Numerario
Dr. D. JORGE GRAS RIERA

BARCELONA
1977

Dep. Legal: B. 51.618 - 1976

Industria Gráfica Ferrer Coll, S. A. - Pje. Solsona, s/n. - Barcelona-14

Excelentísimo señor Presidente
Dignísimas Autoridades
Muy Ilustres Sres. Académicos
Señoras, Señores

El haber asistido en numerosas ocasiones a una ceremonia como ésta acompañando a los amigos que me han precedido en un puesto tan honroso como el de Académico Numerario de la Real Academia de Medicina de Barcelona, me ha permitido conocer los detalles de la ceremonia y el ambiente en que se desarrolla. Llegué a creer, ingenuamente, que ello podría bastar para sentirme tranquilo al presentarme ante Vds. y ser yo quien les dirija la palabra en cumplimiento de las normas que rigen la recepción de los nuevos académicos. Pero debo confesar que, llegado el momento, me encuentro con la incómoda sensación de quien no puede dar ni ofrecer aquello que de él se espera.

En primer lugar quiero expresar a los componentes de esta Real Academia mi agradecimiento por haberme elegido para figurar entre ellos como Miembro Numerario de una entidad que, tras más de 200 años de actividad, sigue representando para la clase médica de Cataluña la meta ansiada en la que viene a culminar la vida de los mejores de entre los que han cultivado la dura y, a la vez, hermosa y apasionante profesión de la medicina. Lo agradezco a los que han propuesto mi nombramiento, por haber valorado mi obra hasta el punto de solicitar mi incorporación a la Academia; a los que me han votado, por la confianza que han depositado en mí al creer que mi labor entre ellos puede ser útil y digna de una tradición tan honrosa, y también, y sin ninguna reserva, a los que no me votaron; ante ellos me siento obligado a esforzarme y a desarrollar una labor científica más intensa y, si ello me fuera dado, con planteamientos y con resultados de calidad superior a los conseguidos hasta ahora.

Finalmente, y de una manera muy especial, a los profesores Pedro Domingo y B. Rodríguez Arias, de quienes desde sus puestos de Presidente y de Secretario general perpetuo de la Corporación, he recibido siempre las mayores atenciones.

A pesar de haber sido elegido Académico Corresponsal en la ya lejana fecha de 1950, y a pesar de que a lo largo de estos años he tomado parte activa en la vida científica de la Academia, la propuesta para mi nombramiento como Académico

Numerario, apoyada inicialmente por mi maestro, el Profesor A. Pedro-Pons, y por un hombre de personalidad tan desbordante como el Dr. D. Luis Trías de Bes, por citar sólo a los ya desaparecidos, representó para mí una gratísima sorpresa; no creía poseer méritos suficientes para alcanzar un puesto en el que en alguna ocasión hemos soñado todos los que nos esforzamos en el cultivo de la medicina.

En el momento de mi elección comprendí que más que a mis posibles méritos, ello era debido a la buena disposición de un grupo de excelentes amigos que confiaban en mí. Me atrevo a suponer que, con su voto, querían reconocer mi dedicación entusiasta, siempre bienintencionada, no siempre fecunda y eficaz, al estudio de una serie de problemas médicos en los que me he ocupado durante el duro tercio de siglo que alcanza este período de mi vida.

No debo ni puedo olvidar en este momento al hombre, figura extraordinaria de la Medicina, a quien vengo a sustituir al ocupar el sillón 11 de esta Real Academia. Me refiero al Dr. D. Hermenegildo Arruga Liró, primer conde de Arruga, extraordinario en todos los aspectos, oftalmólogo eminentísimo, una de las figuras más importantes de la medicina catalana del siglo actual y uno de los médicos españoles cuya labor ha sido más conocida y valorada fuera de España en los cincuenta años últimos.

Nacido en 1886, hijo del Dr. D. Eduardo Arruga, oftalmólogo de gran prestigio, inició su formación junto a su padre y al Dr. Menacho, también famoso oculista, para pasar luego con la ayuda de una beca del Ayuntamiento de Barcelona a trabajar junto a los grandes maestros alemanes y franceses de comienzos de siglo. A mí, como microbiólogo, me complace destacar que el primer trabajo publicado por Arruga, en 1909 (6), se refería al interés en Oftalmología del diagnóstico serológico de la lúes; hacía sólo dos años que Wassermann, Neisser y Bruck habían introducido la reacción de fijación de complemento, conocida luego como reacción de Wassermann, la primera prueba serológica utilizada para el diagnóstico de la sífilis.

No puedo, por no estar capacitado para ello, analizar los grandes logros científicos conseguidos por Arruga en el campo de la Oftalmología, en especial en el de la Cirugía ocular. El profesor J. Casanovas (33) se ocupó en su día de este aspecto de la vida de Arruga y nos dio una visión difícilmente superable.

Resulta difícil comprender que una labor de *amplitud* tan extraordinaria como la realizada por Arruga, vaya unida siempre a una *calidad* también extraordinaria. He querido razonarlo valorando el hecho de que es la labor de más de 60 años, realizada por un hombre formado desde muy joven junto a grandes maestros, poseedor de una técnica excepcional y de una inteligencia clarísima y, a la vez, trabajador infatigable. Pero, aun así, cuesta trabajo comprenderlo. Sus libros: «Etiología y patogenia del desprendimiento de la retina» (7); Libro-Atlas sobre «El desprendimiento de la retina» (9) y su «Cirugía ocular» (8), representaron en su tiempo aportaciones difícilmente superables. Muchas de las técnicas por él ideadas, de las operaciones que llevan su nombre y de los instrumentos modificados o creados por él, siguen vigentes y en uso en los más diversos lugares del mundo.

Personalmente, yo, alejado del mundo de la Oftalmología, recuerdo aún la impresión que en mi época de estudiante me produjo el profesor M. Soria cuando al hablarnos del tratamiento del desprendimiento de retina nos explicó la gran aportación de Arruga al mismo, tras haber sido uno de los primeros en seguir a Gonin, ante el excepticismo de los más.

Muy poco después establecí un primer contacto personal con Arruga en circunstancias muy penosas para mí; hubo necesidad de intervenir a un hermano mío de desprendimiento de retina y fue Arruga quien realizó la intervención con su extraordinaria habilidad. Desde entonces hube de verle reiteradas veces; a pesar de ello no puedo decir que en aquellos momentos llegara a comprenderle.

También como una impresión personal me complace recordar la emoción que me produjo la primera vez que penetré en su despacho ver en el lugar de honor, entre docenas de fotografías de los más grandes representantes de la medicina de todo el mundo, un gran retrato de Cajal, dedicado muy afectuosamente. Me resultaba grato interpretar aquel retrato en aquel lugar, como un homenaje de Arruga a Cajal y de Cajal a Arruga.

Sólo muy posteriormente, y después de haber leído una buena parte de lo que sobre su personalidad y sobre su obra se ha escrito, de conversaciones con quienes le conocieron íntimamente y le trataron a lo largo de años, y de la información proporcionada gentilmente por su hijo, el Dr. Alfredo Arruga, creo haberlo comprendido, lo que me ha llevado a admirarlo, respetarlo y quererlo, tanto por su valor científico y profesional como por su calidad humana.

Ante un examen superficial hay un aspecto de su conducta que nos desorienta: la irregularidad de su carácter en el trato corriente; sus no infrecuentes brusquedades, con contestaciones ásperas, con respuestas secas que cortaban una conversación apenas iniciada. Me he atrevido a interpretar esta actitud como la de una persona para quien su trabajo y, por lo tanto, su tiempo, son cosas valiosísimas que no está dispuesto a malgastar inútilmente, unido ello a una profunda timidez compensada por el descubrimiento de que un grito o una manifestación de mal humor le alejaba la mayoría de las situaciones que podían perturbarle en el trabajo, en el estudio, en la realización de la obra bien hecha.

Apoyan esta interpretación incontables detalles de su vida entregada a sus enfermos, a su trabajo, a sus libros y, aspecto quizá menos conocido, a sus amigos. Quiero recordar a este propósito el hecho de que, en los años 1943 y 1944, cuando en nuestro país la vida era realmente dura y vivíamos rodeados de privaciones y problemas gravísimos, y cuando fuera de España, y concretamente en Francia y en Alemania, países sumergidos en una guerra cruel y espantosa, el hambre hacía presa en sus habitantes, Arruga sacrificaba todas las semanas unas horas de su trabajo y se dedicaba a buscar alimentos, jabón, etc. y todo lo que pudiera aliviar a sus colegas de los países en guerra, y a organizar el envío de «paquetes» que para ellos representaba una ayuda de valor incalculable. La lectura de las docenas y docenas de cartas en que estos colegas reiteran su amistad y expresan su agradecimiento resulta impresionante y, por lo menos a mí, me hizo comprender la

realidad de su carácter, de un Arruga que se deja llevar libremente por sus verdaderos impulsos y sentimientos.

Una vida tan llena, tan hermosa, conquistada con el trabajo de cada día, nos hacen pensar que Arruga fue una de esas personas a quienes puede aplicarse aquella frase que pone Goethe en los labios de Fausto cuando éste, momentos antes de morir, reflexiona sobre el sentido de su vida:

«Nur der verdient sich Freiheit wie das Leben
der täglich sie erobern muss»

versos que, de manera un tanto libre, podríamos traducir diciendo que «sólo se merecen la libertad y la vida quienes diariamente la han de conquistar con su esfuerzo».

Permitidme que ahora dedique un recuerdo a aquellos que con sus enseñanzas han contribuido a mi formación. De mis años como estudiante en la Facultad de Medicina de Barcelona quiero destacar, por la influencia que han ejercido sobre mí, al profesor Augusto Pi y Sunyer; las primeras lecciones de su programa de Fisiología las recordamos todos sus alumnos como un ejemplo de síntesis elemental y precisa de unos conocimientos básicos muy complejos, y de su proyección hacia los más dispares campos de la medicina. Al profesor Antonio Salvat, al que recuerdan muchos exclusiva, o casi exclusivamente, por sus pintorescas anécdotas, he de agradecerle unas unas ideas muy elementales, es cierto, pero clarísimas, sobre algunos de los puntos básicos de la Microbiología de aquella época.

Un comentario especial merece el profesor Pedro-Pons, con quien tuve la fortuna de estudiar los tres cursos de Patología Médica, y en cuyo Servicio entré al comenzar el cuarto curso de la licenciatura. Resulta muy difícil explicar las características de aquel Servicio en aquel momento; era pobre, con una organización rudimentaria, sin apenas jerarquías, sin escalafones oficiales ni nombramientos del numeroso y heterogéneo personal médico que lo componía y, sin embargo, o quizá por ello, era atractivo, funcionaba, era educativo y de él salían publicaciones que ejercieron una innegable influencia en el ambiente médico local y nacional. Entré en el mismo, como «internoide», en el año 1933.

En los años inmediatamente anteriores a nuestra guerra civil se incrementó el ritmo de las publicaciones. Casi siempre se basaban en observaciones clínicas; contenían con frecuencia aportaciones anatomopatológicas; se esbozaba ya un trabajo de bioquímica y bacteriología clínicas. Por entonces, las enfermedades infecciosas eran uno de los temas favoritos del Dr. Pedro-Pons. Mi interés por las mismas surge en aquellos momentos.

Durante la guerra se resintió todo el trabajo del Hospital. El profesor Pedro-Pons estudió entonces, con su buen sentido clínico habitual, los cuadros clínicos consecutivos a la hipoalimentación, estudios que luego recogió en una Monografía.

Después de la guerra los primeros años resultaron extraordinariamente difíciles pero muy pronto se trabajó en el Servicio, primero aisladamente y luego de manera

más organizada, en el sentido de modificar normas de trabajo, introducir técnicas nuevas, conseguir personal no docente retribuido, crear una base económica propia, reformar y modernizar los dispensarios, laboratorios, Servicio de radiología, crear nuevos servicios complementarios, etc.

Estas innovaciones, la madurez profesional y científica alcanzada por muchos de los buenísimos clínicos de las «salas» y de los dispensarios, la excelente calidad y entusiasmo de muchos de los miembros de los laboratorios y de los Servicios especializados (Radiología, Electrocardiografía, Electroencefalografía, etc.), junto con una serie de afortunadas circunstancias, entre las cuales hay que situar en lugar destacado el poder de atracción y el estímulo representado por la inteligente labor y por la abierta humanidad de Pedro Farreras, hicieron posible una evolución que condujo al Servicio al alto nivel alcanzado en la década de los 60.

Pero si queremos ser sinceros, hemos de reconocer, y confesar, que la creación de un Servicio con características tan especiales y la persistencia del mismo al nivel alcanzado, giraba en torno a la persona de Pedro-Pons. Que yo sepa, no se ha realizado aún un estudio de los mecanismos íntimos que condujeron a esta situación y la mantuvieron, pero el hecho es que fue así.

Además de a mis maestros, tampoco puedo olvidar a aquellos con quienes he trabajado en colaboración. Hace ya más de 40 años, Ortega llamaba la atención sobre el grave peligro representado por el rápido crecimiento de los conocimientos que nos vemos obligados a asimilar. «Hoy más que nunca —dice— el exceso mismo de riqueza cultural y técnica amenaza con convertirse en una catástrofe para la humanidad porque a cada nueva generación le es más difícil o imposible absorberlo.» Esto lo dice a finales de la década de los 20 y referido a la enseñanza. Si pensamos que los conocimientos científicos adquiridos desde entonces superan a los acumulados hasta aquel momento, y si añadimos a ello el hecho de que el ritmo y la calidad de la producción científica se mantienen a niveles elevadísimos, se comprende que dar un paso más en nuestros conocimientos científicos resulte prácticamente imposible de ser realizado en solitario. Si nos limitamos al campo de la medicina todos somos conscientes de que la amplitud y complejidad de los conocimientos médicos actuales justifican el hecho de que no sólo para realizar un trabajo de investigación sino que incluso para establecer un diagnóstico, sea necesaria la colaboración y el recurrir, cada vez con mayor frecuencia, al trabajo en equipo.

Prueba de ello es que la mayoría de los trabajos científicos, a partir de una calidad mínima, aparecen firmados por más de una persona, con frecuencia dos o tres, no excepcionalmente por cuatro o cinco y algunas veces hasta por más de diez.

En los últimos años muchos de mis trabajos se han realizado con la ayuda de jóvenes colaboradores, casi todos ellos pertenecientes a los Servicios dirigidos por mí, primero en el Hospital Clínico y Provincial de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona y en el Departamento de Investigación del Hospital de Ntra. Sra. del Mar (en la actualidad Instituto Municipal de Investigación Mé-

dica, del Hospital General de Ntra. Sra. del Mar), ahora en este Instituto o en el reciente y modestísimo Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona. Con todos ellos la colaboración ha sido agradable y estimulante y de todos guardo el más grato recuerdo y el deseo de poder continuar o reanudar una colaboración como ésta. Sería para mí un verdadero orgullo saber que ellos guardan un recuerdo tan grato como yo de esta colaboración, que con frecuencia se ha mantenido a lo largo de muchos años.

No debemos olvidar que, además, hay siempre un grupo, en ocasiones muy numeroso, de otros colaboradores más modestos, no universitarios, y cuyo nombre no figura entre los firmantes del trabajo; en la mayoría de los casos aquella investigación no se hubiera podido desarrollar sin su ayuda. A todos ellos, a su labor tenaz, constante, monótona en ocasiones, atropellada a veces, anónima casi siempre, quiero agradecer en este momento su valiosísima ayuda.

Para la toma de posesión de los Académicos Numerarios, es un deber preceptivo la presentación y lectura de un Discurso de recepción. Es, en verdad, un deber honroso pero, por lo menos para mí, lleno de dificultades. No resulta fácil elegir un tema que reúna al mismo tiempo las cualidades de ser de actualidad, interesante desde el punto de vista científico y susceptible de un desarrollo que lo haga, por una parte, asequible a quienes con escasos conocimientos médicos o, incluso desligados profesionalmente de la medicina, han querido acompañarnos en este momento y, por otra parte, no deje de interesar a quienes por sus conocimientos médicos, podían desear que fuera desarrollado con más detalle y profundidad. Creí en el primer momento que el tema elegido «La resistencia bacteriana a los antibióticos», podía cumplir con tales requisitos; a medida que avanzaba en su preparación aumentaba mi temor acerca del acierto en la elección. Espero que al terminar me perdonéis los fallos que hayáis podido descubrir.

LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

I. INTRODUCCION

Creo que resulta muy difícil para un médico joven comprender lo que representaban las enfermedades infecciosas en una época tan próxima a la nuestra como el comienzo del siglo actual e, incluso, al finalizar su primer tercio, concretamente, hacia 1935. Hemos fijado esta fecha por ser en dicho año cuando apareció la publicación de Domagk (46) en la que se describían los beneficiosos efectos del *Prontosil rubrum*, la primera sulfamida utilizada para el tratamiento de las infecciones humanas.

Hasta entonces el tratamiento etiológico de la mayoría de las *enfermedades infecciosas* era ilusorio; la misión del médico se limitaba casi siempre a la observación del curso de la enfermedad, a la instauración de unas medidas higiénicas y dietéticas, muchas veces empíricas, y, en el mejor de los casos, a una *terapéutica sintomática* (antitérmicos, desbridamiento de abscesos, baños fríos, etc.).

Es cierto que existían algunas medicaciones eficaces; una de las más importantes era la quinina, alcaloide de la corteza de la quina; ésta fue introducida en Europa a comienzos del siglo XVII por los médicos españoles, remedio tomado de la medicina tradicional de los indios del Perú; muy eficaz para el tratamiento del paludismo, se utilizó también en otras enfermedades febriles, con resultados decepcionantes. En segundo lugar cabe mencionar los preparados de la raíz de ipecacuana, eficaces para el tratamiento de la disentería amebiana. Destaquemos que ninguna de las dos enfermedades que acabamos de mencionar es una *enfermedad producida por bacteria;* ambas están producidas por protozoos.

Para el tratamiento de las *enfermedades bacterianas* nuestras posibilidades eran aún menores pues se limitaban al empleo de los preparados mercuriales y bismúticos en la sífilis y de los yoduros en la actinomicosis. Podríamos discutir si debía figurar en esta tan breve relación el salicilato sódico, útil como tratamiento de la fiebre reumática. También podrían incluirse, aunque con graves reservas de diversa índole, las sales de oro, la optoquina y productos similares, el aceite de chaulmoogra, etc.

Representó un hecho trascendental en la historia de las enfermedades infecciosas la introducción por Ehrlich, en 1909, de un preparado arsenical sintético útil para el tratamiento de la sífilis; nos referimos al Salvarsan, conocido como preparado 606 por corresponderle este número en la serie de productos ensayados hasta encontrar uno eficaz y relativamente inocuo; pocos años después (1912) fue seguido por el Neosalvarsan, o 914, más eficaz, más inocuo y de aplicación más cómoda.

Merecen un comentario especial los preparados inmunoterápicos específicos. La *seroterapia curativa* se introdujo a finales del siglo XIX por Behring y Kitasato (22) y por Kitasato (1890 y 1891), quienes consiguen inmunizar animales con toxina tetánica y demostrar la aparición en el suero de los mismos de una antitoxina específica con marcada acción profiláctica y discutido valor curativo. Inmediatamente se utilizó en el hombre. En 1894, Behring introdujo el suero antidiftérico, mucho más útil que el antitetánico desde el punto de vista terapéutico.

Tanto el suero antitetánico como el antidiftérico son, como es sabido, *sueros antitóxicos*. Muy poco después se intentó ampliar el campo de la seroterapia con el empleo de los sueros *antibacterianos* (antimeningocócico, antiestreptocócico, antineumocócico, etc.), todos ellos de valor discutible con excepción del suero antineumocócico tipoespecífico obtenido en el conejo, de eficacia comprobada.

Aparte de los mencionados hasta ahora, hemos de reconocer que la mayoría de todos los demás productos utilizados para el tratamiento de las infecciones bacterianas eran, o poco útiles, o inútiles, o perjudiciales.

Como consecuencia de tan gran pobreza terapéutica y de la contagiosidad de estos procesos, el conjunto de las enfermedades infecciosas representaba una de las más importantes causas de muerte en todas las edades. Además, significaron durante siglos una carga considerable tanto por la enfermedad en sí como por sus secuelas de todo tipo (ceguera, sordomudez, mutilaciones, transtornos motores, cuadros neurológicos residuales, lesiones valvulares cardíacas, incapacidad para todo tipo de trabajo, etc.) que aumentaban considerablemente la carga representada por las enfermedades infecciosas.

Pensemos, por ejemplo, en el elevadísimo número de mujeres que en plena juventud morían víctimas de la sepsis puerperal; en las meningitis bacterianas que producían igualmente gran número de muertes o dejaban como secuela graves trastornos permanentes; la tuberculosis, de evolución con frecuencia inexorable, que sólo hace un siglo era responsable en numerosos países de más del 10 % del número total de muertes; en la fiebre tifoidea, con una letalidad que podemos fijar globalmente alrededor del 20 % y que se presentaba en forma de grandes epidemias. Recordemos como ejemplo, la ocurrida en Barcelona en 1914 (111), que ocasionó 2.267 muertos, y tantos ejemplos como podríamos añadir.

Fijémonos en que todas las enfermedades que acabamos de mencionar son enfermedades *bacterianas*. Prescindiremos intencionadamente en esta introducción, y prescindiremos a lo largo de nuestro Discurso, de las pertenecientes a los otros grupos de enfermedades infecciosas, es decir, las viriasis, las producidas por

hongos, las helmintiasis y las producidas por artrópodos. Aunque algunos de estos grupos son de importancia extraordinaria, escapan al tema que nos hemos propuesto desarrollar que se limita al estudio de los problemas que plantea la adquisición de resistencia de las *bacterias* a los antibióticos.

> Algo mejor era la situación en el aspecto profiláctico ya que se disponía de algunas vacunas y de medidas higiénicas realmente eficaces. Entre las vacunas, aparte de la más útil, la antivariólica (una vacuna antivírica), hay que mencionar la antitetánica y la antidiftérica, las dos de valor considerable, y la antitífica, anticolérica, antituberculosa (BCG) y otras, también eficaces, aunque con limitaciones que no es éste el momento de discutir.
>
> Por lo que se refiere a las medidas epidemiológicas, podemos destacar el valor de la lucha contra los artrópodos vectores (mosquitos, piojos, pulgas, etc.), el aislamiento de determinados tipos de enfermos, el control sanitario de la carne, la depuración de las aguas de suministro público, etc., conjunto de medidas muy eficaces pero que con frecuencia, por razones técnicas, económicas, de organización, o, incluso, políticas y psicológicas, no rindieron en todos los países los grandes beneficios que podían haber llegado a rendir.

A partir de la introducción de las sulfamidas en 1935, el panorama cambió radicalmente en el plazo de muy pocos años. Aunque su acción antibacteriana se descubrió en el año 1932, los ensayos experimentales y clínicos se prolongaron a lo largo de los años 1933 y 1934 para aparecer en febrero de 1935 la publicación inicial de Domagk (46): «*Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen*», en la que se hace público el valor extraordinario del *Prontosil rubrum* para el tratamiento de las enfermedades producidas por estreptococo hemolítico (erisipela, fiebre puerperal, septicemia, etc.).

El primer trabajo de Domagk fue seguido, por una parte, de la síntesis de un gran número de preparados sulfamídicos de los que muchos llegaron a introducirse en terapéutica por su mayor eficacia, su menor toxicidad o por sus características farmacocinéticas que los hacían más seguros y más cómodos de administrar. Por otra parte, el estudio del mecanismo de acción de las sulfamidas condujo a dos observaciones muy importantes: la de que un producto poco o nada activo *in vitro* puede ser eficaz *in vivo* al desdoblarse, con liberación de un compuesto activo, y la de que para que una sustancia sea activa contra un determinado microorganismo no es imprescindible que ejerza acción *bactericida* sobre el mismo; puede bastar con que actúe como un *bacteriostático,* es decir, puede bastar con que inhiba la proliferación bacteriana en el organismo enfermo para que los mecanismos defensivos normales del mismo sean capaces de resolver en último término el problema infeccioso.

No cabe duda de que la sulfamidoterapia representó un avance terapéutico

considerable, aunque de extensión limitada, ya que su acción beneficiosa se ejerce de manera preferente sobre un grupo de enfermedades producidas por cocos, tanto grampositivos como gramnegativos. Es bien conocida la gran utilidad de las sulfamidas, sobre todo en la fase inicial de su introducción, para el tratamiento de las enfermedades producidas por meningococo y gonococo, entre los cocos gramnegativos, y por estreptococo hemolítico y neumococo, entre los grampositivos. Por el contrario, su utilidad para el tratamiento de las infecciones por bacilos gramnegativos, micobacterias, rickettsias, etc., es menor, en ocasiones incluso nula.

Gracias, pues, al empleo de las sulfamidas, se dispuso por primera vez de un método eficaz para el tratamiento de la meningitis meningocócica, los procesos gonocócicos, las septicemias producidas por estreptococo hemolítico, la neumonía neumocócica, la erisipela, la escarlatina, etc., procesos que hasta ese momento carecían de un tratamiento eficaz o que, caso de existir, como por ejemplo, el tratamiento de la neumonía neumocócica por sueros tipoespecíficos obtenidos en el conejo, planteaban problemas técnicos y económicos de tal envergadura que limitaban de manera considerable su empleo.

Pero, además de su limitado espectro antibacteriano y de ciertas acciones tóxicas, en ocasiones de cierta gravedad, las sulfamidas presentan el grave inconveniente de la facilidad con que surgen cepas bacterianas resistentes a las mismas.

Pocos años después de la introducción de las sulfamidas en terapéutica ocurrió otro hecho aún más trascendental, la introducción de la penicilina, hecho con el que se inicia la era de los antibióticos, en la que ha cambiado de raíz toda la terapéutica antiinfecciosa o, si queremos ser más exactos, la de las enfermedades producidas por bacterias y, en menor grado, la de las micosis, ya que, por lo menos hasta el momento actual, el tratamiento etiológico de las enfermedades producidas por virus, por protozoos, por helmintos y por artrópodos se ha beneficiado muy poco o nada de los antibióticos en uso.

El descubrimiento de la penicilina se hizo público por Fleming (51) en un trabajo titulado: «*On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*», aparecido en junio de 1929, es decir, 6 años antes que el trabajo princeps de Domagk al que acabamos de referirnos. El poco éxito de los ensayos terapéuticos iniciados por Fleming y sus colaboradores inmediatamente después del descubrimiento de la penicilina, redujeron el papel de la misma, durante una serie de años, al de una curiosidad de laboratorio: adicionada a determinados medios de cultivo, favorecía el aislamiento de las especies bacterianas resistentes al impedir la proliferación de las sensibles.

Mencionemos como curiosidad el hecho de que, en 1939, Dubos obtuvo de cultivos de *Bacillus brevis* la tirotricina, un antibiótico del grupo de los polipéptidos que consta de tirocidina y de varias gramicidinas. Aunque se trata de antibióticos muy activos *in vitro*, su elevada toxicidad no permite su administración parenteral quedando relegado su empleo a aplicaciones locales y aun éstas limitadas y con reservas.

En 1938, Florey y Chain emprenden un estudio sobre las sustancias antibacterianas naturales, tomando como base del mismo la penicilina. Se unen a ellos Abraham, Gardner, Heatley, Jenning, Sanders, Fletcher y Lady Florey (1); este grupo de investigadores constituye el llamado «grupo de Oxford».

No cabe duda de que la introducción de las sulfamidas, que demostró de manera irrefutable la posibilidad de un tratamiento eficaz de las enfermedades bacterianas, así como la observación de que por un mecanismo simplemente *bacteriostático, no bactericida,* se lograba la curación de numerosas enfermedades bacterianas, formó parte del complejo de circunstancias que impulsó a reexaminar el valor terapéutico de la penicilina, lo que en manos del «grupo de Oxford» condujo a la concentración y purificación de la misma y a su aplicación experimental y en el hombre, con los resultados tan sensacionales de todos conocidos. En los 20 años que siguieron a la primera inyección de penicilina al hombre, hecho ocurrido el 12 de febrero de 1941 (1), se descubrieron y pusieron en uso la estreptomicina, el cloranfenicol, las primeras tetraciclinas, la colistina, eritromicina, nistatina, amfotericina B, kanamicina, novobiocina, vancomicina, etc.

En los 15 años últimos la investigación ha seguido dos caminos diferentes, la búsqueda de nuevos antibióticos naturales, con el descubrimiento entre otros de la gentamicina, tobramicina, rifamicina, etc., y la modificación de la molécula de algunos antibióticos que ha conducido a la creación de varios grupos de *antibióticos semisintéticos,* algunos de ellos tan importantes como las penicilinas semisintéticas y las celafosporinas. Con todo ello nuestro arsenal terapéutico antibacteriano es tan amplio que nos permite tratar de manera eficaz la mayoría de las enfermedades producidas por bacterias, con sustancias en su mayoría muy poco tóxicas.

La trascendencia de la aplicación terapéutica de los antibióticos es tal, que ha cambiado radicalmente no sólo el tratamiento de las enfermedades infecciosas sino la significación de las mismas en cuanto causa de enfermedad y de muerte.

En 1968, con Pedro-Pons y Farreras (111), resumíamos este hecho con las siguientes palabras: «Merced a los poderosos antibióticos y quimioterápicos de que se dispone hoy en día, el médico posee un arma colosal, nunca alcanzada en otras épocas, para el tratamiento eficaz de la mayoría de las infectopatías. Con los actuales tratamientos se han resuelto problemas de muy diversa naturaleza.

Se ha logrado la curación: De enfermedades como la erisipela, uretritis gonocócica, etc., que si bien no eran de pronóstico grave y evolucionaban hacia la curación en la mayoría de los casos, resultaban temibles por sus complicaciones o por el paso a la cronicidad. De enfermedades de pronóstico grave, como la tifoidea, tuberculosis, neumonía, meningitis bacterianas, sepsis puerperales, etc., en las que el médico se tenía que limitar a la vigilancia del enfermo y a aplicar tratamientos sintomáticos o pretendidos tratamientos específicos cuya eficacia no siempre estaba bien demostrada. De enfermedades, como la sífilis, en las que un tratamiento peligroso, largo y caro ha sido sustituido por otro bien tolerado, breve y económico. De enfermedades de pronóstico gravísimo, como las sepsis que con

tanta frecuencia aparecen en los enfermos de agranulocitosis, las sepsis agudísimas por estafilococo, meningococo, etc., las peritonitis generalizadas consecutivas a perforaciones de estómago, intestino o apéndice, etc. Y de algunos procesos, como las endocarditis lentas y la meningitis tuberculosa, hasta entonces siempre mortales.»

Señalemos una vez más que todas las enfermedades que acabamos de mencionar están producidas por bacterias.

> No podemos describir un panorama tan optimista al resumir los logros obtenidos en el tratamiento de las enfermedades producidas por hongos; los antibióticos eficaces para el tratamiento de las micosis son mucho menos numerosos y algunos de los utilizados para las micosis profundas mucho más tóxicos. Hasta hace poco, aparte de la nistatina y de la anfotericina B para las micosis profundas, y de la griseofulvina para las superficiales, no teníamos a nuestra disposición más que algunas pocas sustancias con cierto valor coadyuvante. En los últimos años ha mejorado el panorama aunque más que por la aparición de nuevos antibióticos por la introducción de quimioterápicos de manifiesta eficacia, tales como la 5-fluorocitosina, el miconazole y el cotrimazole.
>
> En el caso de las enfermedades producidas por protozoos, por helmintos, por artrópodos y por virus, los resultados son aún más pobres; con pocas excepciones, y algunas de ellas discutibles, las enfermedades de estos cuatro grupos no se benefician del empleo de los antibióticos. Disponemos, por el contrario, para el tratamiento de algunas de ellas de quimioterápicos de valor indudable.

NATURALEZA Y ESTRUCTURA DE LA CELULA BACTERIANA

Si consideramos que el objeto de nuestro Discurso es el estudio de los mecanismos de adquisición de resistencia *bacteriana* a los antibióticos, nos parece de interés precisar con algún detalle el concepto de bacteria, así como limitar con exactitud los microorganismos que deben incluirse dentro de las bacterias.

Recientemente (1974) ha aparecido la 8.ª edición del Manual de Bergey (27), libro de sistemática bacteriana preparado por un grupo de 131 bacteriólogos de quince países con la pretensión de alcanzar reconocimiento y validez universales, en la que se acepta la creación de un nuevo reino, el de las *procariotas*, que viene a añadirse a los reinos clásicos: animal y vegetal.

En el reino de las procariotas se incluyen todas las bacterias, junto con las algas cianofíceas. Este grupo de algas se caracteriza por una estructura igual a la de las bacterias hasta el punto de que se ha propuesto renunciar a la expresión «algas cianofíceas» y sustituirla por la de «bacterias fotosintéticas verde-azuladas». No es éste el lugar para precisar y discutir las semejanzas y las diferencias entre las algas cianofíceas y las verdaderas bacterias.

Con la palabra *procariota* se expresa un tipo de organización celular propio de las bacterias; la célula procariota presenta diferencias radicales con todos los demás tipos de células, animales o vegetales, de organismos monocelulares o pluricelulares, a las que se califica de células *eucariotas*. A pesar de que ya en 1937 Chatton (39) propuso una clasificación de este tipo, fueron Stainer y Van Niel, en 1962 (125), quienes dieron el paso definitivo en la difusión de estos conceptos al precisar que: «La propiedad característica de las bacterias y de las algas cianofíceas es la naturaleza procariota de sus células.» Estos conceptos se han difundido ampliamente y en la actualidad forman parte de la educación de los estudiantes de biología y de medicina.

Aunque las células procariotas son, por lo general, de menor tamaño que las eucariotas, esta diferencia es secundaria. Las características diferenciales entre unas y otras, son:

1. El material genético de la bacteria yace en el citoplasma sin ningún tipo de membrana que lo individualice o separe, al contrario de lo que ocurre en las eucariotas, en las que existe una membrana nuclear bien aparente.

2. Dicho material genético consta de ácido deoxirribonucleico (ADN). A diferencia de las eucariotas, en las que está unido a histonas, el ADN bacteriano va unido a las pequeñas poliaminas espermina y espermidina cuya misión consiste en neutralizar la fuerte carga negativa del ácido.

3. El ADN de las células procariotas no se fragmenta ni dispone en cromosomas en el momento de la reproducción bacteriana, en oposición al complejo proceso de la mitosis y la meiosis característico de las células eucariotas.

4. Aunque la mayoría de las bacterias poseen una pared muy resistente, esta característica carece de valor diferencial, ya que existe un grupo de bacterias desprovistas de pared. Posee, por el contrario, valor taxonómico, la presencia en la pared bacteriana de unas sustancias complejas, un tipo especial de heteropolímeros, que se encuentran única y exclusivamente en la pared bacteriana y nunca en las células eucariotas, aunque posean pared.

5. Las células procariotas poseen una membrana citoplasmática semejante a la de las células eucariotas; la diferencia estriba en que algunos organelos intracitoplasmáticos de la célula eucariota aparecen rodeados por una membrana igual a la citoplasmática, mientras que la célula procariota no contiene organelos provistos de membrana.

6. Tanto las células procariotas como las eucariotas poseen abundantes ribosomas, con la diferencia entre unas y otras del menor tamaño, 70S en las procariotas, en oposición a 80S en las eucariotas.

7. Los organismos procariotas no muestran la menor tendencia a una especialización funcional así como tampoco a constituir organizaciones equiparables a una estructura hística, ni aun en los casos en que se disponen en grandes acúmulos tipo zooglea.

Existen también diferencias en la naturaleza y constitución de los flagelos, la incapacidad para la pinocitosis y fagocitosis de las células procariotas, a diferencia de algunas células eucariotas en las que estos fenómenos son de importancia vital, etc.

El conocimiento detallado de la estructura celular bacteriana y el hallazgo de las características que acabamos de esbozar, nos permite precisar los microorganismos que podemos considerar realmente como bacterias o, dicho con una expresión más actual, los microorganismos pertenecientes al reino de las procariotas.

El reino de las *Procaryotae* comprende dos *Divisiones:* en la primera —las *Cianobacterias*— se incluyen los microorganismos procariotas fototróficos, tanto si son algas como si son bacterias; el hecho de que entre dichos microorganismos no existan especies patógenas para el hombre, nos exime de ocuparnos en los mismos.

La división II —las *Bacterias*— es, por el contrario, muy importante para nosotros ya que se han situado en ella, junto a numerosas especies bacterianas no patógenas, todas las bacterias con capacidad patógena para el hombre, los animales y las plantas. Comprende, pues, esta división además de las bacterias típicas (los cocos y los bacilos grampositivos y gramnegativos, las espiroquetas, los espirilos y las micobacterias), las rickettsias en su sentido más amplio y, en una *clase* aparte, las bacterias desprovistas de pared.

Considero importante insistir en que todos estos microorganismos son verdaderas bacterias y debemos abandonar, posiblemente de manera definitiva, la idea de la existencia de grupos de microorganismos que se consideraban «formas intermedias» entre éstas y otros grupos de microorganismos. No cabe considerar las espiroquetas como protozoos u organismos similares a los protozoos ya que por su estructura son bacterias. Tampoco podemos aceptar la postura tan difundida hasta nuestros días de incluir los actinomicetos entre los hongos; de la misma manera que con criterio microbiológico hemos de estudiar los actinomicetos entre las bacterias, en el aspecto clínico debemos separar la actinomicosis y la nocardiosis de las micosis y estudiarlas con las enfermedades bacterianas.

El tercer grupo de bacterias consideradas hasta hace poco como microorganismos mal definidos, es el de las rickettsias y dentro del grupo, con mayor fuerza aún, los microorganismos incluidos en el género *Chlamydia,* que en algunas publicaciones figuran todavía con la denominación de «virus grandes»; ni las rickettsias son microorganismos intermedios entre virus y bacterias ni dentro de ellas las especies del género *Chlamydia* son virus grandes; todas son bacterias con características, es cierto, bastante especiales, pero bacterias.

El último grupo con una situación especial es el de los micoplasmas; hoy sabemos que se trata de bacterias desprovistas de pared.

Hemos tenido interés en precisar estos conceptos porque la naturaleza bacteriana de todos estos microorganismos explica un hecho de trascendencia práctica extraordinaria, cual es el de su sensibilidad a los antibióticos activos sobre las bacterias y, como es lógico, la posibilidad de tratar las enfermedades producidas

por espiroquetas, rickettsias, actinomices y micoplasmas con antibióticos antibacterianos.

Hasta este momento nos hemos ocupado en precisar las propiedades que caracterizan a las bacterias, para así poder limitar con precisión nuestro tema. Hemos señalado la importancia y gravedad de las enfermedades infecciosas y, de manera más concreta, de las enfermedades producidas por bacterias, hasta el inicio de la que se ha venido en llamar *era antibiótica* y hemos hecho un esbozo rapidísimo de lo mucho conseguido en el tratamiento de las enfermedades bacterianas mediante los antibióticos. Pero, como ocurre casi siempre, un avance o una conquista, aun ésta que por su naturaleza nos puede parecer desprovista de aspectos negativos, acaba por poner al descubierto, más pronto o más tarde, facetas que vienen a enturbiar un panorama que se nos aparecía como absolutamente transparente. Por lo que se refiere al empleo de los antibióticos, hemos de señalar dos aspectos negativos; en primer lugar los accidentes que provocan que, aunque con frecuencia son debidos a una administración indebida de los mismos, en otros casos se observan tras su administración de acuerdo con las normas más ortodoxas. Este aspecto importante de la antibioticoterapia se escapa al objeto de nuestro Discurso.

El segundo aspecto, posiblemente de mayor trascendencia, es el de la adquisición de resistencia de las bacterias a los antibióticos o, más concretamente, de *algunas* bacterias a *algunos* antibióticos. Es éste un fenómeno muy complejo, acerca del cual hemos adquirido en los últimos años conocimientos suficientes para empezar a comprenderlo y, en parte, para evitarlo. Vamos a abordarlo en la primera de estas dos vertientes, es decir, el estudio de los mecanismos que conducen a la adquisición por las bacterias de un estado de resistencia a los antibióticos.

SENSIBILIDAD BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

Cuando se inició el estudio de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos, se vio muy pronto que las diferentes especies bacterianas no presentan el mismo grado de sensibilidad a un antibiótico determinado. Ya Fleming (51), en su primera publicación sobre la penicilina, señaló que la acción de ésta se dirigía fundamentalmente contra los cocos piógenos grampositivos y gramnegativos mientras que era muy poco o nada activa sobre los bacilos gramnegativos.

De la misma manera se observó que en algunas especies bacterianas todas las cepas son sensibles a un antibiótico determinado, en otras todas son resistentes y en otras, finalmente, se encuentran *cepas sensibles* y *cepas resistentes.*

También nos interesa destacar aquí el hecho de que a lo largo de los años puede aumentar la proporción de las cepas de *una* especie bacteriana resistente a *un* antibiótico determinado.

El estudio de los mecanismos que conducen al aumento, o a la aparición, de

cepas resistentes dentro de especies naturalmente sensibles, es el tema que vamos a tratar. Pero antes de entrar en el mismo hay que precisar el concepto de *microorganismos sensibles y microorganismos resistentes.*

Concepto de resistencia bacteriana a los antibióticos

No resulta fácil precisar el concepto de *resistencia* y de *sensibilidad* bacteriana a los antibióticos; en los casos extremos no plantea problemas y así, por ejemplo, se sabe que los meningococos son sensibles a la penicilina G, que los *Proteus* son resistentes a la eritromicina, etc. Pero en las situaciones intermedias, muy frecuentes, puede resultar difícil clasificar un germen como sensible o como resistente.

Son muy numerosos los criterios utilizados para la clasificación de una cepa bacteriana como sensible o como resistente y para el establecimiento de grados de sensibilidad entre las sensibles.

Ericson y Sherris (49) clasifican dichos criterios en los cuatro grupos siguientes:

a) La relación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) para el microorganismo con los niveles de antibiótico alcanzables en la sangre, en los tejidos, en la orina, etc., con determinadas dosis.

b) La relación de la sensibilidad de la cepa en estudio con la de otras cepas de la misma especie.

c) La relación de la sensibilidad de la cepa con la de una cepa estándar.

d) La relación de los hallazgos *in vitro* con la respuesta clínica.

Cada uno de estos cuatro criterios por separado es discutible, y en muchas ocasiones poco preciso, pero desde el punto de vista práctico puede resultar de utilidad uno de ellos aislado o, mejor, la aplicación simultánea de dos de ellos. Y así, Ericson y Sherris (49), en las recomendaciones del *Report of an International Collaborative Study* patrocinado por la OMS, recomiendan que para clasificar las bacterias como resistentes o como sensibles y para establecer diferentes grados de sensibilidad entre las sensibles, se debe tener en cuenta la relación entre la CIM y los niveles del antibiótico en la sangre, en los líquidos orgánicos y en los tejidos, así como la distribución de los grados de sensibilidad entre las diferentes especies en relación a su respuesta clínica.

Desde el punto de vista clínico se aconseja el establecimiento de tres grados de sensibilidad: cepas *sensibles,* cepas *resistentes* y una categoría intermedia de cepas *moderadamente sensibles.*

Se consideran *cepas sensibles* las que presentan un grado de sensibilidad tan elevado que cuando las infecciones generales de gravedad moderada producidas por ellas se tratan adecuadamente con las dosis habituales del antibiótico, se consigue una respuesta terapéutica satisfactoria.

Se consideran *cepas resistentes* las que presentan un grado tal de resistencia que hace improbable un resultado satisfactorio en las condiciones anteriores.

Finalmente, el grupo de las bacterias *moderadamente sensibles* comprende las que poseen un grado tal de sensibilidad que cabe la curación clínica tras la administración del antibiótico a dosis más elevadas de las habituales, si su toxicidad lo permite, o cuando se emplea para el tratamiento de infecciones localizadas en lugares en los que el agente puede concentrarse en el curso del proceso fisiológico (en la orina, en las vías biliares, etc.), o en aplicación local.

> En realidad, en muchas ocasiones, la expresión *bacterias sensibles* y *bacterias resistentes* posee un valor limitado y, como precisa Welsch (146), con un criterio estrictamente científico sólo deberían utilizarse estas expresiones de una forma cuantitativa: «Cepas sensibles (o resistentes) a tal concentración de tal antibiótico», precisando además las condiciones experimentales en que se ha realizado la determinación.

Selección de variantes resistentes como consecuencia del empleo de antibióticos

En la práctica, la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos es consecuencia de un *doble* proceso; en primer lugar ocurre un *cambio genético*, que suele afectar a una proporción escasa de células bacterianas, a las que confiere la capacidad de resistencia, y que sucede al margen de cualquier intervención del antibiótico; sigue a ello la *selección* de estas variantes resistentes, determinada por el empleo de antibióticos que eliminan las bacterias sensibles de aquella especie. De acuerdo con esta secuencia, en la práctica sólo se desarrolla una *población bacteriana* resistente a un antibiótico en presencia del mismo. Welsch (146), al estudiar este efecto selectivo de los antibióticos, considera por separado la selección de *especies* resistentes, la selección de *cepas* resistentes y la selección de *individuos* resistentes.

El hecho que hemos señalado inicialmente, bien conocido de todo el mundo, de la existencia de *especies* bacterianas sensibles y de especies bacterianas resistentes a un antibiótico determinado, lo podemos expresar diciendo que existe una notable *heterogeneidad de especie* ante la acción de los antibióticos.

De la misma manera podemos referirnos a una *heterogeneidad de cepa* en los casos en que dentro de una misma especie unas cepas son sensibles y otras resistentes a un antibiótico. Menos conocida de los clínicos, pero no menos evidente ni menos importante, es la *heterogeneidad de la población bacteriana* dentro de una cepa.

a) *Selección a nivel de especie*

La mayoría de las veces que se administra un antibiótico con fines terapéuticos o profilácticos, la acción del mismo no se limita a la especie o especies que a nosotros nos interesa eliminar. Casi siempre actuamos también sobre otros microorganismos, patógenos o saprofitos habituales, lo que puede conducir a un desequilibrio de la flora normal con proliferación exagerada de las bacterias resistentes al antibiótico utilizado, bacterias que pueden pasar a ocupar nuevos territorios orgánicos y, en ocasiones, provocar trastornos de la más diversa índole. Una de las consecuencias más importantes de ello es la presentación de infecciones por gérmenes habitualmente inocuos. Como es sabido, los que se comportan de esta manera reciben el nombre de *gérmenes oportunistas;* pertenecen a ellos numerosas especies de enterobacteriáceas, *Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus epidermidis,* diversas especies de hongos del género *Candida,* etc. Este fenómeno encuentra su manifestación más esplendorosa en un nicho ecológico tan especial como el representado por un hospital moderno en donde se unen factores tan importantes a este respecto como son:

1) la presencia de enfermos afectos de procesos infecciosos de la más diversa etiología;
2) la utilización de antibióticos muy activos sobre numerosas bacterias patógenas pero poco o nada activos sobre muchos gérmenes oportunistas;
3) la acumulación de enfermos en los que por la clase de enfermedad o lesión que padecen (hemopatías graves, grandes quemaduras, portadores de prótesis y plastias de los más diversos tipos y localización, trastornos de los mecanismos inmunitarios, etc.) resulta muy fácil la infección y, al mismo tiempo, es mucho menos eficaz un tratamiento con antibióticos, y
4) el creciente empleo terapéutico de inmunodepresores (ciertas hemopatías, enfermos trasplantados, algunos tipos de reumatismo, nefropatías, etc.).

La eliminación de una determinada especie patógena por el empleo de un antibiótico puede ir seguida de consecuencias diferentes según la especie bacteriana de que se trate y así, por ejemplo, la penicilina G elimina rápidamente el estreptococo β-hemolítico de la faringe sin que este hecho en sí vaya seguido, al parecer, de ninguna consecuencia perjudicial para el enfermo, mientras que la desaparición de los estafilococos sensibles a la penicilina G de un determinado territorio orgánico, va seguida generalmente de la invasión del mismo por estafilococos formadores de penicilinasa (resistentes a la penicilina G).

b) *Selección a nivel de cepa*

Se observa de manera manifiesta en aquellas especies bacterianas en las que, desde el primer momento, algunas cepas son sensibles y otras resistentes a un anti-

biótico determinado. Al cabo de algún tiempo de la introducción en terapéutica de dicho antibiótico aumenta la proporción de cepas resistentes al mismo, en ocasiones de manera considerable, en especial entre las aisladas de productos patológicos, y más aún entre las obtenidas de enfermos hospitalarios. Citemos como ejemplo nuestra experiencia referida a *Staphylococcus aureus* y cloranfenicol; el 7 % de cepas resistentes en el año 1956, pasa al 35 % diez años más tarde (54).

En otras ocasiones podemos encontrar que en los primeros momentos del empleo de un antibiótico todas las cepas de una especie bacteriana son sensibles al mismo, mientras que al cabo de algunos años una proporción más o menos elevada de las mismas es resistente. Según nuestra experiencia, referida a la sensibilidad de *Staph. aureus* a la eritromicina, mientras que en los 2-3 primeros años del empleo de este antibiótico todas las cepas eran sensibles al mismo, 10 años más tarde el 29,1 % de las cepas eran resistentes.

Un examen más detallado del fenómeno nos conduce al estudio de la selección a nivel de célula bacteriana, fenómeno importante y cuya exposición es necesaria para comprender no sólo la selección a nivel de cepa, sino también a nivel de especie.

c) *Selección a nivel de célula bacteriana*

Es un hecho bien demostrado que en todo cultivo bacteriano, incluso en el caso de una *clona bacteriana,* existe un cierto grado de heterogeneidad de la población bacteriana.

La heterogeneidad puede alcanzar prácticamente a todas las características de las bacterias y dentro de ellas, naturalmente, a su sensibilidad o resistencia a los antibióticos. En este sentido existen diferencias considerables según la especie y según el antibiótico.

Limitados al análisis de este último aspecto, nos interesa destacar que en la resistencia a un antibiótico hemos de considerar tanto el número de células resistentes en un cultivo como el *grado* de resistencia de las mismas.

II. MECANISMOS DE ADQUISICION DE RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

GENERALIDADES SOBRE GENETICA BACTERIANA

Fijado el concepto de la *heterogeneidad de la población bacteriana,* podemos entrar en el estudio de los mecanismos bacterianos que conducen a la adquisición

de resistencia a los antibióticos. En la práctica se trata siempre de *cambios* genotípicos. Si las variaciones son cromosómicas se trata casi siempre de variaciones de baja frecuencia, por lo que solamente serán significativas si actúa además un factor de selección. Otras veces se trata de mecanismos de recombinación genética a expensas de *factores extracromosómicos;* en estos casos la variación, también genotípica, puede ser de mayor frecuencia pero, en último término, siempre juega el papel decisivo la selección representada por el empleo de antibióticos activos sobre las células bacterianas sensibles.

> Señalemos el hecho de que, hasta ahora, ni siquiera hemos hecho referencia al papel de la *adaptación* como mecanismo de adquisición de resistencia bacteriana a los antibióticos. En la práctica, su significación es nula o casi nula. Hay, sin embargo, observaciones experimentales que demuestran la posibilidad de conseguir cambios en la sensibilidad a los antibióticos por adaptación. Cuando a raíz de la introducción de los antibióticos en terapéutica se inició el estudio de los mecanismos de adquisición de resistencia a los mismos, se discutió si era más importante el papel desempeñado por la *adaptación fenotípica,* sin modificaciones del genotipo, o por las *variaciones genotípicas.* En la actualidad, repitamos, está demostrado de manera categórica el papel poco importante o nulo de la adaptación.

Si partimos de la base de que la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos es consecuencia de un cambio genotípico, el estudio de los mecanismos correspondientes caerá dentro del campo de la *genética bacteriana.* Por ello, antes de iniciar el estudio de tales mecanismos puede ser conveniente recordar algunos conceptos básicos de genética bacteriana.

Aunque durante mucho tiempo se creyó que la herencia estaba regulada por proteínas, es un hecho firmemente establecido que el sustrato de la misma es el ácido deoxirribonucleico (ADN).

Podemos situar el comienzo de la historia de este descubrimiento en las experiencias realizadas en 1928 por el bacteriólogo inglés Griffith (63). Es sabido que los neumococos poseen una cápsula muy aparente cuya composición química se conoce con exactitud; pequeñas diferencias en su composición permiten dividir los neumococos en *tipos* de los que en la actualidad se conocen unos 80, antigénicamente diferentes. Es también sabido que los neumococos capsulados son muy virulentos para el ratón mientras que los no capsulados son avirulentos. En el curso de unos ensayos sobre la transformación de los neumococos no capsulados en neumococos capsulados, Griffith inyectaba ratones con una mezcla de neumococos vivos del tipo 2 desprovistos de cápsula, y por lo tanto no virulentos, y neumococos capsulados del tipo 1, muertos previamente por calentamiento.

En estas condiciones experimentales parece lógico que los ratones no hubieran de morir ya que los neumococos vivos eran avirulentos y los neumococos virulentos se inoculaban muertos. La experiencia, sin embargo, condujo a resultados inesperados: algunos de los ratones morían y en su sangre era fácil demostrar la presencia de gran cantidad de neumococos vivos y capsulados, con una cápsula igual a la de los neumococos del tipo 1, es decir, igual que la de los neumococos inoculados muertos.

Podríamos añadir un tercer hecho: los neumococos aislados de la sangre del ratón conservaban indefinidamente, a lo largo de una y otra resiembra, el *tipo* de cápsula que habían adquirido en el ratón.

Con esta experiencia se demostró: primero, que en el cuerpo del ratón inoculado en tales condiciones, de los neumococos capsulados y muertos pasaba a los no capsulados y vivos una sustancia capaz de conferir a éstos la propiedad de sintetizar una cápsula de un tipo diferente a la que ellos habían poseído; segundo, que una vez adquirida, esta propiedad se transmitía hereditariamente. Podemos resumir estos hechos de manera esquemática diciendo que ha ocurrido una *transformación* y que esta transformación se transmite hereditariamente, lo que equivale a decir que se han modificado *específicamente* algunas propiedades genéticas del neumococo.

Como se comprende, si se conseguía obtener e identificar dicha sustancia se habría conseguido descubrir la sustancia responsable de la herencia.

Esta labor la realizaron Avery y sus colaboradores (11) mediante una serie de experiencias proseguidas a lo largo de once años, que culminaron, en 1943, con el aislamiento, purificación e identificación del agente transformador; resultó ser un ADN. Con él, puro, consiguieron repetir las experiencias de Griffith tanto *in vivo* como *in vitro*.

La importancia de este descubrimiento es extraordinaria, pues vino a precisar que la transmisión de la herencia o, si se prefiere la expresión, la información genética, radica en el ADN.

La etapa siguiente condujo al descubrimiento de la estructura de la molécula del ADN. En pasos sucesivos se descubrió que se trata de una molécula muy grande, formada por una larguísima cadena de nucleótidos y que solamente intervienen en su composición cuatro bases diferentes: dos *púricas*, la guanina y la adenina, y dos *pirimidínicas*, la citosina y la timina. Pero el paso decisivo, el descubrimiento de la estructura de la molécula, se debe al biólogo americano Watson y al físico inglés Crick quienes, en 1953, en una brevísima comunicación aparecida en la revista *Nature* (144), expusieron su teoría, hoy confirmada y aceptada unánimemente, de que la molécula del ADN está constituida por una doble cadena helicoidal, en la que las bases se enlazan formando siempre los mismos *pares*, la guanina unida a la citosina por tres puentes de hidrógeno, y la adenina a la timina por dos. La historia de estos descubrimientos, en especial la de la fase final, ha sido recogida por Watson, con una visión muy personal, en el apasionante y polémico libro «*La doble hélice*» (143).

El descubrimiento de Watson y de Crick ha sido considerado como el hallazgo más importante del siglo XX en el campo de la Biología y se ha equiparado por su trascendencia al descubrimiento, por Copérnico, de las leyes que rigen nuestro sistema planetario, con la publicación en 1543 del libro «*De revolutionibus orbium coelestium*», y al desarrollo, por Darwin, de la teoría sobre el origen de las especies que culmina en 1859 con la aparición del libro «*On the origen of species by means of natural selection*».

A partir de la publicación de Watson y Crick, en un plazo de muy pocos años se ha descubierto el mecanismo de la replicación del ADN, se ha descifrado el código genético, su funcionamiento, las alteraciones que puede sufrir, la esencia del fenómeno de las mutaciones, etc., etc.

Por lo que a nuestro problema se refiere, nos interesa insistir en la existencia de marcadas diferencias entre el ADN bacteriano, característico de las células con estructura procariota, y el de las células eucariotas.

Las diferencias esenciales son:

1) mientras que en las células eucariotas el ADN forma parte del núcleo, orgánulo bien definido y provisto de una membrana envolvente que en estado de reposo lo aísla del citoplasma, en las bacterias se encuentra libre en el citoplasma, en el que aparece sin una forma definida por carecer de una membrana que lo individualice. No podemos dejar de señalar en este momento la existencia en las células procariotas de partículas de ADN extracromosómico;

2) en las células eucariotas el ADN se encuentra unido a unas proteínas especiales de bajo peso molecular, las histonas, mientras que en las bacterias no está unido a histonas, sino a las pequeñas poliaminas, espermina y espermidina;

3) en el proceso de la reproducción celular el ADN de las células eucariotas sufre una serie de cambios muy complejos, fragmentándose en *cromosomas*, en número determinado para cada especie que oscila entre dos y más de cien; en las bacterias la molécula de ADN, única, no se fragmenta en el curso de su replicación.

Si hacemos un resumen de las características del ADN bacteriano podemos decir que constituye una molécula única, libre en el citoplasma, en forma de una larguísima cadena, sin ramificaciones y cerrada; en ella, en un orden característico para cada especie, están dispuestos los genes que regulan el proceso hereditario.

Esta larga cadena está constituida por dos hebras y cada una de ellas consta de un armazón en el que se alternan regularmente moléculas de un azúcar, concretamente, una deoxirribosa, y un radical fosfato. A cada molécula de azúcar aparece unida una base; como ya hemos dicho, intervienen solamente cuatro bases, dos *pirimidínicas*, la citosina y la timina, y dos *púricas*, la adenina y la guanina.

A lo largo de las cadenas la distribución de las cuatro bases es irregular, es decir, no alternan de manera regular las bases púricas con las pirimidínicas; puede

aparecer dos, o más veces seguidas, la misma base, etc. Por el contrario, hay un principio de valor absoluto, que es la complementariedad de las bases, en el sentido de que han de formarse siempre los mismos *pares de bases,* por ello, la adenina de una de las cadenas se unirá forzosamente a la timina de la otra y, lógicamente, la timina se unirá a la adenina en la cadena opuesta y, de la misma manera, la guanina aparece unida a la citosina y la citosina a la guanina.

Esta disposición viene forzada por razones de esteroisomería, bien conocidas, cuya exposición no creemos justificada en este momento.

Insistamos en el hecho de que la unión entre las bases complementarias de las dos hebras de la cadena se realiza mediante puentes de hidrógeno, en número de dos en el par adenina-timina y de tres en el de guanina-citosina. Al estudiar el mecanismo de la mutación veremos la importancia de esta estructura.

Hasta ahora nos hemos referido al ADN constitutivo de la estructura que podemos denominar *cromosoma bacteriano* que, al ser único, se hace sinónimo de núcleo bacteriano. La adquisición de resistencia bacteriana a los antibióticos por cambios en esta estructura se conoce con el nombre de *resistencia cromosómica.* Pero no olvidemos que en las bacterias puede darse también una *herencia extracromosómica* que puede conducir a una *resistencia extracromosómica.* Muchas bacterias poseen además del ADN cromosómico una partícula, o partículas, de ADN extracromosómico que les confieren algunas propiedades independientes de las reguladas por el código genético propio de la especie y que se pierden si la bacteria pierde este ADN. Tales fragmentos de ADN son más pequeños que el cromosoma bacteriano y se reproducen autónomamente, en ocasiones con mayor frecuencia que aquél; se les denomina *plásmidos* o *episomas.*

Existen pequeñas diferencias entre la composición del ADN cromosómico y la de los plásmidos; creemos que el estudio detallado de las mismas escapa a la intención de nuestro Discurso. Sólo nos interesa destacar la mayor sensibilidad del ADN plasmídico al anaranjado de acridina y a otras sustancias con una acción similar (acriflavina, bromuro de etidio, rifampicina, lauril--sulfato de sodio, etc.). Si se adiciona al medio de cultivo una cualquiera de dichas sustancias a la dosis adecuada, puede conseguirse que se inhiba la replicación de los plásmidos con persistencia de la replicación del ADN cromosómico y de la división celular. Cuando se produce esta pérdida de la función de los plásmidos se habla de *curación.*

Con el nombre de *episoma,* introducido por Jacob y Wollman en 1958 (71), se designan las partículas extracromosómicas de ADN a las que acabamos de referirnos, caracterizadas por poder encontrarse en dos estados diferentes: o libres en el citoplasma con capacidad de reproducción autónoma, o integradas en el cromosoma bacteriano, en cuyo caso se reproducen sincrónicamente con el mismo. Las partículas de ADN extracromosómico que sólo se conocen en su fase independiente en el citoplasma bacteriano y de las que no se ha podido demostrar una fase de integración en el cromosoma reciben el nombre de *plásmidos.*

El hecho de que la distinción entre episoma y plásmido pueda desaparecer si se descubre la fase de su integración en el cromosoma, junto con el hecho de que un determinado episoma sea capaz de integrarse en el cromosoma de algunas especies bacterianas pero no en el de otras, hace que muchos autores prefieran utilizar para todas estas estructuras el nombre de plásmidos. En la actualidad se siguen utilizando ambas denominaciones.

Muy recientemente, un grupo de grandes especialistas en Plasmidología integrado por Novick, Clowes, Cohen, Curtiss, Datta y Falkow (103), ha publicado una serie de definiciones de los conceptos básicos de esta rama de la Genética de la que copiamos a continuación las correspondientes a los términos *plásmido* y *episoma:*

Plásmido (sinónimo: elemento genético extracromosómico). Un plásmido es un replicón transmisible indefinidamente por herencia (es decir que persiste fácilmente sin selección específica), en forma extracromosómica. En las procariotas, los plásmidos de presentación espontánea no son imprescindibles en la mayoría de los casos.

Episoma: Un episoma es un elemento genético que puede replicarse indistintamente, o integrado en el cromosoma del huésped o independientemente del mismo.

Por su naturaleza y estructura los plásmidos son idénticos al cromosoma bacteriano, es decir, son fragmentos de ADN bicatenario dispuesto en forma circular, mucho más pequeños que la gran molécula ($3{,}5 \times 10^9$ daltons) del ADN cromosómico. Al hacer un estudio comparativo entre los plásmidos R de los estafilococos y los de los bacilos gramnegativos, Falkow (50) establece en cada uno de estos grupos dos tipos de plásmidos R, algunas de cuyas características aparecen en la tabla I.

TABLA I

CARACTERISTICAS DE LOS PLASMIDOS DE RESISTENCIA

Plásmidos R estafilocócicos	*Plásmidos R de los bacilos gramnegativos*
No autotransferibles.	Autotransferibles o no autotransferibles.
Dos tipos de moléculas:	Dos tipos de moléculas:
20×10^6; uno a tres plásmidos por célula bacteriana.	35×10^6 a 70×10^6; uno a tres plásmidos por célula bacteriana.
1×10^6 a 3×10^6; numerosos plásmidos por célula bacteriana.	5×10^6 a 12×10^6; numerosos plásmidos por célula bacteriana.

El número de plásmidos conocidos y estudiados aumenta continuamente. En la reciente revisión de Novick y colaboradores a la que acabamos de referirnos, se tabulan 110 genes portados por plásmidos, aunque no referidos todos ellos a

plásmidos de resistencia. Señalemos como aportaciones originales de autores españoles los trabajos de Parés, Guinea, Hernández, Valoix y Jofre que, iniciados en 1962, aparecen en 1974 en el *Journal of Bacteriology* (109), y los de Gómez Lus y Rubio Calvo (62), completados por Smith, Gómez Lus, Rubio Calvo, Datta, Jacob y Hedges (123).

Habría que añadir el grupo de plásmidos descritos por Gómez Lus y colaboradores (61), englobados provisionalmente con la denominación pUZ, determinantes de resistencias a diversos antibióticos (gentamicina, ampicilina, carbenicilina, etc.) (61).

La información genética transmitida por plásmidos puede conferir a la bacteria propiedades muy dispares. A nosotros nos interesan de manera especial los plásmidos R, plásmidos que contienen genes determinantes de la resistencia a antibióticos u otros compuestos químicos. Señalemos, sin embargo, que pueden estar determinadas por genes extracromosómicos otras muchas propiedades bacterianas: la posesión del antígeno K88, junto con la producción de una enterotoxina y de la hemolisina alfa por ciertas cepas de *E. coli,* la producción de enterotoxina B por algunas cepas de *Staph. aureus,* la capacidad de utilización de los azúcares por *Paracolobactrum intermedium,* etc.

A partir de este momento nos ocuparemos exclusivamente en el estudio de los *plásmidos R* (plásmidos de la resistencia). De acuerdo con Novick y colaboradores (103), incluimos bajo la denominación de *plásmidos R* a todos los que condicionan la adquisición de resistencia a antibióticos, tanto los que se transmiten por conjugación, método el más corriente en los bacilos gramnegativos, como los transferidos por transducción, mecanismo habitual en *Staph. aureus.*

III. ADAPTACION BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

A lo largo de la exposición que antecede hemos destacado reiteradamente la importancia extraordinaria de las variaciones genotípicas como mecanismo para la adquisición de resistencia de las bacterias a los antibióticos y sólo en una ocasión nos hemos referido a la *adaptación,* destacando su escasa importancia.

Pero, sin embargo, no podemos olvidar que en la vida de las bacterias la *adaptación* es un fenómeno de gran amplitud, que puede conducir a cambios fenotípicos tan llamativos como el de que la bacteria sea móvil o inmóvil, por poseer o no flagelos. Este es el caso de *Yersinia pseudotuberculosis* que cultivada a 37° C carece de flagelos, y es por lo tanto inmóvil, mientras que a 18-26° C es flagelada y móvil. Puede modificarse fenotípicamente incluso el mecanismo por el que la bacteria ataca la glucosa y así, por ejemplo, *Enterobacter liquefaciens* incubado a 22° C utiliza la glucosa por la vía ácido mixta mientras que a 37° C lo hace

por la vía acetoínica. Otro ejemplo muy demostrativo nos lo proporciona *Serratia marcescens,* bacteria de la que algunas cepas en un medio de cultivo normal producen un pigmento rojo que confiere a sus colonias un color que puede llegar a hacerlas semejantes a gotas de sangre, mientras que en el mismo medio de cultivo enriquecido en cloruro sódico las colonias son incoloras. Basta resembrarla de nuevo en un medio con una concentración normal de cloruro sódico para que vuelva a producir colonias rojas.

Estas variaciones se producen por interacción de la bacteria con el medio, por mecanismos que no afectan al genoma de la especie, por lo que no son hereditarias. Son de *alta frecuencia* ya que al ser consecuencia de la interacción bacteriana con el medio, si éste cambia, cambia para todas las bacterias de aquella población, y son reversibles, es decir, si las condiciones del medio revierten a su estado primitivo, la bacteria también lo hace, puesto que su genotipo no se había modificado.

Un tipo de cambio fenotípico que nos interesa comentar es la aparición de una o varias enzimas que no existían en la población original, por el mecanismo de la *síntesis inducida de enzimas.* En este caso el gen que regula la producción de la enzima existía ya (no es, pues, un cambio genotípico), pero estaba en forma reprimida; al introducir en el medio el inductor adecuado el gen se desreprime y la bacteria produce la correspondiente enzima. Es clásico poner como ejemplo la producción de penicilinasa por el *Bacillus cereus.* En los cultivos ordinarios este microorganismo no produce penicilinasa, por lo que cabía pensar que es sensible a la acción de la penicilina; sin embargo, si se añade penicilina al medio de cultivo los gérmenes proliferan, lo que es debido a que la presencia de penicilina induce la producción de penicilinasa por la población bacteriana. Si estos gérmenes se pasan a un medio de cultivo sin penicilina dejan de producir penicilinasa.

Lorian en su libro «*Antibiotics and chemotherapeutic agents in clinical and laboratory practice*» (83) menciona algunas observaciones sobre la adaptación bacteriana, no todas referidas a la adaptación a los antibióticos y no todas convincentes. Entre ellas destaquemos las siguientes: Baskett (21) hace la observación de que si se añade lentamente proflavina a un cultivo de *Bacterium lactis aerogenes,* el germen se hace resistente a concentraciones de proflavina que hubieran sido inhibitorias unas horas antes; según Baskett, se trata realmente de una adaptación y no de una mutación. Schneierson, Amsterdam y Perlman (118) comprueban que ciertas cepas de *Pseudomonas* sembradas en presencia de dosis subinhibitorias de cloranfenicol pierden su capacidad de formar pigmento, cambio que se mantiene a través de 20 resiembras sucesivas en medios desprovistos de cloranfenicol; parece demostrado que no se trata de una selección de mutantes no pigmentadas puesto que el fenómeno se observa

ya en el primer cultivo en presencia de cloranfenicol y en este cultivo se alcanza una densidad bacteriana idéntica a la de las bacterias cromógenas de un cultivo de control.

Como ejemplo concreto de adaptación a los antibióticos recoge las siguientes observaciones: Szybalski (128) observa que las bacterias de una suspensión de *E. coli* en una solución tamponada adicionada de estreptomicina se transforman en estreptomicinarresistentes tras un corto período de incubación, en ausencia de multiplicación. Pollock (112) comprueba que algunas bacterias aumentan considerablemente su producción de penicilinasa tras una exposición de escasos minutos a la penicilina. Estas dos observaciones las comenta Lorian (83) diciendo que «esta adaptación sería una reacción fisiológica de la bacteria al antibiótico».

La importancia de la adaptación ha sido bien estudiada en el caso de la penicilina y estafilococo. Ya en 1941, Abraham y colaboradores (1) demostraron que era fácil transformar en resistente una cepa de estafilococo, por resiembras sucesivas en un medio adicionado de concentraciones inhibitorias submínimas y crecientes de penicilina. Pudieron observar que en los estafilococos hechos resistentes por este método no se podía demostrar la producción de penicilinasa (en aquella época ya se sabía que los estafilococos naturalmente resistentes a la penicilina G producen penicilinasa). Cultivados estos estafilococos en ausencia de penicilina revierten a cepas sensibles.

En estudios posteriores (1957) realizados por Barber (16) se pudo demostrar que el aumento de resistencia a la penicilina ocurre gradualmente; también es gradual la pérdida de la resistencia así adquirida cuando se somete el germen a resiembras sucesivas en un medio desprovisto de penicilina.

Las cepas hechas resistentes por este método varían en su morfología, proliferan más lentamente y sus colonias son mucho menos aparentes; igualmente, producen una cantidad menor de plasmacoagulasa y de toxina alfa y pierden parte de su virulencia.

El hecho de que la resistencia adquirida por adaptación no sea hereditaria resta todo interés práctico a este mecanismo. El estudio experimental del mismo es muy interesante, pero las condiciones *in vivo* pocas veces coinciden con las condiciones óptimas experimentales para que se produzca.

IV. RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS POR CAMBIOS GENOTIPICOS

Hasta hace algunos años se aceptaba que en las bacterias, organismos en los que no se conocía la existencia de ningún proceso de recombinación genética,

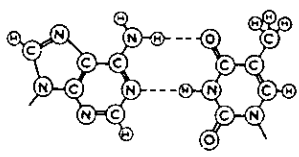
cualquier modificación en el genoma debía estar determinada por cambios específicos del ADN, es decir, por una mutación.

El descubrimiento de diversos tipos de recombinación genética nos obliga a estudiar los cambios genotípicos que condicionan la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos en dos apartados: los dependientes de la mutación y los ligados a procesos de recombinación genética.

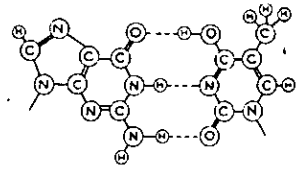
MUTACION BACTERIANA

Podemos definir la mutación como lo hacen Jawetz, Melnick y Adelberg en su «*Manual de Microbiología*» (72): «Cualquier cambio en la secuencia de los nucleótidos de un gen que cambia la estructura y por tanto la función de una proteína específica, constituye una mutación. La secuencia de los nucleótidos puede cambiar de dos maneras: α) por sustitución de un par de bases por otro, consecuencia de un error durante la replicación; β) por rupturas en el esqueleto azúcar-fosfato del ADN, con posterior deleción (o inversión) del segmento comprendido entre los puntos de ruptura, o inserción de un nuevo segmento.»

Se acepta que el mecanismo más frecuente de mutación consiste en una modificación de *tipo tautomérico* en la molécula de una cualquiera de las cuatro bases que constituyen la cadena de ADN. Recordemos que en ésta los pares de bases están constituidos siempre por la unión mediante puentes de hidrógeno, de la adenina con la timina (dos puentes) y de la guanina con la citosina (tres puentes). Puede ocurrir, por ejemplo, que la timina, que normalmente se encuentre en forma *cetónica,* en cuyo estado se une a la adenina, pase a la forma *enólica* (tautomería), en cuyo estado puede unirse a la guanina; en la replicación siguiente la guanina inducirá la formación de citosina. Como consecuencia de estas modificaciones, en una zona determinada de la molécula de ADN un par de bases adenina-timina habrá sido sustituido por un par guanina-citosina (mutación *puntual* o *puntiforme*).



Adenina Timina



Guanina Timina

La aparición por mutación de elementos bacterianos resistentes a un antibiótico es un fenómeno frecuente y fácil de demostrar. Basta; por ejemplo, con sembrar una cepa de *E. coli* sensible a la estreptomicina en placas que contengan

un medio de cultivo adicionado de estreptomicina e incubarlas en condiciones adecuadas. Interesa precisar que la proporción de colonias correspondientes a células resistentes es mínima en relación al total de las bacterias sembradas.

Pero la experiencia que acabamos de describir no es demostrativa ya que las colonias que proliferan podrían ser consecuencia de la *adaptación* de algunas células bacterianas a la estreptomicina contenida en el medio de cultivo de las placas. Mediante la *prueba de la fluctuación* ideada por Luria y Delbrück (85), se puede demostrar de manera categórica que no se trata de una adaptación sino de una mutación espontánea ya que las células resistentes a la estreptomicina surgen igualmente en medios de cultivo desprovistos de dicho antibiótico.

A pesar de que la prueba de la fluctuación fue introducida en 1943, su conocimiento no se ha difundido entre los clínicos todo lo que se merece, por lo que,

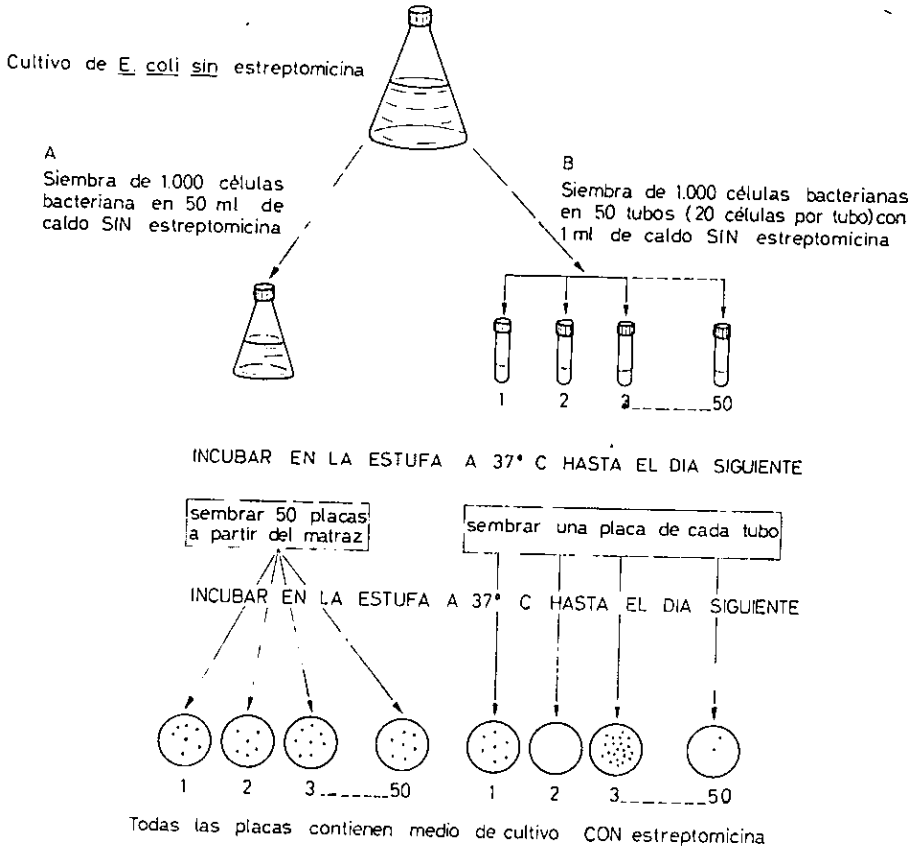


Fig. 1. - Esquema de la prueba de la fluctuación

dada la importancia de la misma para comprender el proceso de la *aparición* de mutantes resistentes, creemos interesante exponerla y comentarla.

Mediante la prueba de la fluctuación, Luria y Delbrück pretendieron averiguar si la presencia en una población bacteriana sensible a un determinado agente de algunas células resistentes al mismo era debida a una adaptación al medio o a una mutación espontánea. La utilizaron inicialmente para el estudio del origen de la resistencia bacteriana a los bacteriófagos empleando una cepa de *E. coli* sensible a un determinado bacteriófago. Pudieron demostrar que las células de *E. coli* resistentes al bacteriófago eran consecuencia de una mutación ocurrida con anterioridad a la interacción bacteria/bacteriófago.

Aplicada por Demerec (45) con la misma idea al sistema *Staphylococcus aureus*/penicilina, se ha utilizado con muy diversos sistemas. Es muy demostrativa en el caso de *E. coli* y estreptomicina ya que la adquisición de resistencia a este antibiótico se caracteriza por la aparición de variantes muy resistentes en un solo escalón, lo que facilita este tipo de pruebas.

En esquema, la prueba de la fluctuación consiste en lo siguiente (fig. 1): se siembra una cepa de *E. coli* sensible a la estreptomicina en un medio líquido desprovisto de estreptomicina y se incuba hasta el día siguiente a 37° C. A continuación, este cultivo se diluye de tal manera que contenga 1.000 células bacterianas por ml. Con esta suspensión bacteriana así diluida hacemos nuevos cultivos, en las siguientes condiciones:

a) Siembra de 1.000 células bacterianas (1 ml de la dilución) en un matraz con 50 ml de caldo de cultivo *sin* estreptomicina.

b) Siembra de 1.000 células bacterianas (1 ml de la dilución) repartidas en 50 tubos que contienen cada uno de ellos 1 mililitro del mismo medio de cultivo, también *sin* estreptomicina, a razón de 20 células bacterianas en cada tubo (1/50 de ml de la dilución del cultivo original).

Se incuba el matraz y los 50 tubos en la estufa a 37° C durante unas horas y a continuación procedemos de la siguiente manera:

c) A partir del matraz sembramos 50 placas que contienen un medio de cultivo sólido *adicionado de estreptomicina;* la presencia de la estreptomicina impedirá la proliferación de las células sensibles a la misma y permitirá la de las resistentes, es decir, actuará como un *revelador* del carácter estreptomicinarresistente.

d) A partir de *cada uno de los tubos* sembramos una placa de cultivo en las mismas condiciones que en c).

Las placas sembradas se incuban a 37° C y al día siguiente se practica el recuento de las colonias que han proliferado en cada una de ellas.

En las 50 placas sembradas a partir del matraz aparecen en todas algunas colonias de *E. coli,* con pequeñas diferencias en el número de colonias de una a otra placa. Si las cifras de estas 50 placas las disponemos ordenadamente se obtiene

una curva de distribución de Gauss, lo que significa que las diferencias en el número de colonias son debidas al azar.

Para interpretar este resultado podemos considerar las dos siguientes posibilidades:

1. Las colonias de *E. coli* resistentes a la estreptomicina aparecidas en las placas son consecuencia de una adaptación al antibiótico contenido en las mismas y ocurrida, por lo tanto, en presencia de la estreptomicina.
2. Las células bacterianas resistentes han aparecido espontáneamente en el cultivo líquido en el matraz, sin contacto previo con la estreptomicina; el cultivo en las placas con estreptomicina nos ha servido *solamente* para revelar la presencia de estas bacterias resistentes.

La solución nos la aporta el resultado obtenido en el otro grupo de placas, las 50 sembradas *cada una* a partir de un tubo diferente; en ellas la distribución del número de colonias resistentes a la estreptomicina es completamente diferente; en algunas placas crecen muy pocas colonias, en otras, bastantes y en otras el número de colonias es muy elevado. Nos encontramos, pues, en presencia de una *gran fluctuación* de la cifra de colonias resistentes a la estreptomicina desarrolladas en estas placas.

Estos resultados confirman que se trata de una mutación. Los *E. coli* estreptomicinarresistentes han aparecido en los cultivos en medio líquido por una mutación que ha tenido lugar en unas bacterias en una generación temprana, por lo que del tubo en que así ha ocurrido se desarrollarán numerosas colonias estreptomicinarresistentes; en otros tubos habrá ocurrido más tarde y en algunos tubos poco antes de terminar la observación, por lo que en éstos el número de células resistentes, o, lo que es lo mismo, de colonias en la placa con estreptomicina, será mucho menor; incluso puede ocurrir que no se desarrolle ninguna colonia. En otras palabras, se demuestra una gran *fluctuación* en el contenido de bacterias resistentes en los cultivos hechos a partir de los tubos, lo que indica que se ha producido una mutación en momentos diferentes, *independientemente* del contacto con la estreptomicina.

El cambio que ha ocurrido se caracteriza por las siguientes características: no tiene sentido adaptativo, aparece al azar y es de baja frecuencia, características todas propias de la *mutación*.

A pesar de que la mutación afecta a un número muy limitado de células bacterianas, su papel en la aparición de cepas resistentes a los antibióticos puede ser importante a condición de que vaya seguida de una *selección* de dichas mutantes resistentes por el empleo de antibióticos que eliminen las células no mutadas sensibles. Destaquemos una vez más el hecho de que este mecanismo de selección, que presupone la administración de antibióticos, es el complemento indispensable para que *se manifieste en la práctica* un cambio en la sensibilidad bacteriana a los antibióticos ocurrido por cualquier variación de naturaleza genética.

PAPEL DE LA MUTACION EN LA ADQUISICION DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

En la primera mitad de la década de los 40 la discusión sobre los mecanismos de adquisición de resistencia bacteriana a los antibióticos se centraba en el papel desempeñado por los *antibióticos como inductores de la misma.* Demerec (45) resume dicha discusión como un intento para aclarar si se trata: a) de un proceso *inducido* por la acción del antibiótico utilizado en el tratamiento, ya sea por mecanismos que afectan al genoma o por mecanismos que no le afectan y, b) de *mutaciones* independientes de la acción del antibiótico, con selección posterior de las mutantes resistente por eliminación de las células sensibles por acción del antibiótico.

Como ya hemos indicado, la primera demostración de que la adquisición de la resistencia por mutación ocurre en ausencia del antibiótico correspondiente se debe a Demerec (1945) quien aplicó al estudio de este problema la *prueba de la fluctuación* de Luria y Delbrück que acabamos de describir.

Las mutaciones espontáneas, es decir, en ausencia de un factor mutágeno, afectan sólo a una proporción muy baja de la población bacteriana, que se estima entre 1×10^{-5} y 1×10^{-10} células por cada ciclo de reproducción bacteriana. Aunque realmente este número es muy bajo, si tenemos presente el brevé plazo de generación en la mayoría de las poblaciones bacterianas (por ejemplo, en los cultivos *in vitro,* 20 minutos para *E. coli*), y el elevadísimo número de células en juego, se comprende que la presencia de mutantes resistentes sea muy frecuente.

> A pesar de todo, en la actualidad se acepta que en la práctica el papel de la mutación como proceso que conduce a la aparición y selección de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos es menos importante que el desempeñado por los procesos de recombinación genética, en especial la transducción y la conjugación. Chabbert (35) afirma que «la mayoría de resistencias observadas en cepas aisladas de productos clínicos son resistencias extracromosómicas» y Franklin y Snow (56) resumen su postura diciendo que «las mutantes espontáneas representan sólo una parte mínima en el problema global de la resistencia a los antibióticos».

Se conocen diversos tipos de mutación. Desde el punto de vista clínico es interesante la diferenciación entre *mutación en un solo escalón* (*one-step-mutation*) y *mutación en escalones múltiples* (*multiple-step-mutation*).

a) *Mutación en un solo escalón*

En estos casos *una* mutación ocasiona un aumento considerable en la resistencia de una bacteria a un antibiótico; puede hacerse hasta 1.000 veces más resistente. Se han descrito mutantes de este tipo con la estreptomicina, oleandomicina, eritromicina, novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, rifampicina, etc.

Existen observaciones de sepsis estafilocócicas producidas por cepas de estafilococo sensibles a la novobiocina y tratadas con dicho antibiótico, en las que nada más iniciado el tratamiento el enfermo mejora clínica y bacteriológicamente pero al cabo de 48 horas vuelve a empeorar; el estafilococo aislado por hemocultivo en este momento es resistente a la novobiocina.

Se han hecho observaciones similares en enfermos con infecciones urinarias producidas por gérmenes sensibles a la estreptomicina y tratados con este antibiótico; en el plazo de una noche se llega a la selección de mutantes resistentes. Por la acción de la estreptomicina se eliminan las bacterias sensibles y en el plazo de pocas horas, en ocasiones en menos de 24, se pasa de aislar una cepa sensible a aislar una cepa resistente.

b) *Mutación por escalones múltiples*

Más frecuente que la adquisición de resistencia en un solo escalón es la adquisición de resistencia en escalones múltiples. En este caso la bacteria mutada

TABLA II

TIPOS DE RESISTENCIA SEGUN DATOS BACTERIOLOGICOS Y CLINICOS
(Walter y Heilmeyer, 1969)

A) Mutación en escalones múltiples (*tipo penicilina*)			B) Mutación en un solo escalón (*tipo estreptomicina*)
1. Aparición de la resistencia lentamente (*)	2. Aparición de la resistencia lentamente	3. Aparición de la resistencia a una velocidad media	4. Aparición de la resistencia rápidamente
Anfotericina B	Penicilinas	Tetraciclinas	Estreptomicina
Ristocetina	Cefalosporinas (en grampositivos)	Cefalosporinas (en gramnegativos)	Eritromicina
Vancomicina	Sulfamidas	Kanamicina	Oleandomicina
Griseofulvina	Cloranfenicol	Neomicina B	Novobiocina
Nistatina	Bacitracina	Gentamicina	Acido fusídico
Tirotricina (event. 2)	Polimixina B	Paromomicina Aminosidina	Lincomicina
Tricomicina	Colistina (event. 3)	Espiramicina	Rifamicinas
	Cicloserina	PAS	Espectinomicina
	Tiosemicarbazona	Viomicina	Acido nalidíxico
	Nitrofuranos		Isoniacidas
			PAS (la mayoría A3)
			Piracinamida
			Etionamida

(*) Hasta ahora sin interés práctico.

se hace, por ejemplo, 10 veces más resistente al antibiótico. Tras una serie de mutaciones en este sentido llegan a encontrarse bacterias hasta mil veces más resistentes que la original.

Con frecuencia, cada uno de los pasos es tan poco aparente que da la impresión de tratarse de un proceso continuo. Chabbert (35) destaca que este tipo de resistencia entraña corrientemente la aparición de resistencias cruzadas entre los antibióticos de una familia. En la tabla II de la página 37, que tomamos de Walter, Heilmeyer, Plempel y Otten (136), figuran las familias de antibióticos en que se observa este tipo de resistencia, y en la tabla III, tomada de Chabbert (35), los antibióticos con los que aparece resistencia cruzada.

TABLA III

RESISTENCIA CROMOSOMICA CRUZADA
(Chabbert, 1968), actualizada

Familias de antibióticos	*Resistencia cruzada*
β-lactaminas	penicilinas cefalosporinas
Aminoglucósidos	estreptomicina neomicinas-framicetina kanamicinas paromomicina-aminosidina gentamicinas lividomicina butirosina vistamicina sisomicina tobramicina espectinomicina amicacina
Cloranfenicol	tianfenicol
Tetraciclinas	clortetraciclina, oxitetraciclina, demetilclortetraciclina, doxiciclina, minociclina
Macrólidos y similares	eritromicina oleandomicina espiramicina kitasamicina lincomicina sinergistinas: virginiamicina y pristinamicina
Polimixinas	polimixina B y colistina
Sulfamidas	

Pertenece a este tipo de resistencia la adquirida por *Neisseria gonorrhoeae* para la penicilina G y la de los estreptococos del grupo A para las tetraciclinas.

c) *Resistencia de* N. gonorrhoeae *a la penicilina G*

N. gonorrhoeae es la bacteria patógena más sensible que se conoce a la penicilina: la CIM de ésta es menor a 0,006 mcg/ml. Durante mucho tiempo,, y a diferencia de lo que sucedió con las sulfamidas, para las que en el plazo de pocos años desarrolló un grado de resistencia muy notable, la resistencia del gonococo a la penicilina G no pareció aumentar. Sin embargo, en 1958 se observó un aumento del número de fracasos clínicos después de tratamientos aparentemente correctos y poco después, en 1961, en un estudio realizado en Inglaterra, se encontró que la CIM de penicilina del 13,2 % de un total de 1.984 cepas de *N. gonorrhoeae* era de 0,075 a 0,60 mcg/ml (55).

Desde aquella fecha la situación ha empeorado y en todos los países se han aislado cepas de gonococo *relativamente resistentes,* lo que ha obligado a aumentar la dosis de penicilina, la duración del tratamiento (o ambos) para el tratamiento eficaz de la gonococia.

Como datos demostrativos podemos citar los de Lynn, Nicol, Ridley, Rimmer, Symonds y Warren (86) quienes encuentran que el 35 % de las cepas de gonococo por ellos estudiadas aisladas en Londres, son relativamente resistentes entendiendo por tales las cepas para las que la CIM de la penicilina es de 0,10 a 0,50 mcg/ml (0,5 mcg/ml es la máxima resistencia que encuentran). Esta proporción es prácticamente igual a la del 37 % encontrada por Nicol, Ridley y Symonds dos años antes en el mismo Hospital.

Las cifras que acabamos de mencionar son ligeramente superiores al 31,5 % de cepas relativamente resistentes encontradas por Verhagen y colaboradores (135) en Holanda, en 1971. Interesa destacar, sin embargo, que estos autores encuentran 4 cepas (3,6 % de las estudiadas) con una CIM de 0,6 mcg/ml.

Los mismos autores estudian la sensibilidad de 736 cepas de gonococo aisladas en Kenia de las que el 61,9 % resultan relativamente resistentes a la penicilina, con CIM comprendidas entre 0,3 y 1,2 mcg/ml; valores de 1,2 mcg/ml se encuentran solamente en el 2,03 % de las cepas estudiadas. Para ninguna era la CIM superior a 1,2 mcg/ml.

Este es un ejemplo demostrativo de las grandes diferencias de unos países a otros en la proporción de cepas relativamente resistentes.

A partir de 1965 se han encontrado en algunos países escasas cepas de gonococo con valores de la CIM de la penicilina superiores a 1,2 mcg/ml y así, por ejemplo, entre 108 cepas estudiadas por Reyn (114) procedentes de Filipinas, Ceilán, Thaidandia y otras comarcas de Asia sudoriental, se encontró una cepa aislada en Hong Kong, con una CIM de 2,4 mcg/ml.

Maier, Beilstein y Zubrzycki (87) estudiaron la sensibilidad a la penicilina G

de 225 cepas de *N. gonorrhoeae* aisladas en Filadelfia (Estados Unidos); encontraron cuatro cepas (1,77 %) que para su inhibición requerían 3,2 mcg/ml del antibiótico.

En este trabajo y referido a la penicilina G destacan los autores una observación muy importante; nos referimos a la correlación extraordinariamente buena entre la CIM y el halo de inhibición (coeficiente de correlación —0,91).

En 1975 Thornsberry, Biddle, Kaufman, Johnson, Reynolds y Wiesner (131) en 4.405 cepas de *N. gonorrhoeae* procedentes de diversas partes de Estados Unidos encuentran cepas (no precisan el número) para las que la CIM de penicilina G es de 4 mcg/ml.

A pesar de todo, no puede hablarse de cepas de *N. gonorrhoeae* resistentes a la penicilina, ya que el grado de resistencia que muestran no es lo bastante elevado como para justificar el abandono del tratamiento de la gonococia con penicilina; sigue siendo fácil conseguir los niveles de penicilina necesarios para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por estas cepas *menos sensibles* de gonococo (*).

d) *Resistencia de* M. tuberculosis *a las drogas antituberculosas*

Ofrece un interés especial la adquisición de resistencia a los fármacos antituberculosos (antibióticos y quimioterápicos) por *Mycobacterium tuberculosis.* La trascendencia del problema justificaría el dedicarle una monografía. Mi escasa experiencia personal del tema me fuerza a limitarme a la exposición de algunos aspectos fundamentales del mismo.

Lowbury y Ayliffe (84), en su libro sobre resistencia bacteriana a los agentes antimicrobianos, inician el capítulo dedicado a la tuberculosis con las siguientes palabras: «El fracaso de la antibioticoterapia antituberculosa se debe a dos razones: a la aparición de micobacterias resistentes a los antibióticos y, con mayor frecuencia, al hecho de que los tratamientos sean incompletos o inadecuados. En muchas ocasiones ambos factores actúan conjuntamente.» Vamos a intentar razonar esta afirmación tan categórica.

La adquisición de resistencia a los antibióticos por el bacilo de Koch es un ejemplo más del proceso al que tantas veces nos hemos referido:

1) *Mutación,* que como hemos dicho reiteradamente, es un fenómeno que ocurre al azar y que afecta a un número de los componentes de la población bacteriana, habitualmente entre una de cada 10^4 y una de cada 10^8 de las bacterias.

(*) Ya en prensa este Discurso, la OMS ha publicado [*Weekly Epidemiological Record,* 1976, 51/38 (293-294)] una nota en la que se informa que: "Por primera vez se han aislado de enfermos cepas de gonococo productores de penicilinasa." Esta información es calificada como de "la más alta importancia clínica y epidemiológica".

Muy poco después se han publicado diversos trabajos, que no podemos recoger aquí, en los que se confirman y amplían las observaciones comunicadas por la OMS. Véase "Editorial" de *The Lancet* publicada en el número del 2 de octubre de 1976.

Consecuencia de ello, se necesita la presencia de grandes cantidades de bacilos en la lesión tuberculosa para que surjan tales mutantes.

2) *Selección,* consecutiva a la administración de antibióticos no activos sobre dichas bacterias mutadas, y

3) *Proliferación* de las bacterias resistentes.

El mecanismo que conduce a la aparición de cepas de bacilo de Koch resistentes a los antibióticos está ligado a modificaciones mutacionales de genes cromosómicos. No se conoce en *M. tuberculosis* procesos semejantes al de la lisogenización ni al de la transducción descritos en *M. phlei* y *M. smegmatis.*

> Las mutaciones que conducen a la aparición de cepas resistentes de bacilo de Koch no condicionan el mismo grado de resistencia para los diferentes antibióticos y quimioterápicos; para las isoniacidas, estreptomicina y etionamida pueden determinar grados de resistencia intensos o ligeros; para el etambutol la resistencia es habitualmente de poca intensidad mientras que para la rifampicina y piracinamida determinan grados elevados de resistencia. La aparición de una mutante ligeramente resistente puede ser un hecho intrascendente si la dosis del antibiótico correspondiente proporciona niveles suficientes para el nuevo grado de sensibildad de la bacteria.

Por lo que se refiere a la proporción de células bacterianas mutantes resistentes a un antibiótico presentes en una cepa normalmente sensible, existen también diferencias bastante grandes de una a otra.

Según datos de Le Lirzin y Djuronic (82) la proporción es de 1 a 5 por cada 10^3 para la etionamida, 1 por cada 10^5 para la estreptomicina y 1 por cada 10^7 para la rifampicina, es decir, en una cepa sensible determinada la proporción de células resistentes a la estreptomicina es 100 veces superior que la de las resistentes a la rifampicina.

Según David (42) la proporción normal de mutantes resistentes es mucho menor. Referida a la isoniacida, estreptomicina, etambutol y rifampicina, la proporción normal de células bacterianas resistentes es de 2,56 por cada 10^8, 2,95 por cada 10^8, 1 por cada 10^7 y 2,25 por cada 10^{10}, respectivamente.

Se ha descrito la existencia de cepas resistentes de bacilo tuberculoso frente a todos los antibióticos y quimioterápicos usados para el tratamiento de la tuberculosis y, de la misma manera, se ha podido prevenir su aparición por el empleo conjunto de dos o, mejor, de tres de dichas sustancias.

La aparición de cepas de bacilo de Koch resistentes a la estreptomicina en el curso de tratamientos *exclusivos* con dicho antibiótico es un hecho frecuentísimo; descubierto apenas introducida la estreptomicina en terapéutica, un Comité del B.M.R.C. (25) comprobó ya en 1948 la aparición de cepas resistentes a la estrep-

tomicina en 35 de 41 enfermos tratados, en ocasiones durante el primer mes del tratamiento y en conjunto en el plazo promedio de 45 días.

Muy poco después se encontraron índices semejantes de resistencia al PAS y a las isoniazidas administradas como medicación única.

Ahora sabemos que puede ocurrir lo mismo, aunque con diferencias en la frecuencia, con todos los antibióticos y quimioterápicos antituberculosos. En la tabla IV aparecen datos recopilados por March (89) en los que se muestra la extraordinaria frecuencia y la rapidez en la aparición de la resistencia.

TABLA IV

RESISTENCIAS ADQUIRIDAS POR EL BACILO DE KOCH EN TUBERCULOSOS TRATADOS CON MONOTERAPIA (VALORES EXPRESADOS EN %)

Tiempo en meses	1	2	3	4	6	7-12
Estreptomicina	7-14	33-40	54-68	70-75	71-78	—
Isoniazida	8-22	43-71	65-90	71-97	70-100	99
PAS	10	30	40		60	62,5
Etionamida	18-23	32-41	41-65	—	—	—
Cicloserina	—	7	—	24	27	34
Pirazinamida	—	—	32	—	—	—
Kanamicina	5	25	30	14	39-100	100
Viomicina	30	—	—	100		—
Tioacetazona	—	—	5	15	35	
Etambutol	—	—	33	—	37	

Si tenemos en cuenta la escasa proporción con que, por mutación, aparecen las células bacterianas resistentes, la aparición de resistencias simultáneas a dos sustancias requiere poblaciones bacterianas tan numerosas que resulta difícil que lleguen a reunirse y mucho más difícil aún es la aparición de mutantes con resistencia simultánea a los tres agentes antituberculosos que suelen utilizarse. Esta es la razón principal por la que en todo tratamiento antituberculoso es norma general el empleo de dos o mejor de tres sustancias antituberculosas.

Otro aspecto que debe tenerse en cuenta es la considerable duración de todo tratamiento antituberculoso bien dirigido. No debemos olvidar que en la mayoría de las formas de tuberculosis el tratamiento debe mantenerse entre 18 meses y dos años, dividido en dos etapas: la *fase de ataque* y la *fase de mantenimiento.* Durante la fase de ataque, que comprende en las localizaciones pulmonares hasta

la negativización del esputo y la regresión radiológica de las lesiones, se mantiene la terapéutica trivalente. Durante la fase de mantenimiento (tratamiento de consolidación) se reducen a dos los medicamentos utilizados, suprimiendo la estreptomicina si se había utilizado en la fase de ataque. Si tenemos en cuenta tan largo plazo de tratamiento, la incomodidad de la administración de algunas de las sustancias empleadas y la presentación no excepcional de manifestaciones tóxicas, agravado todo ello en muchas ocasiones por razones económicas, se comprende que en un tanto por ciento muy elevado de casos no se instaure el tratamiento óptimo o no se mantenga el tiempo aconsejable para cada una de las dos fases señaladas.

Como consecuencia de ello se cae con frecuencia en alguno o algunos de los siguientes errores: a) se reduce el número de drogas utilizadas; b) se reduce la dosis de alguna o algunas de ellas; c) el enfermo abandona el tratamiento una vez conseguida la curación clínica de su proceso.

Desde el punto de vista práctico podemos llegar a la conclusión de que el tratamiento correcto de los procesos tuberculosos debe basarse en los siguientes principios: 1) empezar el tratamiento —fase de ataque— con tres fármacos, para continuar —fase de mantenimiento— con dos; 2) convencer al enfermo de la necesidad de mantener el tratamiento durante un mínimo de 18 meses, siempre a la dosis completa de cada uno de los medicamentos utilizados, incluso en los casos de evolución rápidamente favorable; 3) elección de la triada terapéutica óptima en cada país y en cada momento.

Durante años se ha utilizado la estreptomicina, PAS e hidrazida del ácido isonicotínico, los tres tuberculostáticos mayores clásicos. Posteriormente se ha tendido a la sustitución del PAS por el etambutol. Más recientemente se ha introducido la asociación *isoniacida-etambutol-rifampicina.* No podemos discutir las razones que justifican estos cambios ni exponer las objeciones que pueden hacerse al empleo de cada uno de tales fármacos.

Nos falta considerar la utilidad del antibiograma para la elección en cada caso concreto de los preparados más adecuados para el tratamiento de la tuberculosis.

En el caso de *M. tuberculosis* es habitual hablar de resistencia primaria y de resistencia secundaria. Se entiende por *resistencia primaria* la de las cepas resistentes de bacilo de Koch aisladas de enfermos tuberculosos no tratados previamente mientras que la *resistencia secundaria* se refiere a la de las cepas resistentes a un determinado antibiótico o quimioterápico aisladas de pacientes en los que en el inicio del tratamiento eran sensibles a aquel antibiótico, es decir, a las cepas resistentes surgidas en el curso de un tratamiento.

Para la elección de los fármacos aconsejables en cada caso, el método ideal parecería ser el estudio previo del antibiograma; en la práctica no se puede seguir esta norma ya que requiere un plazo pocas veces inferior a dos meses y no podemos esperar tanto tiempo para iniciar el tratamiento. Una situación semejante plantea la aparición de las resistencias secundarias en el curso del tratamiento.

Además de la tardanza en obtener estos datos, no debemos olvidar que la técnica es compleja, costosa y de interpretación no tan simple y sencilla como, por ejemplo, en el caso de los antibiogramas de las enterobacteriáceas (31).

Esto no significa que esta investigación no sea importante. Por el contrario, es necesario conocer en cada momento la proporción de cepas resistentes a los diferentes antibióticos y quimioterápicos para, con estos datos, elegir la triada medicamentosa más recomendable en aquel momento.

El antibiograma individual es necesario en los casos en los que no se obtiene el resultado terapéutico esperado tras la instauración de un tratamiento de acuerdo con las normas que acabamos de señalar y con la garantía de que se ha llevado a cabo correctamente.

La proporción de cepas de bacilo de Koch resistentes a los antibióticos difiere ampliamente de unos países a otros. Si tomamos como punto de referencia la situación en Francia, y para ello nos basamos en los datos aportados por Canetti y colaboradores, encontramos que por lo que se refiere a *resistencias primarias* (32) la proporción es la siguiente: a la estreptomicina 7-8 %, a la isoniacida 4-5 %, al etambutol 0,1-0,2 % y a la rifampicina 0,1-0,2 %.

Las *resistencias secundarias* que se han encontrado en un gran sanatorio de las afueras de París de 1972 a 1974 (Parrot) (110) son las siguientes: a la estreptomicina 16 %, a la isoniacida 18 %, al etambutol 4,5 %, a la rifampicina 5,0 % y a la etionamida 7,0 %.

Según Garrod, Lambert y O'Grady (59), las resistencias primarias en Gran Bretaña, Canadá y Estados Unidos son bastante menores: estreptomicina del 2 al 3 %, isoniacida del 1,5 al 4,0 % y PAS, 3,7 al 4,6 %.

Se ha podido observar que la evolución de la resistencia de *M. tuberculosis* difiere de una manera marcada entre los países técnicamente avanzados y aquellos con condiciones socioeconómicas deficientes. En una amplia revisión realizada en Gran Bretaña en 1955-1956 por Fox y colaboradores (53), eran resistentes a una o más de las drogas usadas el 5,1 % de 974 cepas aisladas de esputos de tuberculosos; en la revisión realizada en 1963 por Miller, Tall, Fox, Lefford y Mitchison (95), la proporción de cepas resistentes no se había modificado, representando el 4,5 %. En Estados Unidos, Hobby, Johnson, Crawford-Cagliardi, Boytar y Johnson (66) han comunicado resultados muy semejantes. Parece evidente, pues, que no existe una tendencia manifiesta al aumento de resistencias primarias en los países técnicamente avanzados (Fox, 1969) (52).

Por el contrario, observaciones muy precisas realizadas en Hong-Kong (67) muestran que el número de cepas resistentes a uno o más agentes antituberculosos alcanza al 40 % de las 564 cepas estudiadas. De la misma manera, mientras que en Gran Bretaña se aíslan cepas resistentes simultáneamente a dos drogas del 0,9 % de los enfermos y a tres del 0,2 %, en Hong-Kong las cepas resistentes a dos o tres fármacos antituberculosos representan el 18 %.

Por lo que se refiere a España, no conocemos datos lo suficientemente amplios y representativos de las diversas partes del país que permitan precisar con exac-

titud la importancia real del problema de la resistencia del bacilo de Koch a los antibióticos. Según Seix y March (119) y March (90) se puede afirmar que no existe una tasa elevada de resistencias primarias.

Consideramos del mayor interés los datos aportados por Velasco y Ortega (134), autores que basados en el estudio de las cepas aisladas de 167 tuberculosos adultos estudiados en 1971 y 1972 encuentran la siguiente proporción de *resistencias primarias*:

Estreptomicina	9,1 %
Etionamida	8,4 %
Tiosemicarbazona	7,5 %
Isoniacida	7,1 %
PAS	0,6 %
Etambutol	0 %
Rifampicina	0 %

Estas cifras son, en conjunto, algo superiores a las que, correspondientes a las cepas aisladas en Francia, aparecen en la recopilación de Velasco y Ortega, y muy superiores a las de las cepas aisladas en Inglaterra, Italia, Holanda, Checoslovaquia, etc. Como resumen de su excelente revisión, Velasco y Ortega llegan a la conclusión de que a pesar de que en algunas de las estadísticas recopiladas por ellos se descubre en los últimos años un aumento de las resistencias primarias (Japón, Turquía), puede responderse con una negativa a la pregunta de si en los últimos tiempos se observa en el mundo un *aumento significativo* de las resistencias primarias.

En el mismo trabajo aportan sus observaciones personales referidas a las *resistencias secundarias;* la proporción de las mismas referidas a los fármacos antituberculosos más utilizados en nuestro país es la siguiente:

Isoniacida	47,8 %
Estreptomicina	42,9 %
Tiosemicarbazona	19,0 %
Etambutol	16,9 %
PAS	14,0 %

Mira (96), al estudiar las cepas aisladas de 100 enfermos afectos de tuberculosis crónica de larga duración, encuentra la siguiente proporción de resistencias secundarias: isoniacida = 73 %; rifampicina = 33 %; estreptomicina = 26 %; etambutol = 26 %; cicloserina = 20 %; PAS = 13 %; etionamida = 9 % y pirazinamida = 9 %.

En los últimos tiempos son numerosos los bacteriólogos que han emprendido el estudio de este punto, tan importante para una correcta terapéutica de la tuberculosis. Sería de desear una valoración conjunta de datos correctos de las más diversas procedencias hasta conseguir el mapa nacional de este tipo de resistencia.

MECANISMOS DE RECOMBINACION GENETICA EN LAS BACTERIAS. SU IMPORTANCIA EN LA ADQUISICION DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS

A. Generalidades

Durante mucho tiempo se aceptaba que en las bacterias la reproducción era siempre por partición, en la mayoría de los casos por fisión binaria, sin intervención de material genético extraño a la bacteria. Consecuencia de esta idea era la de que cualquier variación genética bacteriana tenía que ser debida forzosamente a una mutación.

Pero a principios de la década de los 40 se demostró la posibilidad de la penetración en una célula bacteriana de material genético procedente de otra bacteria. Hoy se conocen con gran detalle, por lo menos en condiciones experimentales, diversos procesos de recombinación genética bacteriana. La importancia de este fenómeno es extraordinaria para comprender el problema que estamos estudiando, ya que entre los genes que pueden pasar de una bacteria a otra se encuentran genes que condicionan la resistencia a los antibióticos.

Es sabido que el descubrimiento de la existencia de procesos de recombinación genética bacteriana arranca de la observación de Griffith (63), en 1928, de que si se inocula un ratón con neumococos *vivos* del tipo 2 en fase R, es decir, neumococos desprovistos de cápsula y por lo tanto avirulentos, y, simultáneamente, neumococos capsulados *muertos* del tipo 1, el ratón, en contra de lo que cabe esperar, muere y de su sangre se aísla un neumococo vivo, capsulado, del tipo 1 (recordemos que en los neumococos el *tipo* depende de la cápsula). En estudios posteriores se pudo conseguir esta transformación *in vitro*.

Avery, Mac Leod y McCarty, en 1941 (11) pudieron demostrar que la sustancia responsable de este *cambio de tipo*, de esta *transformación*, era el ADN procedente de los neumococos muertos y capsulados utilizados en la experiencia.

Es este un descubrimiento de importancia fundamental en Biología ya que revela no sólo la posibilidad de la transferencia genética en las bacterias, sino que aporta la prueba objetiva de que la herencia está ligada al ADN.

Otro proceso con paso de material genético de una bacteria a otra es el de la *conjugación*, fenómeno descubierto por Lederberg y Tatum en 1946 (81), en el que

el paso del material genético de la célula dadora a la receptora requiere contacto entre célula y célula.

El tercero de los mecanismos de recombinación genética es el conocido con el nombre de *transducción por bacteriófagos,* descubierto por Zinder y Lederberg en 1952 (150); consiste en la transmisión por intermedio de un bacteriófago de un fragmento de ADN de una bacteria a otra.

En todos estos mecanismos de recombinación genética la etapa final es común: la formación de un *zigote parcial.* Recordemos que en la bacteria los genes están dispuestos formando una gran molécula de ADN, lineal, circular y cerrada; cualquier fragmento de la misma puede intervenir en los procesos de recombinación.

El fragmento de ADN extraño procedente de otra bacteria se denomina *exogenote* en oposición al conjunto del ADN propio o *endogenote.* El zigote resultante de la unión del exogenote y el endogenote se denomina *zigote parcial.*

Sea cual sea el mecanismo que conduce a la entrada de un exogenote, el destino de éste presenta una serie de rasgos comunes. Las diversas posibilidades las sistematizan Stanier, Doudoroff y Adelberg (124) de la siguiente manera:

1) Si el fragmento de ADN que constituye el exogenote posee una serie de bases homólogas con un segmento del ADN del endogenote, ocurre inmediatamente un emparejamiento de ambos. Este proceso se denomina *integración.* El mecanismo por el cual ocurre la integración no se conoce con seguridad.

Para que ocurra la integración es preciso que la ruptura de la cadena del ADN ocurra en las dos moléculas en lugares similares. El proceso de emparejamiento e integración es tanto más probable cuanto más semejanza exista entre el ADN del endogenote y el del exogenote.

2) Si por cualquier circunstancia no se llega a la integración del exogenote pueden ocurrir las siguientes eventualidades:

α) Si el exogenote lleva consigo información genética suficiente para su propia replicación se origina un *plásmido,* que puede persistir en el citoplasma de la célula y replicarse independientemente del cromosoma de la misma. En estas condiciones, el exogenote es un *replicón,* o sea, un fragmento de ADN con capacidad autónoma de replicación.

β) Cuando el exogenote no reúne las características precisas para su replicación autónoma puede *persistir* en el citoplasma bacteriano *sin replicarse.* En estas condiciones pasa a *una* de las células hijas, en la generación siguiente a *una* de las nuevas células hijas y así a lo largo de algunas generaciones, es decir, nunca habrá

más que *una* célula que contenga dicho exogenote. Esta posibilidad se ha observado en el curso de la transducción y se conoce con el nombre de *transducción abortiva.*

γ) Otras veces, a su entrada, el exogenote es *degradado enzimáticamente;* este fenómeno se conoce con el nombre de *restricción.*

B. Transformación bacteriana

El fenómeno de la *transformación bacteriana* descrito inicialmente en los neumococos, ocurre también en gérmenes de los géneros *Neisseria, Bacillus, Streptococcus,* en la especie *Haemophilus influenzae,* etc. Si bien desde el punto de vista teórico su importancia es extraordinaria, desde el punto de vista práctico su importancia es limitada, ya que para que ocurra es preciso que se libere el ADN de una bacteria, que no se desnaturalice en el medio ambiente y que sea capaz de penetrar en otra bacteria e integrarse en su ADN. Todo ello, que experimentalmente es relativamente fácil de conseguir, parece ser un hecho excepcional *in vivo* en condiciones naturales. Incluso experimentalmente sólo se consigue por este mecanismo la transmisión de fragmentos muy pequeños de material cromosómico.

En el neumococo se ha conseguido, *in vitro,* la transmisión de la resistencia a la estreptomicina, a las sulfamidas por Hotchkiss (68) y por Hotchkiss y Evans (69), y a la optoquina.

A los resultados que acabamos de citar podemos añadir la observación recogida por Walter, Heilmeyer y colaboradores (136) de la transmisión por este mecanismo, también *in vitro,* de la resistencia a la estreptomicina desde el estreptococo viridans a otros estreptococos y entre cepas diferentes de *N. gonorrhoeae.*

C. Transducción por bacteriófagos

Recordemos que los bacteriófagos son virus que se multiplican a expensas de las bacterias. Están dotados de una exquisita especificidad, en el sentido de que sólo pueden penetrar y proliferar en el interior de algunas cepas determinadas de una especie bacteriana determinada.

Durante mucho tiempo sólo se conoció el *ciclo lítico* de los bacteriófagos, ciclo que comprende una serie de etapas que conducen a la lisis de la bacteria invadida, que podemos esquematizar de la siguiente manera: la partícula del bacteriófago se fija en la pared de la bacteria e inyecta en el interior de la misma su ADN (*); el resto de los componentes del bacteriófago no penetra en el interior

(*) No es este momento oportuno para referirnos a los bacteriófagos que contienen ARN.

de la bacteria parasitada. Una vez dentro de la bacteria, el ácido nucleico del fago modifica el metabolismo bacteriano tan radicalmente que la bacteria deja de replicar su propio ADN y sintetiza el del bacteriófago. Independientemente, y también por estímulo del ADN fágico, la célula bacteriana sintetiza los otros componentes del bacteriófago. En una etapa posterior, y dentro aún de la bacteria parasitada, se une el ADN fágico con las proteínas fágicas y se originan así nuevas partículas completas de bacteriófago con capacidad infectante. Finalmente, se lisa la bacteria y quedan libres las partículas fágicas, cada una de las cuales puede repetir el ciclo en una nueva bacteria.

Pero los bacteriófagos no siempre desarrollan el ciclo lítico. Con mucha frecuencia ocurre una eventualidad muy diferente: después de la penetración en la bacteria, el genoma vírico puede replicarse sincrónicamente con el del huésped (*fagos moderados* o *atenuados*); la bacteria no se lisa, sigue su ciclo reproductor normal, se divide y produce una clona de células «infectadas».

En esta población bacteriana la mayoría de las células no contienen proteínas constitutivas del virus, es decir, la mayoría de los genes víricos se mantienen reprimidos. Ocasionalmente, sin embargo, puede ocurrir la desrepresión espontánea de los mismos en cuyo momento se inicia un ciclo lítico con formación de viriones fágicos y lisis de la bacteria.

Este tipo de relación virus/bacteria se conoce con el nombre de *lisogenia;* a las bacterias infectadas que poseen la *capacidad latente* de producir partículas fágicas maduras se les llama *bacterias lisógenas;* a los bacteriófagos capaces de comportarse de esta manera *atenuados* o *moderados* y al genoma vírico presente en las células de un cultivo lisógeno se le denomina *profago* (Stanier, Doudoroff y Adelberg) (124).

Nos falta estudiar ahora la *transducción,* fenómeno que, como ya hemos indicado, consiste en la transmisión por mediación del bacteriófago de un pequeño fragmento de ADN bacteriano de una bacteria a otra. Como en todos los procesos de recombinación genética bacteriana, el ADN transmitido es un exogenote que una vez dentro de la bacteria puede comportarse de diferentes maneras y que en este caso dependen en gran parte de las condiciones en que este ADN bacteriano alcance la bacteria aceptora.

Ello nos lleva a considerar dos tipos diferentes de transducción:

α) La transducción *restringida* o *especializada,* en la que el genoma del bacteriófago se integra en el de la bacteria siempre en un punto preciso y al separarse del mismo puede arrastrar un pequeño fragmento del cromosoma bacteriano que contiene en todos los casos el mismo grupo de genes.

β) La transducción *generalizada* en la que, por un mecanismo diferente al anterior, se puede transmitir cualquier gen bacteriano.

En relación con el tema que estamos estudiando interesa destacar que la transducción puede afectar tanto al material cromosómico como al extracromosómico.

Aunque el fenómeno de la *lisogenia* fue considerado inicialmente poco frecuente, se ha observado en tantas y tan diversas especies bacterianas, y con tanta frecuencia, que algunos autores lo consideran como un hecho normal más que como un hecho excepcional. El fenómeno de la *transducción* es también bastante frecuente y se ha podido comprobar en los géneros *Salmonella, Escherichia, Shigella, Proteus, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus,* en el *Bacillus subtilis,* en algunas especies del género *Mycobacterium,* etc.

El caso más importante de adquisición de resistencia a un antibiótico por transducción es, probablemente, el de la transmisión del plásmido portador de los genes que inducen la síntesis de la penicilinasa por *Staphylococcus aureus.*

a) *La resistencia de los estafilococos a la penicilina G*

La transformación de una bacteria en resistente a un antibiótico por adquisición de la capacidad de producir una enzima que inactive dicho antibiótico, es un fenómeno muy frecuente; en los estafilococos y en algunas especies bacterianas pertenecientes a diferentes géneros, la transducción de un plásmido que contiene los genes que regulan la producción de penicilinasa va unida a la adquisición de resistencia a la penicilina G, antibiótico sensible a la acción de dicha enzima.

La penicilinasa es una enzima que actúa rompiendo el anillo β-lactámico que forma parte del núcleo central de las betalactaminas (penicilinas y cefalosporinas). Es, pues, una β-lactamasa. Son productores de β-lactamasas no sólo los estafilococos sino también numerosas especies de bacilos gramnegativos y bacilos grampositivos.

Las β-lactamasas constituyen un grupo de enzimas bastante heterogéneo; presentan de común su acción sobre el anillo β-lactámico con lo que éste es capaz de fijar el iodo y el yoduro potásico. Hay entre ellas grandes diferencias inmunológicas hasta el punto de no existir reacciones cruzadas entre las procedentes de especies grampositivas y las formadas por especies gramnegativas; mientras que unas son inducibles (las estafilocócicas), otras no lo son, etc.

La observación de Mary Barber, en 1949 (15), de que la producción de penicilinasa por los estafilococos se pierde con una frecuencia superior a la que cabía esperar de los índices corrientes de mutación, junto con el hecho de que nunca se haya podido demostrar en los estafilococos la adquisición *por mutación* de la resistencia a la penicilina condicionada por la producción de penicilinasa, fueron los datos decisivos que condujeron a Novick (102) a la hipótesis de que los genes

que regulan la formación de penicilinasa en los estafilococos son extracromosómicos, es decir, están contenidos en un plásmido. Investigaciones posteriores han confirmado plenamente la validez de dicha hipótesis.

Este plásmido consta de dos partes, la portadora de los genes determinantes de la resistencia y la que contiene los genes responsables de la autorreplicación, estructura semejante a la establecida para algunos factores R propios de los bacilos gramnegativos. Se transmite por transducción mediante bacteriófagos (recordemos que la conjugación es un mecanismo de recombinación genética limitado a las bacterias gramnegativas).

> Se conoce la posible existencia en *Staph aureus* de varios plásmidos portadores de genes que regulan la resistencia de la bacteria a diferentes antibióticos o le confieren determinadas características: resistencia a sales de mercurio y de cadmio, producción de enterotoxina B y de hemolisina beta, etc. Se ha sugerido que, en determinadas cepas, la capacidad de producir pigmento, coagulasa, toxina hemolítica y fibrinolisina puede depender de la presencia del correspondiente plásmido. Los más importantes y mejor conocidos son los que constituyen el grupo de *plásmidos de la penicilinasa.* Ocasionalmente se encuentran plásmidos de este grupo que carecen del gen inductor de la penicilinasa y que, por el contrario, nunca dejan de contener el de la resistencia a los iones de cadmio por lo que a este grupo de plásmidos se les denomina *Pen/Cad.* Se han descrito también plásmidos portadores de genes que inducen la resistencia a las tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina y kanamicina.

Los plásmidos estafilocócicos se distribuyen en dos grupos diferentes (véase tabla I, pág. 28). Los *Pen/Cad* son de tamaño grande; el otro tipo, al que corresponden los plásmidos de la resistencia al cloranfenicol y a las tetraciclinas, son mucho más pequeños.

Los estafilococos no formadores de penicilinasa son tan sensibles a la penicilina G que dosis muy pequeñas de la misma los eliminan con facilidad; con mucha frecuencia, su puesto pasa a ser ocupado por estafilococos formadores de penicilinasa. Consecuencia de este proceso, el aumento de las cepas de estafilococo resistentes a la penicilina G ha sido impresionante.

A partir del año 1944 en que la gran mayoría de las cepas de estafilococo aisladas de los productos patológicos eran sensibles a la penicilina G, se produjo un aumento tan rápido del número de cepas resistentes que, según datos de Barber (14) y de Barber y Rozwadowska-Dowzenko (19), en los estafilococos aislados en un hospital general su proporción evolucionó de la siguiente manera: 14 % en 1946; 38 % en 1947 y 59 % en 1948. Por la misma época y en los años inmediatamente posteriores se publicaron datos similares procedentes de numerosos países. En 1950 la mayoría de las cepas de estafilococo aisladas de enfermos hospitalizados eran resistentes a la penicilina G. En 1951, según Rown-

tree (117), en Australia, lo eran el 80 %. Alrededor del año 1960 su proporción era del 90 % o superior en la mayoría de los países.

Nuestros datos (Foz, 1976), referidos a Barcelona, confirman esta tendencia.

Años	*Cepas resistentes*
1955-1957	33,8 %
1958-1959	70 %
1960-1961	74,5 %
1962-1963	90,1 %
1964-1966	96,1 %
1967-1970	93,1 %
1973-1975	92,7 %

Como consecuencia de esta evolución, en los primeros años de la década de los 60, poco antes de la introducción en clínica de las penicilinas penicilinasarresistentes, el tratamiento de las infecciones por estafilococo resistentes a la penicilina G representaba por los clínicos un problema frecuente y grave.

En los últimos años, en la mayoría de los países se ha llegado a una estabilización o incluso, en algunos, la proporción de las cepas resistentes tiende a disminuir. De las numerosas estadísticas en las que se aprecia esta tendencia una muy amplia y bien elaborada es la de Otaya, Machihara, Yoshimura y Yamamoto (107) que recoge los datos correspondientes al Japón y nos muestra que la proporción de cepas de estafilococos hospitalarios *sensibles* a la penicilina G en el año 1965-66 era sólo del 13,5 %, pasa al 14,3 % en 1966-67, 14,8 % en 1967-68, 15,7 % en 1968-69 y 18,1 % en 1969-70 para llegar al 19,4 % en los años 1970-1971. En Estados Unidos las cepas sensibles representan, según Ross, Rodríguez, Controni y Khan (116), el 5 % entre las hospitalarias y el 16 % entre las no hospitalarias.

b) *Estafilococos resistentes a las penicilinas penicilinasarresistentes*

Así como en el caso de la penicilina G y demás penicilinas sensibles a la acción de la penicilinasa la resistencia de los estafilococos a las mismas se explica por su capacidad de producir dicha enzima, el problema es mucho más complejo cuando se trata de explicar el mecanismo de su resistencia a la meticilina y demás isoxazolilpenicilinas (penicilinas resistentes a la penicilinasa).

Inicialmente se aceptó que este tipo de resistencia era de naturaleza cromosómica pero en 1971 Dornbusch (47) aportó pruebas a favor de su naturaleza plasmídica. En los últimos años se ha trabajado muy intensamente para resolver los numerosos problemas relacionados con un hecho tan importante desde el punto de vista práctico como es la aparición y la relativa difusión de cepas de estafilococo

resistentes a la meticilina y, probablemente, a todas las β-lactaminas. Nuestros conocimientos al respecto son aún incompletos tanto en lo que se refiere a la base genética de este tipo de resistencia, como a su importancia clínica y a las razones que expliquen su irregular distribución geográfica.

Las especiales características de este tipo de resistencia las esquematiza Lacey (79) de la siguiente manera:

1) La resistencia a la meticilina se observa en un número escaso de células bacterianas dentro de una determinada población de estafilococos.

2) Esta resistencia se acompaña *in vitro* por un evidente grado de resistencia a *todas* las penicilinas y cefalosporinas.

3) El mecanismo de esta resistencia no es por inactivación enzimática y, por tanto, es completamente distinto a la resistencia determinada por la producción de penicilinasa.

Hay ciertos aspectos técnicos relativos a este tipo de resistencia que interesa precisar; por ejemplo: en los cultivos de cepas de estafilococo meticilinarresistentes incubados *a 37° C* en un *medio de cultivo ordinario,* sólo son resistentes a la meticilina alrededor de una de cada 10^5 células del cultivo, resistencia que se manifiesta por su capacidad para formar colonias en un medio que contiene una concentración de meticilina diez veces superior a la que inhibe la proliferación de los estafilococos sensibles a la misma. Pero estos microorganismos no son mutantes en el sentido habitual de la palabra ya que subcultivos de una de tales clonas originan una población con resistencia variable.

Si la siembra se hace en un medio con un contenido normal de NaCl y *la incubación se hace a 30° C,* o en un *medio rico en NaCl* (5 %) con incubación a 37° C, las diferencias en las características del halo de inhibición permiten una separación neta entre cepas sensibles y cepas resistentes.

Este tipo de resistencia se denomina «heterogénea». El concepto de población heterogénea aplicado en este sentido lo debemos a Sutherland y Rolinson (126), y es el que ofrecen todas o casi todas las cepas de estafilococo meticilinarresistentes procedentes de productos patológicos.

Chabbert (36) ha establecido tres grupos (RB, RH y RO) entre las cepas «heterogéneas» basándose en el grado de resistencia, en la homogeneidad de la misma, en la influencia en su manifestación de la concentración salina del medio y en las diferencias en su grado de sensibilidad a la oxacilina y a la cefalotina.

Las experiencias realizadas para precisar la localización de los genes determinantes de la resistencia a la meticilina indican como probable que los genes transducidos se han integrado en material genético, cromosómico o extracromosómico, de la célula bacteriana receptora. En opinión de Lacey se trata de un *tipo de herencia único;* son precisas nuevas investigaciones para aclarar este problema.

Es probable que los mecanismos determinantes de la resistencia sean diferentes en los tres grupos en que ha clasificado Chabbert las cepas con esta resistencia heterogénea.

Las primeras observaciones de estafilococos resistentes a la meticilina se señalaron en Inglaterra en 1961 y se deben a Barber (17). Garrod, Lambert y O'Grady (59) resumen la situación actual de este problema de la siguiente manera: «Se creyó inicialmente que no existían cepas de *Staph. aureus* resistentes a la meticilina y luego que eran extraordinariamente raras; posteriormente se ha visto que aumentaban en su frecuencia.» La proporción de cepas resistentes entre los muchos miles examinadas en el *Central Public Health Laboratory* (Londres) pasó de 0,06 % en 1960, a 0,97 en 1964 y a 4,11 en 1968 (18). La proporción es mucho más elevada entre las cepas aisladas de infecciones hospitalarias.

Lo comprobaron así Chabbert y Baudens (37), y Chabbert (36) en Francia, Benner y Kayser (23) en Suiza, Siboni y Poulsen (120) en Dinamarca, etc. Según Chabbert, en 1970, entre las cepas aisladas en París de infecciones hospitalarias la proporción de las cepas resistentes era del 30 %.

Recientemente (1975) Joly, Cluzel, Henri y Sirot (74), en Francia, encuentran un 16 % de cepas resistentes y Keane y Hone, en Irlanda (77), un 25 %, cifras ambas semejantes a las encontradas por los autores que acabamos de mencionar, y muy superiores a las encontradas en Estados Unidos e Inglaterra, que pocas veces superan el 3,0 %. Señalemos como una excepción entre las estadísticas americanas la de Ivler (70) en la que figura un 8 % de cepas de estafilococo resistentes a la meticilina.

En la tabla V, tomada de Zechovsky (149), es bien aparente la existencia de diferencias considerables de unos países a otros en la proporción de cepas de estafilococo con resistencia heterogénea.

Antes de terminar con el estudio de la resistencia de los estafilococos a las isoxazolilpenicilinas creemos necesario mencionar algunos puntos de gran importancia práctica, ninguno de los cuales podemos tratar con la extensión que se merece.

En primer lugar hay que destacar el hecho de que todas las cepas de estafilococos resistentes a la meticilina son también resistentes a las demás isoxazolilpenicilinas a pesar de que en determinadas condiciones experimentales *in vitro* podemos encontrar resultados aparentemente discordantes; más aún, esta resistencia alcanza también en su totalidad al otro grupo de β-lactaminas, las cefalosporinas.

Esto significa que al estudiar la sensibilidad *in vitro* de los estafilococos a las β-lactaminas, teóricamente basta con utilizar el «disco de la meticilina» y aplicar a todos los preparados del grupo el resultado obtenido con el mismo. La inestabilidad de los discos de meticilina ha hecho que muchos autores prefieran los discos de oxacilina, con los que se obtienen resultados superponibles.

A pesar de que se ha hecho alguna objeción a valorar de manera sistemática como resistentes a las cefalosporinas a todas las cepas de estafilococo resistentes

TABLA V

PROPORCION DE CEPAS DE ESTAFILOCOCO CON RESISTENCIA HETEROGENEA (*)

Origen geográfico	*Año*	*Autores*	*Estafilococos con resistencia heterogénea*
Francia	1962	Chabbert-Baudens	12 %
	1963	Chabbert	17 %
	1964	Courtieu, Guillermet	14,3 %
	1971	Audurier, Grenier	46 %
	1973	Bergogne, Zechovsky	22 %
Gran Bretaña	1961	Jevons	0,036%
	1962	Barber, Waterworth	3 %
	1963	Jevons, Coe, Parker	0,37 %
	1965	Colley, McNicol	4,1 %
	1970	Parker, Hewitt	4,1 %
Suiza	1965	Kayser, Hollinger	9,8 %
	1966	Kayser, Hollinger	17,7 %
	1967	Kayser, Hollinger	16,1 %
Dinamarca	1968	Jensen	10 %
	1971	Bülow	45 % de los estafilococos aislados por hemocultivo
Polonia	1961	Parnas, Jablonski	14 %
Suecia	1971	Hallander, Laurell	30 %
Estados Unidos	1963	Klein, Finland	0 %
	1968	Barrett, McGehe	1,4 %
	1971	Rubin, Armstrong	2,7 %

(*) Se incluyen bajo esta denominación las cepas resistentes a las penicilinas penicilinasarresistentes y a las cefalosporinas.

a la meticilina u oxacilina, en la actualidad, y en tanto no se disponga de datos que lo desaconseje, la mayoría de los autores (100) renuncian al empleo de las cefalosporinas para el tratamiento de las infecciones estafilocócicas por cepas resistentes a las isoxazolilpenicilinas.

Estas consideraciones nos fuerzan a dedicar un breve comentario a los aspectos técnicos para el estudio de la sensibilidad *in vitro* de los estafilococos a las β-lactaminas (99) por el método de difusión en agar. Se trata de un problema muy complejo y sobre el que existe una bibliografía abundantísima. Los factores que juegan un papel más importante, y a los que ya nos hemos referido, son la concen-

tración del inóculo, la concentración salina del medio, la temperatura y el tiempo de incubación.

La técnica utilizada habitualmente en nuestro laboratorio se basa en el empleo de un inóculo diez veces superior a aquel con el que se obtiene un crecimiento semiconfluente en la superficie del medio, 5 % de NaCl y temperatura de incubación de 37° C durante 18-20 horas. En estas condiciones la lectura pocas veces plantea problemas.

c) *Transducción en otras especies bacterianas*

También *Streptococcus pyogenes* puede adquirir resistencia a los antibióticos por transducción.

En los últimos años se han aislado cepas de dicho microorganismo resistentes a diversos antibióticos, en especial a la eritromicina, lincomicina, oleandomicina y espiramicina y, con menor frecuencia, a las tetraciclinas y al cloranfenicol. En ensayos *in vitro* realizados por Ukubata, Konno y Fujii (132), se ha observado que la transducción de este tipo de resistencias puede ocurrir según dos patrones diferentes: transferencia de resistencia sólo a las tetraciclinas o transferencia al cloranfenicol, macrólidos (eritromicina, kitasamicina, oleoandomicina y josamicina), lincomicina y clindamicina. Sólo se obtienen resultados positivos de transducción en estreptococos beta hemolíticos del grupo A, la mayoría de ellos pertenecientes al fagotipo T-12.

La transducción de resistencias en los estreptococos beta hemolíticos no ha planteado hasta ahora problemas equiparables por su gravedad a los creados por la adquisición de resistencia a las penicilinas por los estafilococos.

D. Conjugación

Así como la transformación y la transducción por bacteriófagos son mecanismos que no recuerdan en nada el proceso de la recombinación genética de los organismos eucariotas, la conjugación tiene en común con ésta la necesidad del contacto célula a célula.

Para la transferencia de ADN por conjugación se precisa la intervención de un plásmido. Con anterioridad (págs. 27-28) hemos descrito las propiedades generales de los plásmidos; ahora debemos precisar su papel en el proceso de la conjugación. No todos los plásmidos tienen la propiedad de pasar *directamente* de una célula a otra; los que gozan de esta propiedad se denominan plásmidos *autotransferibles*. Estos plásmidos no sólo son capaces de autotransferencia sino

que pueden arrastrar parte del cromosoma bacteriano (incluso la totalidad del mismo) u otros plásmidos; este proceso se conoce con el nombre de *movilización*.

Los plásmidos autotransferibles contienen genes que determinan la aparición de características especiales en la superficie de las células que los poseen; una de las más importantes de dichas características es la aparición de los llamados *pili sexuales*.

> Los pili o fimbrias son pequeños apéndices filiformes, mucho más pequeños que los flagelos, presentes en gran número en algunas especies bacterianas. No todos los pili son iguales pues algunos de ellos, generalmente muy pocos en cada bacteria, poseen características especiales que hacen que se les denomine pili sexuales.

Las bacterias poseedoras de pili sexuales pueden transferir estos plásmidos a otra bacteria; una bacteria actúa como donante (bacteria macho) y otra como aceptora (bacteria hembra). Cuando una bacteria aceptora recibe un plásmido autotransferible adquiere los genes que inducen la aparición en la misma de las propiedades antes señaladas lo que equivale a decir que dicha bacteria pasa de aceptora a dadora, es decir, de hembra a macho. El hecho de que las primeras observaciones de este tipo se realizaran con la cepa de *E. coli* K-12 portadora del plásmido denominado *factor F* (factor de la Fertilidad), hizo que a tales bacterias se las designara F^+ y a las no portadoras F^-, terminología que no tiene aplicación en el caso de los otros plásmidos autotransferibles. Los pili sexuales inducidos por el factor F reciben el nombre de *pili F*.

Mientras que, como acabamos de decir, la bacteria que ha recibido un plásmido autotransferible pasa de bacteria aceptora a bacteria dadora, la bacteria que lo transfiere continúa como bacteria dadora; esto es debido a que la transmisión de estos plásmidos es simultánea a su replicación y ocurre de tal manera que una de las cadenas de ADN pasa a la célula aceptora y la otra permanece en la dadora; en la célula correspondiente cada una de ellas induce la formación de su cadena complementaria (*replicación transferencial*).

Se conoce muy poco acerca de la naturaleza íntima de la unión entre la célula dadora y la célula aceptora. La afirmación de que el paso de material ocurre a través de los pili sexuales no posee validez general. Lo que sí parece evidente es que la célula dadora establece contacto con la aceptora mediante un pilus sexual, a veces mucho más largo que la longitud de la bacteria, a lo que sigue un contacto directo célula a célula, pared contra pared, con paso del ADN por un mecanismo no bien conocido. Esta unión es muy lábil y se rompe con facilidad.

Muy poco después de la penetración de un plásmido autotransferible en una célula aceptora, puede aparecer en la misma un represor de los pili F; el fenómeno no es constante. Los plásmidos que lo inducen son del tipo fi^+ (fi = *fertility inhibition*); cuando la penetración del plásmido no va seguida de la aparición del represor se habla de plásmidos tipo fi^-.

Tras la penetración de un plásmido autotransferible en una célula aceptora puede ocurrir:

1) que persista como tal plásmido, independiente del cromosoma. En este caso cuando pasa a otra célula se transfiere exclusivamente el ADN plasmídico.

2) que se integre en el cromosoma. En condiciones normales esta eventualidad es relativamente poco frecuente (1 de cada 10^5 células por generación). La integración puede ocurrir en cualquier lugar del cromosoma en que exista una estrecha homología en la secuencia de los pares de bases del ADN cromosómico y del plasmídico; en el sistema mejor estudiado, *E. coli* K-12 y factor F, existen 8 ó 10 puntos con tales características. En estas condiciones el plásmido se replica conjuntamente con el ADN cromosómico, es decir, el ADN cromosómico y el plasmídico constituyen un solo replicón.

La célula bacteriana en cuyo cromosoma se ha integrado uno de estos plásmidos y las clonas derivadas de la misma se denominan Hfr (*H*igh *f*requency *r*ecombination).

Si un cultivo de células Hfr se mezcla con un cultivo F^- en condiciones apropiadas, todas las células Hfr se unen a células F^-; la molécula del ADN de las células Hfr se rompe en un punto determinado a nivel del ADN plasmídico, de manera que la cadena queda constituida en primer lugar por ADN plasmídico, a continuación por todo el ADN cromosómico y finalmente por el resto del ADN del plásmido. Inmediatamente se inicia su replicación transferencial, con paso del ADN a la célula aceptora según la polaridad que acabamos de describir.

Como se comprende, en estas condiciones en casi todas las parejas hay paso de ADN *cromosómico;* la cantidad transferida depende del tiempo que persista la conjugación ya que el paso ocurre a una velocidad constante. Teóricamente puede pasar todo el cromosoma bacteriano; esta eventualidad es poco frecuente ya que para ello es preciso que la conjugación se mantenga durante 90 minutos, lo que pocas veces ocurre. Aún es más raro que llegue a pasar la porción del ADN plasmídico situada a continuación del cromosómico.

La transferencia de grandes segmentos del cromosoma bacteriano e, incluso, de su totalidad, es característica de la conjugación; por transformación y por transducción el paso de material cromosómico queda limitado a pequeños fragmentos.

En las células Hfr pueden ocurrir aún las siguientes eventualidades: a) El ADN plasmídico se separa exactamente en los puntos en que se insertó y vuelve a su estado de replicón independiente, libre en el citoplasma. b) Ocasionalmente, al desprenderse el factor F puede arrastrar un pequeño segmento del cromosoma obteniéndose entonces un factor F que incluye algunos genes cromosómicos; recibe el nombre de *genote F* y la célula que lo contiene se denomina F' (F prima). Como se comprende, en estas condiciones se transfiere con el factor F un pequeño número de genes cromosómicos.

FACTORES R

En 1955 Kitamoto, Kasai, Fukaya y Kawashima (78) aislaron en el Japón una cepa de *Shigella* resistente a las sulfamidas, estreptomicina, tetraciclina y cloranfenicol, hecho difícil de comprender ya que las cepas de shigelas aisladas hasta entonces eran sensibles habitualmente a dichos antibióticos y quimioterápicos; sólo excepcionalmente se encontraba alguna cepa resistente a la sulfamida o a la estreptomicina, pero nunca a las cuatro sustancias. A partir de 1956 el aislamiento de shigelas con tal *patrón de multirresistencias* fue en aumento hasta llegar muy pronto a representar más de la mitad de las cepas aisladas.

Como comentan Davies y Round (43), si se tiene en cuenta que de acuerdo con los principios de la genética bacteriana tras *una* mutación sólo se adquiere habitualmente resistencia a *un* antibiótico, resultaba difícil comprender la aparición brusca de cepas con resistencias múltiples.

El estudio detallado de estas cepas de shigela y de su epidemiología permitió descubrir una serie de circunstancias muy especiales que Watanabe (138) ha resumido de la siguiente manera:

1. En el curso de una epidemia de disentería bacilar se aíslan de algunos enfermos cepas de shigela sensibles a todos los antibióticos y de otros cepas, del mismo tipo antigénico, con las resistencias múltiples señaladas.
2. En algunas ocasiones se aíslan simultáneamente de un enfermo una cepa de shigela sensible y una de shigela resistente, ambas del mismo tipo antigénico.
3. La administración de uno de dichos antibióticos a enfermos de los que se aislaban cepas de shigela sensibles a todos, conduce a la excreción de shigelas multirresistentes del mismo tipo antigénico.
4. Muchos de los pacientes de los que se aíslan shigelas multirresistentes albergan también en su intestino cepas de *E. coli* con el mismo tipo de resistencias.

Estas observaciones indujeron a Ochiai, Yamanaka, Kimura y Sawada (104) y Akiba, Koyama, Ishiki, Kimura y Fukushima (2) a suponer que la adquisición por las shigèlas de este tipo de resistencia era debida al paso a las mismas de un factor desde *E. coli* resistentes. Por cultivo mixto en medio líquido de cepas resistentes de *E. coli* y de cepas sensibles de shigela, pudieron demostrar dichos autores la realidad de la transmisión *in vitro* de este tipo de resistencia.

Esta observación condujo a la creación del concepto de *factor R* entendiendo por tal un plásmido portador de información genética determinante de la resistencia a ciertos antibióticos y a las sulfamidas. Con posterioridad, se descubrieron otros muchos plásmidos con propiedades semejantes.

En la práctica se mantiene la designación de *factores R* para los plásmidos transmisores de la resistencia a los antibióticos y quimioterápicos en los bacilos gramnegativos. El descubrimiento en los estafilococos de los plásmidos inductores de la formación de penicilinasa, no transmisibles por conjugación, amplió el con-

cepto. Recientemente se ha introducido (véase: página 29) la expresión *plásmidos R* para todos los plásmidos que inducen la resistencia a los antibióticos y quimioterápicos, tanto si se encuentran en bacterias gramnegativas como grampositivas y si se transmiten por conjugación o por transducción.

Hasta ahora sólo se conoce la existencia de factores R transmisibles por conjugación en bacterias gramnegativas y dentro de éstas alcanza su mayor importancia en la familia de las enterobacteriáceas en las que se ha observado en todos los géneros (*Escherichia, Shigella, Salmonella, Klebsiella, Enterobacter, Yersinia, Serratia* y *Proteus*). También se ha observado en algunas especies de los géneros *Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas, Pasteurella, Haemophilus,* etc.

La transmisión puede ocurrir entre dos cepas de la misma especie, entre dos especies del mismo género y entre dos géneros de la misma familia; existen algunas observaciones de transmisión entre familias diferentes.

Los factores R pueden inducir la aparición de pili *tipo F* (a los que ya nos hemos referido) o la de pili *tipo I* (pili semejantes a los inducidos por los plásmidos que codifican la producción de colicinas).

Transducción de los factores R

Hasta ahora hemos estudiado la transmisión de los factores R mediante el proceso de la conjugación. Existe también la posibilidad de su transmisión por *transducción* mediante bacteriófagos.

Experimentalmente el proceso ha sido muy bien estudiado y se ha podido demostrar que las condiciones en que se realiza difieren considerablemente de un sistema a otro y así, por ejemplo, en estudios de transducción mediante el fago P1 realizados con una cepa de *E. coli* K 12 portadora del factor NR1 fi^+, ocurre con regularidad la transducción del factor completo, mientras que en el sistema *Salmonella typhimurium* LT-2 (portadora también del factor NR1) y fago P22, la transducción es incompleta ya que nunca pasa el gen responsable de la resistencia a la tetraciclina. La transmisión del factor R por transducción, fenómeno del mayor interés teórico, parece ser poco importante desde el punto de vista práctico en los bacilos gramnegativos; recordemos, por el contrario, su gran importancia en el caso de los estafilococos.

CLASIFICACION DE LOS PLASMIDOS

El número de plásmidos R descritos en los bacilos gramnegativos (factores R) es tan amplio y las diferencias entre ellos tan acentuadas que se justifica una clasificación de los mismos. Un primer intento de clasificación basado en el patrón de resistencia que transmiten no se ha mostrado válido ya que pueden presentar el mismo patrón plásmidos muy diferentes en sus características. El método basado en la inhibición de la función de fertilidad del factor F

permite la división de los factores R en los dos grandes grupos fi^+ y fi^- (pág. 57) que, aunque útil, se ha mostrado insuficiente. En la actualidad se considera que el método más adecuado de clasificación es el basado en la *compatibilidad de los plásmidos*. Parte del hecho de que dos plásmidos iguales o muy semejantes no pueden coexistir en la misma célula bacteriana.

Esta «inmunidad a la superinfección» implica la existencia de dos fenómenos distintos. Las bacterias que contienen un plásmido resistente *excluyen* la entrada por conjugación de un segundo plásmido igual o muy parecido, pero no la de plásmidos diferentes; este proceso de exclusión puede vencerse si el segundo plásmido penetra no por conjugación sino por transducción pero en este caso los plásmidos iguales siguen siendo incompatibles, es decir, los dos plásmidos *no pueden replicarse* en la misma célula (139). Por el contrario, los plásmidos compatibles pueden replicarse y coexistir indefinidamente.

De acuerdo con este criterio se ha establecido una serie de *grupos de compatibilidad* que han conducido a una clasificación que se ha mostrado muy útil. Recientemente Datta (en «Microbiology - 1974». Págs. 9-15. Amer. Soc. Microbiology, Washington, 1975) aplicando este criterio a los factores R transmisibles por conjugación a *E. coli* K-12, ha establecido 19 grupos de compatibilidad. Los cinco primeros grupos, FI, FII, FIII, FIV y FV, se basan en la capacidad del plásmido de inducir la aparición de pili F; otros cinco grupos, Iα, Iβ, Iγ, Iω, Iζ, se caracterizan por inducir la aparición de pili I. A continuación vienen los grupos N, O, H, P, W, C, A, M y T en los que se tienen en cuenta otras características para su clasificación.

El valor de esta clasificación, aparte de su extraordinaria importancia desde el punto de vista teórico, se pone de manifiesto en estudios epidemiológicos. Un buen ejemplo nos lo aporta el estudio del brote epidémico de fiebre tifoidea ocurrido en México, en 1972, por *S. typhi* resistente al cloranfenicol. Las cepas de *S. typhi* aisladas en el curso de dicha epidemia contienen un factor R que confiere la resistencia al cloranfenicol, estreptomicina, tetraciclinas y sulfamidas. La circunstancia de que simultáneamente hubiera en Centroamérica, desde México a Costa Rica, una grave epidemia de disentería bacilar por una cepa de *Sh. dysenteriae* tipo I portadora de un plásmido con el mismo patrón de multirresistencia, hizo pensar en la identidad de origen de ambos plásmidos y, por ende, de ambos brotes epidémicos. El hecho de que el plásmido aislado de *S. typhi* pertenezca al grupo de compatibilidad H y el aislado de *Sh. dysenteriae* al grupo O, obliga a rechazar por errónea dicha interpretación (41).

ADQUISICION DE RESISTENCIA POR CONJUGACION

La adquisición de resistencia bacteriana a los antibióticos por conjugación es un fenómeno al que se concede desde el punto de vista práctico una importancia extraordinaria.

Al exponer las generalidades sobre conjugación y sobre los factores R nos hemos referido ya al hallazgo en 1955 en el Japón (78) de cepas de *Shigella* multiresistentes a los antibióticos y hemos mencionado las observaciones de Ochiai y colaboradores (104) y Akiba y colaboradores (2 y 3) relativas a la transmisión *in vitro* de dicho tipo de multirresistencia desde cepas de *E. coli* resistentes a cepas sensibles de *Shigella*.

La literatura sobre la *transmisión in vitro* es abundantísima y ha sido revisada en diferentes ocasiones por Watanabe (138), (140), (141) y otros.

Aquí sólo nos interesa señalar que Nakaya, Nakamura y Murata (98), y Harada y colaboradores (98), consiguieron la transferencia de esta multirresistencia entre los diferentes géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y Baron y Falkow entre dos bacterias tan alejadas taxonómicamente como *S. typhi* y *V. cholerae*.

En España se han ocupado de este problema Moreno López, Dámaso, Perea, Marco y Manchado (97) quienes estudiaron 106 cepas de *E. coli* obtenidas de diferentes productos patológicos. Estas cepas son resistentes a uno o más de los siguientes antibióticos: tetraciclina, cloranfenicol, estreptomicina, ampicilina y kanamicina. El 67,9 % de ellas pueden transferir toda o parte de su resistencia. Este índice de transferencia concuerda con los de los diferentes autores que se han ocupado en este tema, los que consiguen promedios de transmisión que oscilan entre el 53 y el 90 %.

También se ha logrado la *transmisión in vivo* del factor R. Los primeros resultados positivos se deben a Kagiwada y colaboradores (76) y Akiba y colaboradores (4), quienes en el intestino de voluntarios humanos consiguieron la transmisión desde *E. coli* resistente a *Shigella* sensible. Resultados similares han sido obtenidos por Mitsuhashi y colaboradores (55) en perros y por Akiba y colaboradores (55) en ratones. Más adelante nos ocuparemos *in extenso* en el estudio de tan importante aspecto de este problema.

El descubrimiento del factor R en el Japón fue seguido muy pronto por el aislamiento en numerosos países de cepas de shigela con el mismo patrón de multiresistencia. Lebeck en Suiza (80), Guinée en Holanda (64), Smith y Armour en Estados Unidos (122), Datta en Inglaterra (40), etc. y, posteriormente, numerosos investigadores en otros muchos países, hicieron observaciones semejantes a las iniciales de los autores japoneses.

También muy pronto se describieron en numerosas especies de bacilos gramnegativos nuevos factores R con patrones de resistencia y otras características diferentes a las del factor R descrito en el Japón por Kitamoto y colaboradores (78).

Además de haberse demostrado la amplia *difusión geográfica* de los factores R, prácticamente universal, su *difusión* en otro sentido es muy superior a lo que inicialmente se había supuesto. Podemos señalar los puntos siguientes:

1) Los factores R no sólo se encuentran en shigelas y *E. coli*, sino en todas las enterobacteriáceas en general y en algunas otras familias bacterianas. Las primeras observaciones se realizaron en shigelas, *E. coli* y *S. typhimurium* pero, según

Watanabe, ya en 1963 se había demostrado la existencia de factores R en todos los géneros de la familia *Enterobacteriaceae.*

También se ha demostrado por Baron y Falkow (20) la posibilidad de su transmisión a *Vibrio cholerae* y por Ginoza y Matney (60) a *Yersinia pestis* y *Y. pseudotuberculosis.* (En aquella época el género *Yersinia* no estaba incluido entre las enterobacteriáceas.) En una excelente revisión de Falkow (50) se añaden a esta lista *Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila, Alcaligenes faecalis,* etc. Burt y Woods (29) han logrado la transmisión desde *E. coli* a *Bacteroides fragilis, Fusobacterium* spp. y a otros bacilos gramnegativos no esporulados *anaerobios.*

Es interesante señalar que todas las bacterias que acabamos de mencionar son gramnegativas. Los intentos de transmitir *por conjugación* los factores R a las bacterias grampositivas han fracasado (Watanabe, 141).

2) No sólo se aíslan de pacientes hospitalizados sino también de pacientes domiciliarios y de individuos sanos.

3) Se han encontrado factores R transmisibles por conjugación en cepas bacterianas aisladas antes del empleo terapéutico o del descubrimiento de los antibióticos a que son resistentes. Posee un valor categórico en este aspecto la demostración por Smith (121) de la presencia de factores R en cepas de *E. coli* aisladas en 1946 y mantenidas liofilizadas.

4) Igualmente se han encontrado en individuos pertenecientes a comunidades aisladas y en los que puede excluirse todo contacto con antibióticos. Watanabe sugirió esta línea de estudio en 1966 al plantearse el problema de si los factores R se habían originado por acción de los antibióticos o independientemente de los mismos. Los informes publicados tienden a demostrar la existencia de bacterias portadoras de factores R en comunidades «vírgenes» de todo contacto con antibióticos.

Los resultados de Mare (91) no son concluyentes. El estudio de las muestras de heces de 47 bosquimanos y de 334 animales salvajes (de diversas especies) del Parque Nacional Kruger, en Rodesia, le permitió demostrar la presencia de bacterias gramnegativas resistentes a los antibióticos, muchas de ellas con resistencias múltiples, en el 10 % de las muestras estudiadas pero en ninguna de tales cepas se pudo demostrar la existencia de factores R.

Son, por el contrario, demostrativas las dos observaciones siguientes: Gardner, Smith y Beer (58) al estudiar 21 muestras de heces de indígenas de las islas Salomón y varias muestras de tierra de dichas islas encuentran dos cepas de bacilos gramnegativos portadoras de factores R; una procedía de una muestra de heces y la otra del suelo. Ambas contenían los genes responsables de la resistencia a la estreptomicina y tetraciclinas.

Davis y Anandan (44) aislaron 6 cepas de *E. coli* con factores R de las heces de 128 indígenas del norte de Borneo. Dos de estos factores transmitían la resis-

tencia a las sulfamidas, estreptomicina, cloranfenicol y tetraciclina, es decir, transmitían el mismo tipo de multirresistencia que el primer factor identificado por Kitamoto y colaboradores (78) en 1956.

Las observaciones reunidas en los epígrafes 3 y 4, a las que podemos añadir la existencia de factores R que transmiten la resistencia a antibióticos que ni se utilizan ni se han utilizado, han llevado a la conclusión de que los factores R existían ya antes de la era antibiótica. La mayor frecuencia con que pueden demostrarse en la actualidad, es decir, el aumento considerable de bacterias, patógenas o no patógenas, portadoras de factores R, se debe a la selección y posterior diseminación de las mismas.

Pero en este caso además de la selección hay que contar con la *transmisión* del factor R, por conjugación, de las células bacterianas que lo contienen a las sensibles, que carecen de él. Recordemos que la transmisión de los factores R puede ocurrir entre cepas de la misma especie, entre especies del mismo género, entre géneros de la misma familia y, aunque con menos frecuencia, entre especies de diferentes familias. Esta relativa inespecificidad del proceso de la conjugación puede contribuir también al aumento de las cepas resistentes. Tan rápida difusión de los factores R ha hecho que a este proceso se le denomine *herencia infecciosa* o *resistencia infecciosa* en las bacterias.

5) Otra prueba de la gran difusión de los factores R en la naturaleza es el hallazgo de bacterias R^+ en los animales domésticos, en especial en los sometidos a una dieta adicionada de antibióticos. En estos animales la frecuencia con que se aíslan cepas R^+, en especial del contenido intestinal, puede ser muy próxima al 100 %. Se ha llamado la atención sobre la posibilidad de que estas cepas animales R^+ puedan contribuir a la difusión de los factores R en el hombre.

Una revisión de este problema, muy documentada y muy bien razonada, es la de Anderson (5).

EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIOTICOS EN LAS ENTEROBACTERIACEAS

a) *Género Shigella*

A partir de la observación inicial de Kitamoto y colaboradores (78), el aislamiento en el Japón de cepas de shigela resistentes a las sulfamidas, estreptomicina, terramicina y cloranfenicol o alguna (o algunas) de dichas sustancias aumentó rápidamente hasta el punto de que en 1965 eran resistentes el 58 % de las cepas estudiadas. El 85 % de éstas poseían factores R transmisibles.

En 1966 y 1967 la proporción de cepas resistentes había pasado al 92 % y la

posibilidad de la transmisión por conjugación se podía demostrar en la mitad de ellas aproximadamente (Tanaka y colaboradores) (129).

También en otros países se ha obversado este comportamiento en las shigelas, si bien las estadísticas correspondientes no son tan numerosas ni tan amplias como las japonesas. Cohen (34), en 1969, encontró en Estados Unidos que el 44 % de las shigelas por él estudiadas eran resistentes a un agente y el 34 % a dos o más. Aunque no se investigó la capacidad de transferencia por conjugación del factor R, se dedujo que la proporción de cepas con dicha propiedad era semejante a la encontrada por los autores japoneses.

b) *Género* Salmonella

También en el género *Salmonella* se ha producido un aumento considerable en la resistencia a los antibióticos, aunque no se ha alcanzado en ningún país un grado de resistencia equiparable, a la ocurrida en el género *Shigella* en el Japón.

No todas las especies del género *Salmonella* se comportan de la misma manera; la mayor facilidad para la adquisición de resistencia se observa en *S. typhimurium* y *S. panama.* Según Cohen (34), de 400 cepas de diferentes especies de salmonelas procedentes de los más diversos puntos de Estados Unidos, el 15 % fueron resistentes a dos o más antibióticos, mientras que entre las cepas de *S. typhimurium* la proporción de resistentes era del 41 %. Del 80 % de estas cepas era posible la transferencia de la resistencia a *E. coli.*

En el curso de un brote de gastroenteritis por *S. typhimurium* se pudo hacer la observación, muy importante, del papel decisivo del tratamiento con antibióticos como factor favorecedor de la difusión del factor R. Aserkoff y Bennett (10) estudiaron un brote de gastroenteritis por *S. typhimurium,* originado por la ingesta de bocadillos de pavo, que afectó a 1.900 personas. Las cepas de salmonela aisladas de las sobras de la comida eran sensibles a todos los antibióticos ensayados (estreptomicina, sulfatiazol, ampicilina, tetraciclina, kanamicina, neomicina, colistina y cloranfenicol).

Se obtuvieron cultivos positivos de 272 pacientes tratados de la siguiente manera:

87 no tratados con antibióticos
97 tratados con cloranfenicol
48 tratados con ampicilina
40 habían recibido diversos tratamientos no específicos

Mientras que de los 185 enfermos tratados se obtuvieron 18 cepas de *S. typhimurium* resistentes a uno o más de los compuestos ensayados, de los 87 no tratados no se aisló ninguna cepa resistente.

Referente a la evolución de la resistencia de las salmonelas a los antibióticos es de importancia decisiva el trabajo de Manten, Guinée, Kampelmacher y Voogd (88), basado en el estudio de la sensibilidad al cloranfenicol, ampicilina y tetraciclina de 123.070 cepas de salmonelas aisladas en Holanda desde 1959 a 1969. Dichos autores confirman plenamente el hecho de que la adquisición de resistencia es mucho más frecuente en *S. typhimurium* y *S. panama* que en el resto de las salmonelas.

S. typhimurium adquiere con facilidad la resistencia a la tetraciclina; se alcanza la proporción máxima de cepas resistentes en 1966. En dicho año se estudiaron 3.346 cepas de *S. typhimurium* de las que el 40,4 % resultaron resistentes a la tetraciclina, 0,1 % a la tetraciclina y cloranfenicol, 18,4 % a la tetraciclina y ampicilina y 0,7 % a la tetraciclina, cloranfenicol y ampicilina lo que hace un total de 59,6 % de cepas resistentes a la tetraciclina, sola o asociada a uno u otro de los antibióticos. A partir del año 1966 tiende a disminuir la frecuencia de cepas resistentes para, en el año 1969, situarse en el 39,3 %.

La resistencia al cloranfenicol es siempre mucho menor; las cifras más elevadas se alcanzan en 1963, con un 2,66 % de las cepas resistentes al cloranfenicol o al cloranfenicol más tetraciclina. La proporción disminuye a partir de dicho año y en 1969 las cepas resistentes representan sólo el 0,7 %.

Las cepas de *S. panama* se comportan de manera parecida, aunque con menor tendencia a disminuir las cepas resistentes.

Tanto en *S. typhimurium* como en *S. panama* la proporción de cepas resistentes a la ampicilina ocupa una posición intermedia entre las resistentes a la tetraciclina y al cloranfenicol y, como con los otros antibióticos, en *S. panama* la disminución de la resistencia a partir del año 1965-1966 no es tan notable como en el caso de *S. typhimurium*.

Desde el punto de vista práctico una de las conclusiones más interesantes de este trabajo es la escasa proporción de cepas de salmonelas resistentes al cloranfenicol, inferior al de las resistentes a la ampicilina y muy inferior a las resistentes a las tetraciclinas. Este hecho se ha interpretado como consecuencia de la facilidad con que las salmonelas pierden específicamente este tipo de resistencia. Este fenómeno es mucho más frecuente en las salmonelas que en *E. coli* y es mucho más frecuente referido al cloranfenicol que a la tetraciclina.

c) *Caso especial de* Salmonella typhi

A pesar de que esporádicamente se ha publicado el hallazgo de cepas de *S. typhi* resistentes al cloranfenicol, esta eventualidad era tan poco frecuente que hasta 1972 no había planteado problemas importantes en la práctica médica (véase Ramanarayana y colaboradores) (113).

En el trabajo de Manten y colaboradores (88) que acabamos de comentar, los datos relativos a *S. typhi* confirman la rareza de cepas resistentes al cloranfenicol;

de las 160 examinadas sólo 3 (0,5 %) eran resistentes. Dos de ellas lo eran al mismo tiempo a la tetraciclina.

Pero en 1972 aparecieron algunas publicaciones en las que se describe el aislamiento a partir de enfermos de tifoidea de cepas de *S. typhi* resistentes al cloranfenicol.

Vázquez, Calderón y Rodríguez (133) estudiaron un brote de fiebre tifoidea en México en el que de 38 enfermos aislaron 32 cepas de *S. typhi*. A diferencia del año 1971, en que todas las cepas de *S. typhi* aisladas por dichos autores fueron sensibles al cloranfenicol, 26 de las 28 cepas estudiadas del brote de 1972 eran resistentes al cloranfenicol, tetraciclina, sulfamidas y estreptomicina.

De acuerdo con esta resistencia, el curso clínico de la enfermedad tratada con cloranfenicol, fue más prolongado y las complicaciones mucho más frecuentes y graves que en años anteriores.

Se supuso que la resistencia de estas cepas de *S. typhi* pudo haber sido adquirida mediante un plásmido. Se apoyaron para ello en la observación de Olarte y Galindo (105), autores que habían demostrado en México la presencia en diferentes especies de salmonelas, entre las que no se incluía *S. typhi*, de un plásmido que inducía resistencia a la tetraciclina, cloranfenicol y estreptomicina.

Poco después se señalaron en Estados Unidos dos casos de tifoidea con aislamiento de *S. typhi* resistente al cloranfenicol; los dos pacientes se habían contagiado en México.

Gangarosa, Bennett, Wyatt, Pierce, Olarte, Mendoza-Hernández, Vázquez y Bessudo (57), demostraron que las cepas de *S. typhi* aisladas en diferentes lugares de México, resistentes al cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina y sulfamidas, eran portadores de un factor R condicionante de este tipo de resistencia. En experiencias *in vitro* consiguieron la transmisión de dicho factor R desde *S. typhi* a una cepa receptora de *E. coli*.

En un trabajo posterior de Olarte y Galindo (106) se exponen las características de la epidemia originada por esta cepa de *S. typhi*. El brote empezó bruscamente en febrero de 1972 y afectó de manera principal a la ciudad de México y a Pachuca, con focos en otras regiones de México.

Según los datos aún incompletos publicados por Olarte y Galindo, se observaron más de 10.000 casos de fiebre tifoidea; la epidemia se caracterizó por su rápida difusión, por el gran número de personas afectadas y por estar producida por una cepa de *S. typhi* resistente *in vivo* e *in vitro* al cloranfenicol. El 92 % de las cepas aisladas eran resistentes al cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina y sulfamidas y sensibles a la ampicilina, cefalotina, colistina y gentamicina. En el curso de la epidemia se aislaron siete cepas de *S. typhi* que, además de ser resistentes al cloranfenicol lo eran también a la ampicilina.

Independientemente, Paniker y Vimala (108), en Gerala (India), hicieron una observación semejante. En mayo de 1972 aislaron 13 cepas de *S. typhi* de la sangre de enfermos de fiebre tifoidea. Siete de ellas eran resistentes al cloranfenicol, tetraciclina y estreptomicina con CIM de 500, 250 y 50 mcg/ml, respectivamente. Todas

las cepas, por el contrario, eran sensibles a la ampicilina. De las 7 cepas resistentes se consiguió la transmisión de la resistencia, por conjugación *in vitro*, a una mutante de *E. coli* K-12.

En el mismo año, se aislaron en Vietnam cepas de *S. typhi* resistentes al cloranfenicol. Butler, Linh, Arnold y Pollack (30) encontraron cuatro cepas resistentes entre ocho estudiadas, resistencia que alcanzaba también a la estreptomicina, tetraciclina y sulfodiacina.

Brown, Mo y Rhoades (26), también en Vietnam, encontraron un 46 % de cepas resistentes entre las 163 estudiadas.

Los trabajos que acabamos de resumir aportan la prueba de que *S. typhi* puede hacerse resistente *in vivo* al cloranfenicol por la adquisición de un factor R.

La importancia de esta observación es extraordinaria. En todas estas publicaciones se destaca el hecho de que en los enfermos de los que aislaron cepas de *S. typhi* resistentes, el tratamiento con cloranfenicol fue ineficaz y, consecuencia de ello, la evolución de la enfermedad mucho más grave.

Es difícil predecir si se seguirán aislando cepas de *S. typhi* resistentes al cloranfenicol y, en caso afirmativo, sí aumentará la difusión proporción de las mismas, pero es indudable que, de momento, tenemos que revisar nuestro criterio de tratar a todos los enfermos de tifoidea con cloranfenicol sin necesidad de estudiar previamente la sensibilidad a dicho antibiótico de la cepa responsable.

d) *Escherichia coli*

Si bien el hallazgo de cepas de *E. coli* portadoras de factores R siguió inmediatamente al de la demostración de dicho factor en las shigelas, la amplia difusión del factor R entre las cepas de *E. coli* aisladas de productos patológicos no se puso de manifiesto hasta la publicación de Smith y Armour en 1966 (122). A partir de dicha fecha han aparecido numerosos trabajos en los que se llega a la misma conclusión. Cohen calcula que por lo menos el 80 % de las cepas de enterobacteriáceas aisladas de productos patológicos humanos deben su resistencia a los antibióticos a la presencia de factores R.

El trabajo de Moreno-López y colaboradores (97) mencionado anteriormente confirma estas observaciones; el 70 % de sus cepas de *E. coli* multirresistentes son capaces de transferir un factor R.

Un ejemplo en el que se demuestran las graves consecuencias prácticas de esta difusión de cepas de *E. coli* multirresistentes, lo aportan los colibacilos productores de la gastroenteritis epidémica del lactante. En un brote de esta enfermedad citado por Franklin y Snow (56), se aisló una cepa de *E. coli* enteropatógeno, resistente a la penicilina, estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, neomicina, novobiocina, cloxacilina y ampicilina; el único antibiótico de entre todos los ensayados al que la cepa era sensible era la gentamicina.

Pero no sólo los colibacilos aislados de productos patológicos son portadores

de factores R. Hemos mencionado en repetidas ocasiones el hallazgo en el intestino de individuos sanos o afectos de diferentes procesos de cepas de *E. coli* R^+. Estas cepas representan un peligro potencial ya que pueden transmitir su resistencia a otras bacterias patógenas o no patógenas que coincidan con ellas en el intestino. Este mecanismo fue demostrado por los autores japoneses en el caso de la transmisión a shigelas y es muy probable que haya ocurrido así en la transmisión de la multirresistencia a *S. typhi* [Vázquez y col., (133), Gangarosa y col. (57) y Paniker y Vimala (108)].

Sin embargo, y como ya hemos señalado, la transmisión de los factores R *in vivo* está influida por factores mal conocidos que limitan la receptividad de las cepas no resistentes. Quizás esto explique el hecho de que en determinados ambientes no aumente la frecuencia de cepas de enterobacteriáceas multirresistentes y que en algunos incluso muestre una tendencia a disminuir. Según Cohen (34), entre 1964 y 1969 apenas se ha modificado la proporción de cepas resistentes de *Shigella, Salmonella, E. coli, Klebsiella* y *Enterobacter* aisladas en su Servicio a partir de productos patológicos y, más aún, Bulger, Larson y Sherris (28) han registrado una disminución de sus cepas multirresistentes de *E. coli* y *Klebsiella-Enterobacter.*

e) *Apéndice. La resistencia en* H. influenzae

El descubrimiento de la existencia de cepas de *H. influenzae* resistentes a la ampicilina por producir una beta-lactamasa, indujo al estudio del mecanismo de dicha resistencia. Sykes, Matthew y O'Callaghan (127) han conseguido la transmisión de un plásmido, por conjugación, desde la cepa de *H. influenzae* portadora a cepas de *H. parainfluenzae* y de *E. coli.*

Señalemos la importancia creciente en patología humana de las cepas de *H. influenzae* productoras de beta-lactamasa (130).

V. TRANSMISION DE LA RESISTENCIA PLASMIDICA A LOS ANTIBIOTICOS IN VIVO

Después de haber expuesto los mecanismos de la mutación bacteriana y de los diferentes tipos de recombinación genética, su papel en la adquisición de resistencia a los antibióticos y algunos ejemplos prácticos que demuestran su importancia para la adquisición de resistencia por muchas especies bacterianas, podría deducirse que nuestros conocimientos sobre estos procesos y la facilidad con que ocurren son tan precisos y detallados que hay muy pocos aspectos de los mismos que nos sean desconocidos.

En realidad, en todo cuanto se refiere a la naturaleza y características de los plásmidos y a los procesos de recombinación genética en las bacterias en su aspecto experimental, nuestros conocimientos son muy amplios.

No podemos decir lo mismo sobre el desarrollo de dichos procesos *in vivo*, es decir, en el hábitat natural de los microorganismos afectados. A pesar de que la bibliografía sobre el tema es bastante amplia, son muy numerosos los puntos oscuros en tan complejo problema. Como base para nuestra labor utilizaremos una publicación muy bien documentada, escrita con un sentido crítico que la valora extraordinariamente y rica en datos personales; nos referimos a la revisión publicada en 1975 por Baquero, Martínez Ferrer y Carvajal (13). Añadiremos algunos datos tomados de los breves capítulos que le dedican Mihich (94) y Falkow (50) en sus monografías y de algunas publicaciones no incluidas en ellas.

Al comienzo de su revisión, Baquero y sus colaboradores destacan el hecho de que aunque los datos que nos aporta el estudio de la biología celular y molecular constituyen la base imprescindible para el conocimiento de la bacteria, no bastan por sí solos para explicarnos el funcionalismo bacteriano en su hábitat natural. Confirma esta postura la observación que acabamos de mencionar de que aunque los conocimientos relativos a las bases celulares y moleculares de la transferencia plasmídica en las bacterias se encuentran en un grado muy avanzado de desarrollo, nuestros conocimientos acerca la transferencia plasmídica en la naturaleza son escasos e incompletos. La relativa facilidad con que experimentalmente se consigue transferir plásmidos *in vitro*, contrasta con las dificultades para reproducir el mismo fenómeno *in vivo*, hecho que se menciona ya en la primera revisión de Watanabe (138) en la que figura la frase de que «es más fácil la transmisión de resistencia *in vitro* que *in vivo*». Frases similares tales como: «curiosamente, el fenómeno de la adquisición de resistencia *in vitro* raramente se produce *in vivo*» (48); «las situaciones clínicas en las que se ha demostrado una transferencia *in vivo son raras*» (Chabbert) (38); «no está claro cómo ocurre la transmisión de resistencia entre enterobacteriáceas en el medio natural» (Meynell) (93); «existen pruebas de que la transferencia no ocurre *in vivo* en tan gran escala como *in vitro*» (Falkow) (50); etc., confirman la realidad de este hecho.

Y sin embargo, la importancia de la transferencia *in vivo* es clara porque, como dice Watanabe en una revisión posterior (142): «Es verdad que la transferencia de factores R *in vivo* no ocurre tan fácilmente como *in vitro*, pero los factores R pueden ser, aun cuando con baja frecuencia, transferidos *in vivo* y aparecer en bacterias patógenas que infectan al hombre y a los animales.» Recordemos que en la literatura en lengua inglesa se habla con frecuencia de «infectious multiple drugs resistance». Mihich (1973) (94) destaca que «la difusión de la resistencia infecciosa a las drogas alcanza, en ocasiones, proporciones epidémicas».

Los ensayos para el estudio de la transmisión *in vivo* de los plásmidos R son bastante numerosos; en la mayoría de ellos se administran a animales o a voluntarios humanos, por vía oral, suspensiones de bacterias vivas correspondientes a serotipos bien estudiados y con espectros de resistencias múltiples bien conocidos, que *in vitro* transfieren el plásmido fácilmente, por conjugación, a cepas de la misma o de otras especies.

En las experiencias *in vivo*, con frecuencia no se consigue demostrar en el

contenido intestinal la transferencia entre bacterias de la misma especie (o de otras especies) o se consigue una transferencia sólo en algunos casos y la mayoría de las veces no perdurable. Esta dificultad en la transferencia explica la posibilidad de la convivencia en el contenido intestinal de una persona determinada de microorganismos de la misma especie resistentes (por la presencia de plásmidos) y sensibles.

Es lógico plantear este problema en relación con las condiciones ecológicas del hábitat natural de las especies bacterianas en juego. El estudio de estas condiciones ecológicas puede hacernos comprender la complejidad de estos hechos. Vamos a hacer un esbozo de los mismos limitado al caso de la conjugación en el intestino con transferencia de plásmidos R.

En la revisión de Baquero y colaboradores a la que antes nos hemos referido se reúnen datos muy amplios y sistematizados, relativos a los muy diversos factores que deben tenerse en cuenta. Los podemos dividir en dos grupos: los relativos a los microorganismos conjugantes y los correspondientes al medio en el que se realiza la conjugación.

> Referente a otros ambientes naturales la literatura es aún más escasa; citemos como ejemplo la observación de Neu, Huber y Winshell (101) referente a un caso de transmisión de resistencia desde *E. coli* a *Pr. mirabilis* en la orina de un enfermo con una obstrucción incompleta de uréter.

a) *Factores relativos a los microorganismos conjugantes*

Hay que considerar en primer lugar el hecho de que en el intestino humano existe una flora abundantísima y extraordinariamente heterogénea, con un predominio considerable de la flora anaerobia, que en diversos segmentos del tubo digestivo representa hasta el 98 % de la flora bacteriana. No olvidemos que una gran parte de nuestros conocimientos sobre la transferencia plasmídica por conjugación se ha obtenido mediante estudios realizados con *E. coli*, microorganismo aerobio (anaerobio facultativo), *in vitro* y con mezclas de cultivos puros.

Es obvio que las condiciones en las que se ha de realizar *in vivo* la conjugación con transferencia de factores R difieren amplísimamente de las condiciones de la experimentación *in vitro*. Hemos de tener en cuenta que si no se alcanza una concentración mínima superior a 10^5 microorganismos conjugantes por ml, la conjugación resulta muy difícil; se ha de tratar, además, de microorganismos implantados y en estado de multiplicación libre. Juega también un papel importante la velocidad de multiplicación bacteriana, mucho más lenta en el contenido intestinal que en el tubo de cultivo. La fase del crecimiento bacteriano es otro factor importante; es sabido que la conjugación encuentra su momento óptimo en la fase preestacionaria del desarrollo exponencial, fase difícil de alcanzar en condiciones nor-

males por los componentes de la flora intestinal, que pocas veces llegan a un verdadero desarrollo exponencial.

> La conjugación presupone el contacto entre célula donante y aceptora por lo que representa un obstáculo para la misma cualquier condición que dificulte el contacto entre célula y célula; su localización en territorios «exclusivos», la situación en espacios subepiteliales, etc., dificultan considerablemente, o impiden, el proceso de la conjugación.

Una observación muy interesante es la de que las células bacterianas de cultivos en «fase rugosa» («R») son mucho más sensibles para la adquisición de plásmidos R. Es curioso que cuando se observó por primera vez este hecho se interpretó como si la adquisición del factor R indujera el paso de la bacteria de la fase S a la fase «R»; la realidad es que se trata de una selección de la población «R» contenida inicialmente en la cepa S y seleccionada por su mayor resistencia a los antibióticos como consecuencia de haber recibido un plásmido R. Recordemos que entre los bacilos gramnegativos las cepas en fase rugosa se caracterizan por una pérdida considerable de su virulencia; en este caso la adquisición de un plásmido que la convierte en resistente a unos determinados antibióticos, ayuda a la selección de las cepas poco virulentas.

La transferencia plasmídica presupone que la bacteria donante es capaz de interrelacionarse específicamente con la bacteria aceptora y de que el plásmido transferido es aceptado por esta última y es genéticamente estable en la misma. Es muy probable que en el contenido intestinal se puedan establecer relaciones transferenciales entre todas las enterobacteriáceas así como entre éstas y determinados componentes de los géneros *Pseudomonas, Acinetobacter* y *Alcaligenes.*

El hecho de que en la cavidad intestinal sean muy numerosas las bacterias portadoras de plásmidos R y, probablemente, de plásmidos crípticos, puede dificultar la transferencia de otros plásmidos R por una posible incompatibilidad con el que ya contiene la bacteria.

Se ignora la influencia que puede desempeñar en el proceso de la conjugación el que el plásmido a transferir se encuentre en estado de represión o desreprimido así como la coexistencia con bacterias portadoras de factores autotransferibles que pueden vehicular plásmidos no autotransferibles.

b) *Factores relativos al hábitat intestinal*

Parece evidente que las condiciones anaerobias características del tubo intestinal dificultan considerablemente el proceso de la conjugación.

Otro factor a tener en cuenta es la existencia habitual en el intestino de sustancias que obstaculizan el proceso de la conjugación. Según observaciones de Wiedemann (147), el ácido desoxicólico puede disminuir hasta 1.000 veces la frecuencia de la transferencia de los factores R. Esta, y una amplia serie de observaciones similares, encajan con la afirmación de Meynell (93) de que «los organis-

mos con factores R, especialmente los desreprimidos, son más sensibles a la muerte por agentes como las sales biliares».

De la misma manera, considera que la urea puede ejercer una toxicidad selectiva sobre las células R^+, similar a la señalada para el desoxicolato. También se ha señalado una acción inhibidora de las protaminas e histonas.

Se concede también gran importancia a la marcada interferencia consecutiva a la presencia de ciertos metabolitos bacterianos y de restos celulares bacterianos. Es sabido que en determinadas zonas del intestino la cantidad de restos celulares bacterianos es considerable.

Baquero, Martínez Ferrer y Carvajal (13) han estudiado experimentalmente, *in vitro,* el papel ejercido por la presencia de restos celulares (bacterias muertas por calentamiento al autoclave) en el medio y han observado una importante reducción en la frecuencia de la transferencia plasmídica en los medios adicionados de *S. typhimurium* (isogénica de la bacteria aceptora) y de *S. enteritidis.* La adición de cuerpos bacterianos muertos de *E. coli* K-12, cepa isogénica con la bacteria dadora, no influye sobre el proceso de la transferencia.

> Cabía pensar que el componente bacteriano responsable de la reducción de la frecuencia de transferencia fuera el lipopolisacárido constituyente de la superficie de la pared bacteriana, lo que indujo a Baquero y colaboradores (13) a repetir los ensayos anteriores con esta fracción lipopolisacárida separada de la bacteria, consiguiendo demostrar que, efectivamente, el lipopolisacárido inhibe la transferencia plasmídica *in vitro.*
>
> Es posible que exista alguna relación entre la disminución de la frecuencia de la transferencia en las condiciones experimentales que acabamos de resumir con la que se observa tras la adición al medio de heces autoclavadas.

Era lógico estudiar la influencia sobre la transferencia plasmídica de la presencia en el medio de anticuerpos antibacteria-receptora. Experiencias de Baquero, Martínez-Ferrer, Cañedo, Salesa y Carvajal (12) han demostrado que en estas condiciones ocurre una importante disminución en la frecuencia de la transmisión. El hecho de que no se observe una disminución semejante por adición de globulina gamma normal o de albúmina humana indica que no se trata de un fenómeno inespecífico. La inhibición de la transmisión genética por acción de los anticuerpos anti-pili representa un caso particular.

Parece evidente que las interrelaciones bacterianas en un ámbito microbiológicamente tan complejo como el contenido intestinal han de influir en el proceso de la transferencia plasmídica entre los componentes del sistèma; desgraciadamente, apenas se ha iniciado el estudio de este problema.

La observación de Anderson (J. med. Microb., 1975, 8/1, 83-88) de que la transmisión *in vitro* de plásmidos R entre cepas de *E. coli* se inhibe completamente en presencia de una suspensión muy densa de *B. fragilis,* sugiere que más

que las condiciones anaerobias características del intestino puede desarrollar un papel importante como antagonista de la transferencia de los plásmidos en dicho ambiente la extraordinaria concentración en el mismo de microorganismos del género *Bacteroides.*

c) *Estabilidad de los plásmidos R en el intestino*

Con mucha frecuencia, las células bacterianas portadoras de plásmidos R que forman parte de la flora intestinal desaparecen espontáneamente; persisten más cuando están sometidas a la presión selectiva de antibióticos, es decir, en presencia de antibióticos que no actúan sobre ellas y sí sobre el resto de la flora intestinal. Habitualmente, la intensidad de la transferencia de los factores R es tan baja que sólo se hace manifiesta de manera patente por la fuerza selectiva de los antibióticos. Sin embargo, ésta no es una norma general y hay observaciones de persistencia durante largos períodos en condiciones que podemos considerar normales. Hay motivos para suponer que esta desaparición es debida más que a la pérdida del factor R por las células portadoras del mismo a la desaparición de éstas, hecho favorecido por su menor vitalidad.

> Se acepta que son muchísimos los factores que pueden intervenir en este proceso de desaparición de las bacterias portadoras de plásmidos R pero es relativamente poco lo que se conoce con precisión acerca de los mismos. Se estudia el papel que pueden desempeñar determinados fagos presentes en el contenido intestinal; hay motivos para creer que la urea y la bilis favorecen la pérdida de los plásmidos, etc. En la revisión de Baquero y colaboradores (12) aparecen observaciones del mayor interés sobre tan complejo problema.

El último punto que vamos a tratar en relación con la transmisión de la resistencia plasmídica *in vivo* es el de la «dispersión epidémica de plásmidos R a partir del intestino humano». Ya hemos comentado la existencia de algunas condiciones que limitan la difusión de las células portadoras de plásmidos R, en especial el hecho de que éstos son transferidos de manera preferente a células «rugosas», generalmente de baja virulencia. Hay que señalar, sin embargo, el hecho de que en otras células portadoras de plásmidos R no sólo no ha disminuido su virulencia sino que ha aumentado, creándose cepas que han conseguido una difusión prácticamente universal.

En los últimos años empiezan a conocerse algunas de las características que favorecen la dispersión de estas bacterias. No podemos ocuparnos en el estudio de los mecanismos íntimos, conocidos o sugeridos, para explicar estos hechos; nos vamos a limitar a mencionar algunas situaciones especiales que pueden facilitar en el hombre la transferencia de plásmidos R y la posterior diseminación de los mismos.

Es muy probable que el factor más importante sea la presencia de antibióticos;

tanto es así que Richmond y Wiedemann (115) señalan que «en la práctica, no hay transferencia de resistencia *in vivo* en ausencia de selección antibiótica». Guinée (64 y 65), experimentalmente, obtiene en ratas una frecuencia de adquisición de plásmidos R 20 veces más elevada en los animales tratados con antibióticos que en los no tratados.

En opinión de Meynell (93), la disminución por la acción de antibióticos de la flora intestinal normal favorecería el desarrollo de las enterobacteriáceas hasta conseguir concentraciones de las mismas que facilitan la transferencia plasmídica.

Apoyaría esta idea la observación de Jonsson (75) de que la administración oral de eritromicina, antibiótico activo sobre la mayoría de las especies anaerobias y no activo sobre las enterobacteriáceas, va seguida del aumento de bacterias polirresistentes.

Otra situación especial favorecedora de la transmisión plasmídica se da en los animales axénicos. Walton (137), en pollitos recién nacidos, consigue la transferencia de la resistencia de una cepa de *E. coli* a otra de la misma especie, o a *Salmonella typhimurium,* en todos los animales ensayados.

Podemos citar tres condiciones en las que el intestino humano está libre de gérmenes o mínimamente colonizado: a) el período neonatal inmediato; b) la fase final de algunas infecciones intestinales en las que un organismo enteropatógeno ha desplazado toda la flora normal y luego se autoelimina y, c) las situaciones de descontaminación medicamentosa del tracto entérico como preparación a una intervención quirúrgica de cirugía digestiva o en individuos sometidos a intensos tratamientos inmunodepresivos.

En cualquiera de estas tres situaciones un ulterior ingreso de bacterias va seguido de una multiplicación rapidísima de las mismas, lo que conduce a la creación de una flora intestinal muy abundante con una proporción de microorganismos anaerobios inferior a la normal, condiciones todas ellas favorecedoras de la transferencia plasmídica.

Martínez-Ferrer (92) ha estudiado el proceso de la colonización neonatal por *E. coli* 018 R^+ y ha calculado que la velocidad de multiplicación bacteriana en el intestino del recién nacido parece ser equivalente a la que se observa en el tubo de cultivo, condición también favorecedora de la transferencia plasmídica.

Como resumen de su excelente revisión, Baquero y colaboradores (13), llegan a la conclusión de que aparte de la transmisión de resistencia en las grandes superficies quemadas y en los líquidos de diálisis, sistemas a los que sólo parcialmente podemos considerar como ejemplos de transferencia *in vivo*, es muy probable que las situaciones en las que el problema de la transferencia plasmídica *in vivo* adquiera las características de gravedad que tanto preocupan, se den de preferencia en los recién nacidos, en los enfermos graves sometidos a intensa terapéutica antibiótica y en los individuos hiponutridos con síndrome de diarrea crónica por sobrecrecimiento bacteriano yeyunal; parece, pues, aconsejable someter a estos grupos humanos a una vigilancia especial en lo que se refiere a la posible aparición en los mismos de bacterias patógenas portadoras de plásmidos R.

VI. MECANISMOS QUIMICOS DE LA RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIOTICOS

El hecho, por una parte, de que la resistencia bacteriana a los antibióticos pueda estar determinada por genes cromosómicos o por genes extracromosómicos y, por otra, de que para un determinado antibiótico los mecanismos condicionados por uno u otro tipo de genes puedan ser diferentes dentro de la misma especie bacteriana, ha conducido a plantear el estudio de los mecanismos de resistencia de acuerdo con estas circunstancias.

El problema es de una complejidad tan extraordinaria que escapa al planteamiento elemental de nuestro Discurso. Nos limitaremos, pues, a mencionar algunos ejemplos que demuestren el interés extraordinario del mismo.

No se conoce con exactitud el origen de los genes de los plásmidos inductores de la resistencia. La idea inicial de que habían sido «tomados» del cromosoma bacteriano no es válida en todos los casos ya que, como acabamos de indicar, pueden ser diferentes los mecanismos de la resistencia ligada a los genes cromosómicos de la ligada a un plásmido.

Un ejemplo muy demostrativo nos lo proporciona el estudio comparativo de los mecanismos de la resistencia cromosómica y extracromosómica de *E. coli* a la estreptomicina. En el caso de la *resistencia cromosómica* de las mutantes estreptomicinarresistentes, el simple cambio de un aminoácido en la proteína S12 de la subunidad pequeña de los ribosomas impide la fijación del antibiótico, lo que equivale a decir que la bacteria se hace resistente al mismo.

Por el contrario, la *resistencia de tipo extracromosómico* a la estreptomicina y a otros aminoglucósidos es consecutiva a la inactivación de los mismos por enzimas producidas por bacterias portadoras de los plásmidos responsables de la resistencia.

a) *Resistencia cromosómica*

Se ha demostrado resistencia cromosómica, entre otros, frente a los siguientes antibióticos y quimioterápicos:

β-lactaminas	vancomicina
estreptomicina	sulfamidas
tetraciclinas	ác. nalidíxico
cloranfenicol	ác. fusídico
eritromicina	furantoína
lincomicina	PAS
polimixinas	isoniacidas
fosfomicina	

Los mecanismos que condicionan la resistencia de origen cromosómico son muy numerosos y de naturaleza muy dispar. Moreno López (97), partiendo de una revisión de Franklin y Snow (56), los distribuye en los siete grupos siguientes:

1. La bacteria produce una enzima o enzimas reguladas por genes *cromosómicos* que inactivan el antibiótico inicialmente activo.
2. La mutación condiciona una modificación del punto donde actúa el antibiótico haciéndolo insensible a la acción del mismo.
3. Aumento considerable de la producción bacteriana de la enzima sobre la que actúa el antibiótico.
4. Disminución de la permeabilidad bacteriana al antibiótico.
5. Aumento de un metabolito presente normalmente en la bacteria que actúa como antagonista del antibiótico.
6. Ampliación o creación de una nueva vía metabólica para la que no es preciso el producto anulado por el antibiótico.
7. El metabolito bacteriano interferido por la acción del antibiótico ha dejado de ser indispensable para la bacteria.

b) *Resistencia extracromosómica*

También podemos citar una larga lista de antibióticos para los que se ha demostrado la existencia de resistencia extracromosómica. Los más importantes son los siguientes:

penicilinas (penicilina G, ampicilina, carbenicilina, etc.)
cefalosporinas (cefalotina, cefalexina, cefazolina, etc.)
aminoglucósidos (estreptomicina, kanamicina, gentamicina, tobramicina, sisomicina, paromomicina, etc.)
tetraciclinas
cloranfenicol
trimetoprim
sulfamidas

Por regla general, en las resistencias de origen extracromosómico la bacteria adquiere la propiedad de producir nuevas enzimas que inactivan el antibiótico o los antibióticos. Este fenómeno ha sido muy estudiado en los aminoglucósidos, antibióticos que pueden ser inactivados por dichas enzimas por procesos de acetilación, de adenilización o de fosforilización.

Se conoce la existencia de numerosas enzimas que, con un espectro más o menos amplio, actúan sobre los aminoglucósidos. En la tabla VI, tomada de Benveniste y Davies (24), aparecen los nueve mejor estudiados, activos frente a los antibióticos más importantes del grupo.

El conocimiento de la existencia de estas enzimas y del mecanismo íntimo

TABLA VI

ENZIMAS INACTIVANTES DE LOS ANTIBIOTICOS AMINOGLUCOSIDOS (24)

Antibiótico	Enzima inactivante [a]								
	KAcT (AAC 6')	$GAcT_I$ (AAC(3)I)	$GAcT_{II}$ (AAC(3)II)	SAdT (AAD(3")	GAdT (ANT(2")	SPT (APH(3")	NPT_I (APH(3')I)	NPT_{II} (APH(3')II)	LvPT
Kanamicina A	+	(—)	(—)	(—)	+	(—)	+	+	(—)
Kanamicina B	(+)	(+)[b]	(—)	(—)	+	(—)	+	+	(—)
Kanamicina C	(—)	(—)	(—)	(—)	+	(—)	+	+	(—)
Neomicina B o C	(+)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	+	+	+
Paromomicina	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	+	+	+
Lividomicina B	(—)	0	0	(—)	0	(—)	+	+	+
Butirosina	(+)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	+	0
Vistamicina	+	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	+	+	+
Gentamicina C_{1a}	(+)	+	+	(—)	+	(—)	(—)	(—)	(—)
Gentamicina C_2	(+)	+	+	(—)	+	(—)	(—)	(—)	(—)
Gentamicina C_1	(—)	+	+	(—)	+	(—)	(—)	(—)	(—)
Gentamicina A	(—)	(—)	(+)[b]	(—)	+	(—)	+	+	(—)
Sisomicina	(+)	+	+	(—)	+	(—)	(—)	(—)	(—)
Tobramicina	(+)	+	(+)[b]	(—)	+	(—)	(—)	(—)	(—)
Nebramicina (factor 2)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
Estreptomicina	(—)	(—)	(—)	+	(—)	+	(—)	(—)	(—)
Espectinomicina	(—)	(—)	(—)	+	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)
Amikacina	+	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)	(—)

[a] KAcT = kanamicin-acetil-transferasa; $GAcT_I$ y $_{II}$ = gentamicin-acetil-transferasa $_I$ y $_{II}$; SAdT = estrepto-espectino-adenil-transferasa; GAdT = gentamicin-adenilil-transferasa; SPT = estrepto-fosfo-transferasa; NPT_I y $_{II}$ = neomicin-kanamicin-fosfotransferasa $_I$ y $_{II}$; LvPT = lividomicin fosfotransferasa.

+ = inactivación del antibiótico; (+) = inactivación parcial; (—) = no actúa; 0 = se desconoce.

[b] Estos tres antibióticos son modificados por la enzima sin influir de manera manifiesta sobre su acción antibiótica.

por el que inactivan los aminoglucósidos ha abierto vías de alcance al parecer casi ilimitado para la obtención de nuevos antibióticos de este grupo con un espectro más amplio de resistencia a las mismas.

En la actualidad son tres los caminos seguidos para la obtención de nuevos aminoglucósidos; los resume Weinstein (145) en las siguientes palabras: «Uno es la elección empírica de nuevos antibióticos producidos por microorganismos; el segundo se basa en el empleo de técnicas que nos conducen a la obtención de antibióticos semisintéticos, es decir, en la manipulación química de moléculas conocidas; y finalmente, el tercero consiste en la biosíntesis condicionada por modificaciones dirigidas en el metabolismo microbiano.»

El segundo método, con el que se han obtenido ya resultados prácticos del mayor interés, se puede abordar según los dos criterios siguientes:

1. De moléculas ya conocidas se eliminan los grupos o enlaces que sirven de sustrato a algunas de las enzimas. Sirva de ejemplo la obtención de la aminotrideoxibutirosina A, para cuya preparación, en un primer paso, se sustituye en la molécula de la butirosina A el grupo 5"hidroxilo por un grupo amino, con lo que se mejora el espectro del preparado; a continuación, se sustituye el grupo 3'hidroxilo por una función deoxi con lo cual la molécula así obtenida se hace resistente a la acción de la kanamicin-neomicin fosfotransferasa II, enzima a la que era sensible la butirosina.

2. Constitución de moléculas nuevas con el empleo de fragmentos o estructuras moleculares insensibles a la acción de las enzimas, procedentes de antibióticos del grupo, que se acoplan al antibiótico adecuado (previa eliminación del mismo de la fracción que permita la adición de este fragmento molecular). Así se ha preparado la amicacina (IN-HABA Kana A), antibiótico llamado a desempeñar un gran papel en el grupo de los aminoglucósidos, ya comercializado en algunos países, por acoplamiento a la kanamicina A del grupo HABA (ácido hidroxilaminbutírico) de la butirosina. El híbrido así obtenido posee la doble ventaja de ser más activo que la butirosina y de no inactivarse por 3-hidroxifosforilización, 2-hidroxiadenilación, ni por acetilación de los grupos 2-amino y 3-amino, a los que era sensible la kanamicina A.

> Aunque en otros grupos de antibióticos los avances en el momento actual no son tan espectaculares, no debemos olvidar que continuamente se consiguen nuevos preparados con modificaciones de sus propiedades iniciales que los hacen, por ejemplo, de absorción más fácil y completa, o que reducen su toxicidad o que amplían su espectro, etc. Estas modificaciones hacen que poco a poco nuestras posibilidades en antibioticoterapia mejoren de manera, no espectacular, es cierto, pero sí efectiva. Sólo somos conscientes de este hecho si valoramos comparativamente los antibióticos de que disponemos hoy con los equivalentes que nos era dado utilizar hace unos años.

Antes de terminar creo interesante referirme a otra vía de interés para el tratamiento de las enfermedades infecciosas que pudiera llegar a ser un eficaz complemento de la antibioticoterapia.

Recordemos que la enfermedad infecciosa es la consecuencia de un proceso dinámico de interacción entre el hombre enfermo y el microorganismo productor de la enfermedad. Desde el momento en que se dispuso de preparados antimicrobianos realmente eficaces, dicho esquema hubo de ser sustituido por el más amplio de una *triple interacción* entre: macroorganismo y microorganismo, macroorganismo y fármaco, y fármaco y microorganismo. Los espectaculares éxitos de los 40 años últimos han modificado de tal manera el tratamiento de las enfermedades infecciosas, en especial el de las bacterianas que, en la práctica, el problema se reduce con frecuencia a la elección del antibiótico o antibióticos más activos. Pero sabemos, y no debemos olvidarlo en ningún caso, que además de utilizar un antibiótico activo *in vivo* sobre la bacteria productora de la enfermedad hemos de tener en cuenta las características del proceso infeccioso y, no menos importante, características del enfermo tales como edad, ciertos estados fisiológicos (embarazo, por ejemplo) o patológicos (insuficiencia renal, hepática, etc.).

Es necesario tener en cuenta el estado inmunitario del paciente. Baste recordar que en los casos nada infrecuentes de enfermos con un déficit inmunitario congénito, adquirido o provocado, estados en los que la acción del macroorganismo sobre el microorganismo ha perdido gran parte de su eficacia, la antibioticoterapia reviste características especiales; en estos enfermos los antibióticos *bacteriostáticos* son muy poco útiles, o inútiles; es preciso recurrir a los *bactericidas*. No cabe duda de que en estos casos representaría un avance considerable compensar el déficit inmunitario, con lo que podríamos restituir la interacción macroorganismo-microorganismo a una situación similar a la que se da en los individuos inmunológicamente normales.

Si tenemos en cuenta los extraordinarios avances registrados en los últimos años en el campo de la Inmunología, cabe pensar en la posibilidad de que nuevos métodos inmunoterápicos, o los ya conocidos, modificados por adaptación a los conocimientos y técnicas actuales, puedan llegar a proporcionarnos preparados eficaces para la *prevención* de diversos procesos infecciosos; sirvan de ejemplo los resultados muy esperanzadores conseguidos con las vacunas contra la meningitis meningocócica, contra la enfermedad de Chagas, contra las infecciones por *Pseudomonas* en los grandes quemados, etc., o el avance representado por la introducción de los preparados de globulina gamma humana hiperinmune específica, etc.

En el campo de la terapéutica las aportaciones positivas son, hasta ahora, de menor importancia práctica. Sin embargo, las bases teóricas establecidas nos permiten suponer que, más o menos pronto, tendrán una traducción práctica que nos permita completar, cada vez con mayor eficacia, el papel trascendental desempeñado por los antibióticos, sin ninguna duda de importancia excepcional, pero en el que existen limitaciones que con frecuencia nos plantean problemas de muy difícil o imposible solución.

BIBLIOGRAFIA

1. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. B., FLETCHER, C. M., GARDNER, A. D., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A. y FLOREY, H. W.: Further observations on Penicillin. *Lancet*, 1941, **2**, 177-189.
2. AKIBA, T., KOYAMA, K., ISHIKI, Y., KIMURA, S. y FUKUSHIMA, T.: Studies on the mechanism of development of multiple drug-resistant *Shigella* strains. *Nippon Iji Shimpo*, 1960, **1866**, 46-50. Citado por Watanabe, 1963.
3. AKIBA, T. KOYAMA, K., ISHIKI, Y., KIMURA, S. y FUKUSHIMA, T.: On the mechanism of the development of multiple drug resistant clones of *Shigella*. *Japan J. Microbiol.*, 1960, **4**, 219-227. Citado por Watanabe, 1963.
4. AKIBA, T., KOYAMA, K., KIMURA, S. y FUKUSHIMA, T.: Studies on the mechanism of transfer of drug-resistance in bacteria. VIII. Experiments on the transfer of drug-resistance in vivo. *Med. Biol.* (Tokyo). 1961, **59**, 185-188. Citado por Watanabe, 1963.
5. ANDERSON, E. S.: The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann. Review Microbiol.*, 1968, **22**, 131-180.
6. ARRUGA, H.: El serodiagnóstico de la sífilis en oftalmología. *Arch. de O. Hisp. Amer.*, 1909.
7. ARRUGA, H.: Etiología y patogenia del desprendimiento de retina. Consejo Internacional de Oftalmología, 1933.
8. ARRUGA, H.: Cirugía ocular. Salvat Editores, Barcelona, 1946.
9. ARRUGA, H.: El desprendimiento de retina (Libro Atlas). NAGSA, Barcelona, 1936.
10. ASERKOFF, B. y BENNETT, J. V.: Effect of antibiotic therapy in acute salmonellosis on the fecal excretion of Salmonellae. *New Engl. J. Med.*, 1969, **281**, 636-640.
11. AVERY, O. T., MACLEOD, C. M. y MCCARTY, M.: Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. exp. Med.*, 1944. **79**, 137-157.
12. BAQUERO, F., MARTÍNEZ-FERRER, M., CAÑEDO, T., SALESA, R. y CARVAJAL, A.: Transmisión in vivo de factor R a *S. enteritidis*: Influencia de los anticuerpos séricos específicos. IV Congreso Nacional de Microbiología. Resúmenes. 1973.
13. BAQUERO, F., MARTÍNEZ-FERRER, M. y CARVAJAL, A.: Ecología de la transmisión de resistencias a los antibióticos en el intestino humano. Monografías Básicas de la Sociedad Española de Microbiología. N.° 1, 1975.
14. BARBER, M.: *Brit. Med. J.*, 1974, **II**, 863. Citado por Lowbury y Ayliffe.
15. BARBER, M.: The incidence of penicillin-sensitive variant colonies in penicillanase-producting strains of *Staphylococcus pyogenes*. *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 274-281.
16. BARBER, M.: Drug resistance of staphylococci with special reference to penicillinase production. En "Drug resistance in microorganisms". Págs. 262-274. J. y A. Churchill Ltd., London, 1957.
17. BARBER, M.: Methicillin-resistant staphylococci. *J. clin. Path.*, 1961, **14**, 385-393.
18. BARBER, M.: Naturally occurring methicillin-resistant staphylococci. *J. gen. Microbiol.*, 1964, **35**, 183-190.
19. BARBER, M. y ROZWADOWSKA-DOWZENKO, M.: Infection by penicillin-resistant *Staphylococci*. *Lancet*, 1948, **II**, 641-644.
20. BARON, L. S. y FALKOW, S.: Genetic transfer of episomes from *Salmonella typhosa* to *Vibrio cholerae*. *Genetics*, 1961, **46**, 849.
21. BASKETT, A. C.: *Proc. Roy. Soc. Serie B.* 1952, **139**, 251. Citado por Lorian.
22. BEHRING, E. VON y KITASATO, S.: Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *Disch. med. Wschr.* 1890, **16**, 1113-1114.
23. BENNER, E. J. y KAYSER, F. J.: Growing clinical significance of methicillin-resistant *Staphycococcus aureus*. *Lancet*, 1968, **2**, 741-744.

24. BENVENISTE, R. y DAVIES, J.: Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. *Ann. Review Bioch.*, 1973, **42,** 471-506.
25. British Medical Research Council. *Brit. Med. J.*, 1948, **II,** 769. Citado por Lowbury y Ayliffe.
26. BROWN, J. D., MO, D. H. y RHOADES, E. R.: Chloramphenicol-resistant *Salmonella typhi* in Saigon. *J.A.M.A.*, 1975, **231,** 162-166.
27. BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E.: Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ª edición. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
28. BULGER, R. J., LARSON, E. y SHERRIS, J. C.: Decreased incidence of resistance to antimicrobial agents among *E. coli* and *Klebsiella-Enterobacter. Ann. intern. Med.*, 1970, **72,** 65-71.
29. BURT, S. J. y WOODS, D. R.: R factor transfer to obligate anaerobes from *Escherichia coli. J. gen. Microb.*, 1976, **93,** 405-409.
30. BUTLER, T., LINH, N. N., ARNOLD, K. y POLLACK, M.: Chloramphenicol-resistant typhoid fever in Vietnam associated with R factor. *Lancet*, 1973, **II,** 983-985.
31. CANETTI, G., FOX, W., KHOMENKO, A., MAHLER, H. T., MENON, N. K., MITCHISON, D. A., RIST, N. y SMELEV, N. A.: Advances in techniques of testing mycobacterial drug sensitivity, and the use of sensitivity tests in tuberculosis control programmes. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1969, **41,** 21-43.
32. CANETTI, G., LE LIRZIN, M., GAY, Ph., THIBIER, R., KREIS, B. y GROSSET, J.: La résistance primaire dans la tuberculose pulmonaire de l'adulte en France. *Rev. Tuberc. et Pneumol.*, 1972, **36,** 337.
33. CASANOVAS, J.: Hermenegildo Arruga, Conde de Arruga. *An. Medicina y Cirugía* (R.A.M. Barcelona), 1973, **53,** 163-170.
34. COHEN, S.: Ecologic consequences of resistance-transfer-factors. *Amer. J. Clin. Nutrition*, 1970, **23,** 1480-1487.
35. CHABBERT, Y. A.: Mecanisme d'adquisition de resistence aux antibiotiques. I Symposium Internacional sobre antibióticos y Medicina Hospitalaria. Madrid. *Monografías Científicas Beecham*, **N.º 1,** 147-154, 1968.
36. CHABBERT, Y. A.: Detection of methicillin and cephalotin-resistant Staphylococci. En "The control of Chemotherapy". Págs. 17-24. E & S Livingstone, Edinburgh, 1970.
37. CHABBERT, Y. A. y BAUDENS, J. G.: Souches de staphylocoques résistant naturellement à la méthicilline et à la 5-méthyl-3-phényl-4-iso-oxazolylpénicilline. *Ann. Inst. Pasteur*, París, 1962, **103,** 222-230.
38. CHABBERT, Y. A. y WITCHITZ, J. L.: In vivo transfer of a plasmid governing gentamycin-resistance. En "Bacterial Plasmids and Antibiotic resistance". Págs. 17-22. Avicenum-Springer, Prague, 1972.
39. CHATTON, E.: Titres et travaux Scientifiques. Sète, Sottano, 1937.
40. DATTA, N.: Infectious drug resistance. *Brit. med. Bull.*, 1965, **21,** 254-259.
41. DATTA, N. y OLARTE, J.: R factors in strains of *Salmonella typhi* and *Shigella dysenteriae* 1, isolated during epidemics in Mexico: classification by compatibility. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 1974, **5,** 310-317.
42. DAVID, H. L.: Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis. App. Microbiol*, 1970, **20,** 810-814.
43. DAVIES, J. E. y ROUND, R.: Transmissible multiple drug resistance in *Enterobacteriaceae. Science*, 1972, **176,** 758-768.
44. DAVIS, C. E. y ANANDAN, J.: The evolution of R factors. *New Eng. J. Med.*, 1970, **282,** 117-122.
45. DEMEREC, M.: Genetic aspects of drug resistance. En "Drug resistance in micro-organism". Págs. 47-58. J. y A. Churchill, Ltd., London, 1957.
46. DOMAGK, G.: Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. med. Wschr.*, 1935, **61,** 250-253.

47. DORNBUSCH, K.: Genetic aspects of methicillin resistance and toxin production in a strain of *Staphylococcus aureus*. *Ann. N.Y. Acad. Sc.*, 1971, **182**, 91-97.
48. Editorial: Chloramphenicol resistance in typhoid. *Lancet*, 1973, **II**, 1008.
49. ERICSSON, H. M. y SHERRIS, J. C.: Antibiotic sensitivity testing (Report of an International Collaborative Study). *Acta path. microbiol. scand.* Section B, Supplement n.° 217, 1971.
50. FALKOW, S.: Infectious Multiple Drug Resistance. Pion Limited, London, 1975.
51. FLEMING, A.: On antibacterial action of cultures of penicillin with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. exp. Pathol.*, 1929, **10**, 226-236.
52. FOX, W.: *Tubercle*, 1969, **50**, 155. Citado por Lowbury y Ayliffe.
53. FOX, W., WIENER, A., MITCHISON, D. A., SELKON, J. B. y SUTHERLAND, I.: *Tubercle*, 1957, **38**, 71. Citado por Lowbury y Ayliffe.
54. FOZ, A.: Las infecciones estafilocócicas y el problema de su resistencia a los antibióticos. En "Tratamientos actuales en medicina interna". Págs. 531-542. Ediciones Toray, Barcelona, 1972.
55. Citado por FOZ, A.: Mecanismos de adquisición de resistencia de las bacterias a los antibióticos. En "Avances en terapéutica, 4". Págs. 85-112. Salvat Editores, Barcelona, 1973.
56. FRANKLIN, J. J. y SNOW, G. A.: Biochemistry of antimicrobial action. Chapman and Hall Ltd., London, 1971.
57. GANGAROSA, E. J., BENNET, J. V., WYATT, C., PIERCE, P. E., OLARTE, J., MENDOZA-HERNÁNDEZ, P., VÁZQUEZ, V. y BESSUDO, D.: An epidemic-associated episome? *J. infectious Dis.*, 1972, **126**, 215-218.
58. GARDNER, P., SMITH, D. H. y BEER, H.: Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. *Lancet*, 1969, **II**, 774-776.
59. GARROD, L. P., LAMBERT, H. P. y O'GRADY, F.: Antibiotic and chemotherapy. 4.ª ed. Churchill Livingstone. Edimburgh, 1973.
60. GINOZA, H. S. y MATNEY, T. S.: Transmission of resistance transfer factor from *Escherichia coli* to two species of *Pasteurella*. *J. Bact.*, 1963, **85**, 1177-1178.
61. GÓMEZ LUS, R.: Comunicación personal. 1976.
62. GÓMEZ LUS, R. y RUBIO CALVO, M. C.: Un tercer tipo de plásmido que determina gentamicin resistencia, aislado en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Quimiot.*, 1975, **II**, 1-6.
63. GRIFFITH, F.: Significance of pneumoccal types. *J. Hig.*, 1928, **27**, 113-159.
64. GUINEE, P. A. M.: Transfer of multiple drug resistance from *Escherichia coli* to *Salmonella typhimurium* in the mouse intestine. *Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol.*, 1965, **31**, 314-322.
65. GUINEE, P. A. M.: Resistance transfer to the resident intestinal *E. coli* of rats. *J. Bact.*, 1970, **102**, 291.
66. HOBBY, G. L., JOHNSON, R. M., CRAWFORD-CAGLIARDI, L., BOYTAR, V. y JOHNSON, G. E.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 1966, **94**, 703. Citado por Lowbury y Ayliffe.
67. Hong Kong Government Tuberculosis Service, British Medical Research Council; *Tubercle*, 1964, **45**, 77. Citado por Lowbury y Ayliffe.
68. HOTCHKISS, R. D.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1951, **16**, 457. Citado por Wilson y Miles, 1964.
69. HOTCHKISS, R. D. y EVANS, A. H.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1958, **23**, 85. Citados por Wilson y Miles, 1964.
70. IVLER, D.: *Staphylococcus*. En "Manual of Clinical Microbiology". Págs. 91-95. American Society for Microbiology. Washington, 1974.
71. JACOB, F. y WOLLMAN, E. L.: Les episomes, éléments génétiques ajoutés. *C.r. hebd. Séanc. Acad. Sci.*, París, 1958, **247**, 154-155.

72. JAWETZ, E., MELNICK, J. L. y ADELBERG, E. A.: Review of Medical Microbiology. 12.ª ed. Lange Medical Publications. Palo Alto, Cal. 1976.
73. JOHNSTON, J. H. y RICHMOND, M. H.: The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. *J. gen. Microbiol.* 1970, **60,** 137-139.
74. JOLY, B., CLUZEL, R., HENRI, Ph. y SIROT, D.: La résistance a la méthicilline des staphylocoques mutants RH doit-elle être obligatoirement extrapolée aux céphalosporines? *Path. Biol.,* 1975, **23,** 291-297.
75. JONSSON, M.: Antibiotic resistance and R factors in gramnegative bacteria isolated in a Hospital for infectious diseases. Effect of antibacterial treatment on the incidence of R factor mediated antibiotic resistance. *Scand. J. Infect. Dis.,* 1973, **5,** 1.
76. KAGIWADA, S., KATO, S., ROKUGO, M., HOSHINO, J. y NISHIYAMA, K.: Studies on the mechanism of development of resistant *Shigella* in intestinal tracts with special reference to the possibility of converting sensitive *Shigella* to resistance by multiple-drug-ressistant *E. coli* in intestinal tracts. *Nippon Iji Shimpo,* 1960, **1886,** 5-9 (en japonés). Citado por Watanabe, 1963.
77. KEANE, C. T. y HONE, R.: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus. Lancet,* 1974, **I,** 458.
78. KITAMOTO, O., KASAI, N., FUKAYA, K. y KAWASHIMA, A.: Drug sensitivity of the *Shigella* strains isolated in 1955 (en japonés). *J. Japan Assoc. Infectious Diseases,* 1956, **30,** 403-405. Citado por Watanabe, 1963.
79. LACEY, R. W.: Antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bacteriol. Rev., 1975, **39,** 1-32.
80. LEBEK, G.: Über die Entstehung mehrfachresistenter Salmonellen. Ein experimenteller Beitrag. *Z. Backt., I Abt. Orig.,* 1963, **188,** 494-505.
81. LEDERBERG, J. y TATUM, E. L.: Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.,* 1946, **11,** 113. Citado por Wilson y Miles, 1969.
82. LE LIRZIN, M. and DJUROVIC, C.: Etude sur milieu de Löwenstein-Jensen de la composition des souches sauvages de *Mycobacterium tuberculosis* en variants résistants à la rifampicine et en variants résistants à l'éthambutol. *Ann. Inst. Pasteur,* 1971, **120,** 531-548.
83. LORIAN, V.: Antibiotic and chemotherapeutic agents in clinical and laboratory practice. Charles C. Thomas, Springfield, 1966.
84. LOWBURY, E. J. L. y AYLIFFE, G. A. J.: Drug resistance in antimicrobial therapy. Charles C. Thomas, Springfield, Ill., 1974.
85. LURIA, S. E. y DELBRÜCK, M.: Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics,* 1943, **28,** 181-186.
86. LYNN, R., NICOL, C. S., RIDLEY, M., RIMMER, D., SYMONDS, M. A. E. y WARREN, C.: Further studies of penicillin resistant gonococci. *Brit. J. vener. Dis.,* 1970, **46,** 404-405.
87. MAIER, T. W., BEILSTEIN, H. R. y ZUBRZYCKI, L.: Antibiotic disk susceptibility tests with *Neisseria gonorrhoeae. Antimicrob. Ag. Chemother.,* 1974, **5,** 210-216.
88. MANTEN, A., GUINEE, P. A. M., KAMPELMACHER, E. H. y VOOGD, C. E.: An eleven-year study of drug resistance in *Salmonella* in the Netherlands. *Bull. Wld. Hlth. Org.,* 1971, **45,** 85-93.
89. MARCH AYUELA, P. de: Resistencias primarias y secundarias a las drogas antituberculosas. *Revista Ibys,* 1970, **28,** 137-174.
90. MARCH AYUELA, P. de: Sobre la problemática de la tuberculosis en España. *Tribuna médica,* 1976, XIII/675, 16-20.
91. MARE, I. J.: Incidence of R factor among gramnegative bacteria in drug-free human and animal communities. *Nature,* 1968, **220,** 1046-1047.
92. MARTÍNEZ FERRER. Citado por Baquero, F., Martínez-Ferrer, M. y Carvajal, A. 1975.

93. MEYNELL, G. G.: Bacterial Plasmids. *The M.I.T. Press.* Cambridge, 1973.
94. MIHICH, E.: Drug resistance and selectivity. Academic Press. New York, 1973.
95. MILLER, A. B., TALL, R., FOX, W., LEFFORD, M. J. y MITCHISON, D. A.: *Tubercle*, 1966, **47**, 92. Citado por Lowbury y Ayliffe.
96. MIRA GUTIÉRREZ, J.: Problemática de la terapéutica de la tuberculosis y las micobacteriosis. Actas del V Congreso Nacional de Microbiología. Págs. 109-183. Salamanca, 1975.
97. MORENO LÓPEZ, M., DÁMASO, D., PEREA, E. J., MARCO, E. L. y MANCHADO, P.: Transmisión de factores de resistencia a los antibióticos entre las bacterias: conjugación y transducción. Libro de Actas del Symposium Internacional sobre Mecanismo de Acción y Espectro Antimicrobiano de los Antibióticos. Págs. 381-391. Zaragoza, 1970.
98. NAKAYA, R., NAKAMURA, A. y MURATA, Y.: Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1960, **3**, 354-359. Citado por Watanabe, 1963.
99. *National Committee for Clinical Laboratory Standards.* Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Tests. Approved standard: ASM-2. 1975.
100. NEU, H. C.: Molecular modifications of antimicrobial agents to overcome drug resistance. *Antibiotics Chemoter.*, 1976, **20**, 87-111.
101. NEU, H. C., HUBER, P. J. y WINSHELL, E. B.: Interbacterial transfer of R factor in humans. *Antimicrob. Ag. Chemoter*, 1973, **3**, 542-544.
102. NOVICK, R. P.: Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1969, **33**, 210-263.
103. NOVICK, R. P., CLOWES, R. C., COHEN, S. N., CURTISS III, R., DATTA, N. y FALKOW, S.: Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. *Bacteriol. Rev.*, 1976, **40**, 168-189.
104. OCHIAI, K., YAMANAKA, T., KIMURA, K. y SAWADA, O.: Studies on inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *E. coli* strains. *Nippon Iji Shimpo*, 1959, **1861**, 34-36 (en japonés). Citado por Watanabe, 1963.
105. OLARTE, J. y GALINDO, E.: Factores de resistencia a los antibióticos encontrados en bacterias enteropatógenas aisladas en la Ciudad de México. *Rev. lat. am. Microbiol.*, 1970, **12**, 173-179.
106. OLARTE, J. y GALINDO, E.: *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol, ampicillin and other antimicrobial agents: strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in Mexico. *Antimicrob. Ag. Chemoter.*, 1973, **4**, 597-601.
107. OTAYA, H., MACHIHARA, S., YOSHIMURA, M. y YAMAMOTO, M.: Studies on the drug resistance of *S. aureus* and *E. coli* against antibiotics. Drug-inactivating enzymes and antibiotic resistance. Avicenum. Prague, 1975.
108. PANIKER, C. K. J. y VIMALA, K. N.: Transferable cloramphenicol resistance in *Salmonella typhi*. *Nature*, 1972, **239**, 109-110.
109. PARÉS, R., GUINEA, J., HERNÁNDEZ, S., VALOIX, J. y JOFRE, J.: A new episomic element controlling fermentative metabolism and excretion of aminoacids by *Citrobacter intermedium* C_3. *J. Bacteriol.*, 1974, **119**, 9-18.
110. PARROT, R.: Citado en "Une methode simplifiée de mesure de la resistance aux antibiotiques du bacille tuberculeux". Diagnostics et Recherches, n.º 3. Publicación del *Institute Pasteur Production.*
111. PEDRO PONS, A., FARRERAS, P. y FOZ, A.: Enfermedades infecciosas. En "Tratado de Patología y Clínica médicas". Tomo VI. Págs. 3-1044. 3.ª ed., Salvat Editores, Barcelona, 1968.
112. POLLOCK, M. R.: Drug resistance in Microorganisms. Ciba Foundation Symposium. London, 1957, pág. 78. Citado por Lorian.
113. RAMANARAYANA MURTI, B., RAJYALAKSHMI, K. y BHASKARAN, C. S.: Resistance of *Salmonella typhi* to cloramphenicol. *J. clin. Path.*, 1962, **15**, 544-551.

114. REYN, A.: Antibiotic sensitivity of gonococcal strains isolated in the South East Asia and Western Pacific regions in 1961-1968. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1969, **40**, 257-262.
115. RICHMOND, M. H. y WIEDEMANN, B.: Plasmids and bacterial evolution. En "Evolution in the Microbial World". Carlile and Skehel Ed., Cambridge University Press, 1974.
116. ROSS, S., RODRÍGUEZ, W., CONTRONI, G. y KHAN, W.: Staphylococcal susceptibility to penicillin G. *J.A.M.A.*, 1974, **229**, 1075-1077.
117. ROWNTREE. 1951. Citado por A. Pedro-Pons, P. Farreras y A. Foz, 1968.
118. SCHNEIERSON, S. S., AMSTERDAM, D. y PERLMAN, E.: *Antibiot. Chemother.* Wash., 1960, **10**, 30. Citado por Lorian, 1966.
119. SEIX, T. y MARCH AYUELA, P. de: Citado por March, 1970.
120. SIBONI, K. y POULSEN, E. D.: *Dan. med. Bull.*, 1968, **15**, 161. Citado por Garrod y col.
121. SMITH, D. H.: R factor infection of *Escherichia coli* lyophilized in 1946, *J. Bacteriol*, 1967, **94**, 2071-2072.
122. SMITH, D. H. y ARMOUR, S. E.: Transferable R factors in enteric bacteria causing infection of the genito-urinary tract. *Lancet*, 1966, **II**, 15-18.
123. SMITH, D. I., GÓMEZ LUS, R., RUBIO CALVO, M. C., DATTA, N., JACOB, A. E. y HEDGES, R. W.: Third type of plasmid confering gentamicin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Ag. Chemoter.*, 1975, **8**, 227-230.
124. STANIER, R. Y., DOUDOROFF, M. y ADELBERG, E. A.: General Microbiology. 3.ª ed. MacMillan Press, London, 1971.
125. STANIER, R. Y. y NIEL, C. B. van: The concept of a bacterium. *Arch. Microbiol.*, 1962, **42**, 17.
126. SUTHERLAND, R. y ROLINSON, G. N.: *J. Bact.*, 1964, **87**, 887. Citado por Garrod y col.
127. SYKES, R. B., MATTHEW, M. y O'CALLAGHAN, C. H.: R factor mediated β-lactamase production by *Haemophilus influenzae*. *J. Med. Microbiol.*, 1975, **8**, 437-441.
128. SZYBALSKI, W.: *Antibiot. Ann.*, 1954-55, 174. Citado por Lorian.
129. TANAKA, T., NAGAI, Y., HASHIMOTO, H. y MITSUHASHI, S.: Distribution of R factors among *Shigella* strains isolated in Japan. *Japan J. Microbiol.*, 1969, **13**, 187-191.
130. THORNSBERRY, C., BAKER, C. N., KIRVEN, L. A. y SWENSON, J. M.: Susceptibility of ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* to seven penicillins. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 1976, **9**, 70-73.
131. THORNSBERRY, C., BIDDLE, J. W., KAUFMAN, R. E., JOHNSON, R. E., REYNOLDS, G. H. y WIESNER, P. J.: Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae*. 15th. Intersc. Cong. Antimicrob. Ag. Chemoter. Abstracts (350). 1975.
132. UBUKATA, K., KONNO, M. y FUJII, R.: Transduction of drug resistance to tetracycline, chloranphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J. Antibiotics* (J), 1975, **28**, 681-688.
133. VÁZQUEZ, V., CALDERÓN, E. y RODRÍGUEZ, R. S.: Chloramphenicol-resistant strains of *Salmonella typhosa*. *New England J. Med.*, 1972, **286**, 1220.
134. VELASCO, L. de y ORTEGA, A.: Resistencia bacteriana primaria en la tuberculosis del adulto. *Med. Clín.*, 1973, **60**, 459-464.
135. VERHAGEN, A. R., VAN DER HAM, M., HEIMANS, A. L., KRANENDONK, O. y MAINA, A. N.: Diminished antibiotic sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* in urban and rural areas in Kenya. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 1971, **45**, 707-717.
136. WALTER, A. L., HEILMEYER, L., PLEMPEL, M. y OTTEN, H.: Antibiotica-Fibel, 3.ª ed., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1969.
137. WALTON, J. R.: In vitro transfer of infectious drug resistance. *Nature*, 1966, **211**, 312.
138. WATANABE, T.: Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1963, **27**, 87-115.
139. WATANABE, T.: Transferable drug resistance: the nature of the problem. En "Bacterial episomes and plasmids". Págs. 81-97. Ciba Symposium. Churchill, London, 1969.

140. WATANABE, T.: The origen of R factors. En "The problem of drug resistant pathogenic bacteria". *Ann. New York Acad. Sci.*, 1971, **182,** 126-140.
141. WATANABE, T.: Infectious drug resistance in bacteria. En *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1971, **56,** 44-98.
142. WATANABE, T.: Further outlooks antibiotics in the shadows of resistance factors. En "Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance". Págs. 9-12. Avicenum-Springer, Prague, 1972.
143. WATSON, J. D.: La doble hélice. Plaza & Janés, Barcelona, 1970.
144. WATSON, J. D. y CRICK, F. H. C.: Genetical implications of the estructure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, 1953, **171,** 964.
145. WEINSTEIN, J. M.: Presente y futuro de la investigicación de antibióticos aminoglucósidos. "Actas del V Congreso Nacional de Microbiología". Págs. 57-78, Salamanca, 1975.
146. WELSCH, M.: Dans quelle mesure la resistance des germes aux antibiotiques doit-elle limiter l'emploi de ces médicaments. II Symposium Internacional sobre Antibióticos. 221-243. Valencia. Monografías Científicas Beecham, n.º 3, 1970.
147. WIEDEMANN, B.: Resistance transfer in vivo and its inhibition. En "Bacterial plasmids and antibiotic resistance". Págs. 75-90. Avicenum-Springer, Prague, 1972.
148. WILSON, G. G. y MILES, A. A.: Topley and Wilson's principles of Bacteriology and Immunity. 5.ª ed. Edward Arnold Ltd., London, 1969.
149. ZECHOVSKY, N.: La résistance des staphylocoques à la méthicilline. *La Nouvelle Presse médicale*, 1974, **8,** 433-437.
150. ZINDER, N. D. y LEDERBERG, J.: Genetic exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, 1952, **64,** 679.

DISCURSO DE CONTESTACION DEL DOCTOR JORGE GRAS RIERA

Excelentísimo Sr. Presidente,
Dignísimas Autoridades,
Muy Ilustres Sres. Académicos,
Señoras, Señores,

Es la primera vez que cumplo con el agradable deber de dar la bienvenida, en nombre de esta Real Academia de Medicina, a un nuevo miembro de la misma. Siempre sería para mí un motivo de satisfacción tomar parte en esta solemnidad, pero lo es muchísimo más en este caso en que el Académico Electo es Amadeo Foz Tena, con quien hemos recorrido, lado a lado, toda nuestra ya un poco dilatada singladura profesional y científica, y con el que nos une una también larga y sólida amistad. No obstante, va a ser fácil poner de manifiesto los méritos que concurren en Amadeo Foz, y con ello el acierto de la Academia en elegirlo, sin que en el intento se mezcle el más pequeño ingrediente procedente de esta amistad.

Amadeo Foz nació en Lécera (Zaragoza) en 1913, hijo de padre médico y, a los 10 años, se trasladó a nuestra ciudad, donde cursó los estudios de Bachillerato y la carrera de Medicina, licenciándose en 1939. Al año siguiente se hizo cargo de la dirección de la Sección de Bacteriología del Laboratorio de la Cátedra de Patología y Clínica Médica del profesor Agustín Pedro-Pons, en cuyo Servicio había sido alumno interno desde el año 1933. En el año 1968, al jubilarse el profesor Pedro-Pons, siguió en el mismo cargo con el profesor Gibert-Queraltó hasta finales de 1970, en que desapareció dicho Laboratorio y se creó el Laboratorio Central de Microbiología del Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. Completó su formación bacteriológica en 1945 en Zurich, en el Instituto de Higiene de la Universidad, trabajando a las órdenes de los profesores H. Mosser y A. Grumbach, de gran prestigio internacional.

En 1948 fue nombrado Académico Corresponsal de esta Real Academia de Medicina, como premio a un trabajo presentado. En 1949, al crearse por el Excmo. Ayuntamiento de esta ciudad el Departamento de Investigación del Hospital Municipal de Infecciosos, ganó la plaza de Jefe de la Sección de Bacteriología, cargo que sigue desempeñando en la actualidad, con la única diferencia de que el Hospital es ahora un Hospital General con el nombre de Ntra. Sra. del Mar y el Departamento está en período de renovación con el nombre de Instituto Municipal de Investigación Médica.

En el año 1958 realiza un curso sobre «Cultivos celulares aplicados a la Virología» del Instituto Pasteur de París, dirigido por el profesor Lépine. En 1959 se le concede, junto con otros miembros del Departamento de Investigación, el premio «Jaime Ferrán» del Excmo. Ayuntamiento de Barcelona. En 1969, presentó su tesis doctoral «Estudio sobre la estandardización del antígeno utilizado en las reacciones serológicas para el diagnóstico de la Brucelosis», calificada con sobresaliente cum Laude y Premio Extraordinario. Desde 1971, es miembro de la «International Society of Chemotherapy» y, el mismo año, el Excmo. Sr. Ministro de la Gobernación le concede la encomienda con placa de la Orden Civil de Sanidad por su labor en el brote de cólera de 1971. En 1974, es nombrado Médico Consultor del Laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico y Provincial de la Facultad de Medicina, y, en 1975, Secretario del Departamento de Medicina, Farmacia y Veterinaria de la Fundación Juan March.

La labor de Foz ha cristalizado en 96 trabajos, de los cuales 83 se han publicado en lengua española y de los 13 trabajos restantes 1 en alemán, 4 en francés y 8 en inglés. Ha colaborado en 11 libros y en un número considerable de Ponencias y Comunicaciones, en Sociedades Científicas, Congresos, Symposia y Mesas Redondas, en nuestro país y fuera de él.

El valor intrínseco de una personalidad no se mide por una simple enumeración cuantitativa, tal como la acabamos de exponer, sino por el valor cualitativo de su aportación. Un primer índice de calidad es, precisamente, una aceptable correspondencia entre años de labor y trabajos publicados, que en Foz se mantiene perfectamente en un coeficiente razonable, ya que en ocasiones el coeficiente publicaciones/año introduce serias dudas sobre su posible calidad. Una valoración mejor puede hacerse glosando con más detalle su aportación a tres campos distintos de la actividad profesional y científica; su aportación a la investigación clínica, su labor docente y su aportación a la investigación básica.

Antes de valorar el primer aspecto, creemos interesante destacar que la actividad de Foz se inició inmediatamente después de que terminara nuestra Guerra Civil, por lo que inicialmente tuvo que dedicar gran parte de su esfuerzo a situar el Laboratorio de Bacteriología de la Clínica Médica A a un nivel aceptable, simplemente en cuanto a su función clínica, con dificultades agravadas por las condiciones exteriores derivadas de la II Guerra Mundial, por lo que tienen aún mayor mérito sus aportaciones. En este sentido, son notables sus constantes contribuciones al mejoramiento de las técnicas de hemocultivo aplicadas al diagnóstico de la endocarditis, sepsis, tifoidea y brucelosis. La introducción y difusión en nuestro país de técnicas nuevas como el estudio separado de las aglutininas anti-H y anti-O en la tifoidea, la aplicación de la fijación de complemento y de la prueba de Coombs en la Brucelosis humana, de las técnicas para el diagnóstico de las enfermedades reumáticas, técnicas para el estudio de las infecciones urinarias, diferenciación de estafilococos, etc., etc. En estas contribuciones y en las experimentales jugó un papel decisivo la creación y puesta en marcha de la Sección de Bacteriología del Departamento de Investigación del actual Hospital General

de Ntra. Sra. del Mar. Una prueba de ello es la intensa y fundamental labor desarrollada por dicha Sección en el brote de cólera que aquejó a nuestra ciudad en el año 1971.

A este nivel clínico destacan notablemente sus aportaciones originales en las endocarditis lentas y en la brucelosis. En una serie de trabajos realizados conjuntamente con los Dres. L. Trías de Bes y J. Gras y que fueron publicados posteriormente en forma conjunta con el Prof. J. G. Sánchez-Lucas y los Dres. J. Cabré y F. Ballesta, se pudo establecer la existencia de dos tipos de endocarditis subaguda, la endocarditis bacteriémica y no bacteriémica, con diferencias importantes en el comportamiento del hemocultivo, en la intensidad de las alteraciones plasmáticas, en su respuesta al tratamiento con antibióticos y en su cuadro clínico.

El estudio conjunto de las técnicas antes citadas de aglutinación y fijación de complemento en la Brucelosis le llevó a comprobar en 1953, que el hecho de que en ocasiones se presente un título muy superior de aglutinación al de fijación de complemento, se debe al tiempo de evolución del proceso. Esta observación le indujo al estudio de los anticuerpos no aglutinantes anti-*Brucella* mediante la prueba de Coombs, comprobando en 1954 que los sueros en los que la fijación de complemento presenta un título más elevado que el de la aglutinación, son sueros muy ricos en anticuerpos no aglutinantes.

Esta es una observación a nivel clínico de un hecho que se ha comprobado no tan sólo en el hombre, sino también experimentalmente a partir de trabajos publicados de 1959 a 1962. La respuesta inicial, respuesta primaria a un estímulo antigénico, corresponde a IgM, y la respuesta a posteriores estímulos antigénicos, respuesta secundaria, a IgG. La primera da títulos muy iguales valorada por aglutinación o fijación de complemento, mientras que la segunda, IgG, da títulos muy superiores de fijación de complemento y de Coombs que los de aglutinación.

Foz ha estudiado también intensamente la importancia del antígeno disuelto en las reacciones serológicas utilizadas en el diagnóstico de las brucelosis, a consecuencia de cuyos estudios ha introducido una técnica original para la reacción de fijación de complemento.

La faceta docente de Foz ha sido fructífera en un aspecto de gran valor, cual es la formación de nuevos bacteriólogos, de tal manera que la mayoría de bacteriólogos de primera línea de centros hospitalarios de nuestra ciudad y aun de centros hospitalarios de otras ciudades de nuestro país, han sido formados por él, entre los cuales podemos señalar al Dr. L. Arcalis Arce, a la Dra. C. Roy Avenosa, al Dr. G. Prats Pastor, al Dr. M. Simón Pujol, al Dr. M. Durán Bellido, al Dr. R. Martínez Silva y al Dr. S. Garriga Girona. Además, notables especialistas clínicos en enfermedades infecciosas, algunos de los cuales ejercen actualmente en Hospitales de Estados Unidos, han desarrollado su indispensable formación bacteriológica con Foz. Podemos recordar, entre ellos, a los Dres. T. Rubio Tello, G. Verger Garau, J. Llorens Terol y L. Seme.

A partir del curso 1969-70, Foz fue catedrático contratado de la Cátedra de

Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, durante 5 cursos. La gran capacidad e ilusión docente de Foz se puso plenamente de manifiesto, tanto por la claridad expositiva y el interés de sus lecciones teóricas, como por el gran número de prácticas que llevaban a cabo los alumnos, en muchas ocasiones con preparaciones individuales para cada uno de ellos y, en algunos puntos concretos, como por ejemplo, el de la genética bacteriana, elaborando folletos con magníficas síntesis y puesta al día de los mismos, que eran distribuidos a los alumnos. Sin la más pequeña exageración podemos decir que la Cátedra de Foz era una de las mejores de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, en cuanto a su nivel docente y sin la más pequeña dificultad con los alumnos. Por mecanismos reglamentarios que decían muy poco en favor de la Universidad, Foz abandonó su docencia. En el momento actual ha sido nombrado Catedrático extraordinario, a través de un nuevo sistema que creemos honra a la Universidad, y ha reanudado el curso anterior su docencia.

En el campo de la investigación experimental tenemos un ejemplo de las óptimas condiciones de Foz en su estudio del posible mecanismo de la reacción de Waaler-Rose. Waaler, en 1940, y poco después Rose y cols. en 1948, demostraron que los glóbulos de carnero sensibilizados con dosis subaglutinantes de anticuerpos de conejo eran aglutinados por los sueros de los enfermos de poliartritis crónica. En 1951, Foz pensó que se trataría de una reacción entre la globulina gamma de conejo adsorbida a los hematíes de carnero y un factor existente en el suero de dichos enfermos. Esta posibilidad la confirmó al comprobar que la reacción se desarrolla utilizando, como soporte, glóbulos humanos de grupo O «cargados» con la correspondiente antiglobulina de conejo. Este hecho se reafirmó cuando consiguió la producción experimental, en el cobayo, de un suero positivo a esta reacción, inyectando cobayos con suero de conejo, o con hematíes de carnero o humanos, previamente «cargados» con el correspondiente antisuero de conejo (Foz A., Nogalski J., Batalla E. y Barceló P., VIII Congress of Rheumatic Dis. Ginebra, 1953). Ante estos datos no cabía duda de que la reacción representaba realmente la reacción entre un factor del suero de los enfermos, el Factor RA, y la globulina gamma de conejo.

Estos hallazgos le sugerieron la hipótesis de que el factor determinante de la positividad de esta reacción podía ser en realidad un anticuerpo contra la propia globulina gamma, anticuerpo que reaccionase cruzadamente con la de otras especies animales, especialmente la de conejo. Esta posibilidad la demostró ingeniosamente al comprobar que los sueros positivos aglutinaban a brucelas «cargadas» con anticuerpo humano anti-*Brucella*, incompleto, es decir, con globulina gamma humana que hoy sabemos que es la IgG (Foz A. y Batalla E., Contemporary Rheumat., p. 166. Ed. J. Goslings y H. Van Swaag. Elsevier, Amsterdam, 1956). La importancia que tuvo esta observación se hace patente, si copiamos lo que dice L. E. Glynn al hablar del factor reumatoide en el libro «Clinical aspects of Immunology», de P. C. H. Gell y R. R. A. Coombs en 1963. Describe las diferentes

etapas seguidas para aclarar el mecanismo de la reacción de Waaler-Rose y dice: «Of even greater interest was the discovery that human antisera could be used for sensitization: Foz and Batalla (1956) used *Brucella* with an incomplete agglutinin of human origin...». El hecho de que el factor RA es un autoanticuerpo antiglobulina gamma del propio sujeto, es un hecho aceptado hoy de una manera general, de un extraordinario interés, que es conocido en todos sus detalles y que ha dado lugar al conocimiento de otros tipos de autoanticuerpos gamma anti-gamma.

El discurso que acabamos de escuchar es otra muestra de la mentalidad científica de Foz. Nos ha expuesto detalladamente los mecanismos que determinan la adquisición y transmisión de la resistencia a los antibióticos por las bacterias, destacando que dependen de modificaciones del genoma, cromosómico o extracromosómico, y que no son adaptaciones fenotípicas que se heredan. Por ello, nos describe la prueba de la fluctuación de Luria y Delbrück, que demuestra en forma clara e ingeniosa que el cambio genotípico, en el caso de una mutación, no depende de la presencia del antibiótico. Insisto en ello porque el hecho de que una población bacteriana, cultivada en presencia de un antibiótico, se transforme en una población resistente, podría interpretarse a simple vista como un dato en favor de la herencia de tipo Lamarckiano, lo que sería totalmente incorrecto. Es, por tanto, un ejemplo de cómo un dato observacional puede ser interpretado erróneamente a nivel conceptual, escollo que el científico debe evitar cuidadosamente.

Establecido que el mecanismo de la adquisición de resistencia a un antibiótico está coordinado genéticamente, ésta debe derivar forzosamente, en última instancia, de la modificación de una proteína-enzima o de una proteína estructural, o bien, de la pérdida o, por el contrario, de la adquisición de la capacidad de síntesis de uno de estos dos tipos de proteínas. No obstante, como casi siempre ocurre con los fenómenos biológicos, esta aparente simplicidad encubre una tremenda complejidad. El propio Foz nos pone un ejemplo, en el caso de los antibióticos de tipo aminoglucósido, que pueden ser inactivados por fosforilización, aectilación o adenilación y de los que, en el momento actual, ya se conocen bien nueve enzimas capaces de realizar alguna de estas reacciones. La penicilina, el antibiótico «princeps», nos proporciona otro ejemplo. Dicho antibiótico contiene un anillo β-lactámico, que es esencial para su actividad. La penicilinasa, cuyos genes determinantes pueden ser cromosómicos o extracromosómicos, es un enzima que rompe dicho anillo y, por tanto, la inactiva; se trata, pues, de una β-lactamasa. Pues bien, de este simple enzima se conocen múltiples formas, con pesos moleculares diferentes, de dependencia cromosómica o extracromosómica, situados en distintas partes de la bacteria y con distinta capacidad de ser liberados de las mismas (Smith J. T. y Wyatt J. M., J. Bact. 117: 931, 1974). A su vez, ciertos derivados de la penicilina, las penicilinas isoxacílicas, además de ejercer por sí mismas una cierta acción antibiótica, potencian las acciones de otras penicilinas, porque inhiben la hidrólisis enzimática del anillo lactámico por las penicilinasas (Strom R., Renzini G., Ravagnan K. y Rossi-Fanelli F., Febs Letters 43: 49,

1974). Como vemos, la historia de un simple enzima inactivador de las penicilinas es muy complicada.

Si, por otro lado, tomamos la historia de los mecanismos de los que depende la acción de los antibióticos, resulta también extraordinariamente compleja. Esta acción puede ejercerse en múltiples niveles de la estructura y metabolismo de las bacterias, como, por ejemplo, desde la pared bacteriana a la síntesis de proteínas. Precisamente las posibilidades de acción sobre esta síntesis demuestran la complejidad de que estamos hablando, ya que dicha acción puede manifestarse a nivel del ADN, del ARN de transferencia, de la de algún aminoácido o de la formación del enlace peptídeo. La penicilina, que antes hemos puesto de ejemplo, es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, acción para la que se han formulado, por lo menos, tres hipótesis a nivel bioquímico. La pared bacteriana es una estructura característica de los procariotes y que no se encuentra en los eucariotes, lo que explica la extraordinaria falta de toxicidad de la misma para los organismos superiores, si descartamos sus posibles acciones de sensibilización, mientras que los antibióticos que actúan sobre la síntesis proteica pueden llegar a ejercer dicha acción en los mismos y por ello producir efectos tóxicos.

En 1922, mucho antes de su descubrimiento de la penicilina, Fleming encontró que en la secreción conjuntival, en el moco nasal y en la saliva existe un enzima; el lisozyma, con propiedades bactericidas para varios gérmenes, pero de una manera especial para el *Micrococcus lysodeikticus*. Este hallazgo fue uno de los factores que le prepararon para que no le pasase desapercibido el efecto del *Penicillium* sobre su placa de cultivo y es curioso que hoy sabemos que la penicilina, como hemos dicho, es un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y también sabemos que el lisozima es un enzima que actúa desintegrando los mucopéptidos de dicha pared bacteriana; es decir, es una muramidasa que hidroliza al ácido murámico componente de la misma. El lisozima se encuentra también en los polinucleares neutrófilos, en los monocitos y en los macrófagos de los tejidos; el contenido en el suero y en la orina de este enzima, depende del recambio de estas células y aumenta en determinados tipos de leucemia (Briere J., Barthelemy J. P., Bachard G. y Fiet J., Clin. Chim. Acta 50: 265, 1974). Dentro de estas células se encuentra en los lisosomas.

Tenemos otros ejemplos del interés de la integridad de la pared bacteriana en la resistencia a los agentes líticos. Mosser y Tomasz (Mosser J. L. y Tomasz A., J. Biol. Chem. 245: 287, 1970) han comprobado que el ácido teicoico de la pared de los neumococos contiene colina y que la unión de esta colina (trimetil-etanolamina) con la alanina del ácido murámico es el punto que determina la lisis del neumococo en presencia de deoxicolato y una amidasa del propio neumococo; si se cultiva el neumococo en presencia del análogo de la colina, la etalonamina, ésta se incorpora en vez de aquélla, la bacteria adquiere una serie de anormalidades fisiológicas y se hace resistente a la lisis inducida por el detergente. El propio neumococo es también un ejemplo clásico de cómo pueden influir las estructuras externas de la bacteria en su inocuidad o patogenicidad. Los neumococos sin

cápsula son fácilmente fagocitados y desintegrados, mientras que los capsulados no son fagocitados y resultan virulentos.

La acción de los antibióticos, como señalaba Foz, no es en múltiples ocasiones bactericida, sino simplemente bacteriostática, es decir, sitúa a la bacteria en condiciones de fisiologismo anormal que la hacen más fácilmente susceptible a los mecanismos de que dispone el macroorganismo para su desintegración, mecanismos que a veces fracasan, pero que en muchas ocasiones juegan un papel fundamental, que no debe subestimarse.

El macroorganismo opone una serie de barreras a la penetración de las bacterias u otros agentes patógenos, algunas de tipo simplemente mecánico, como la piel, y otras más bioquímicas, como el lisozima que acabamos de mencionar. Pero si el microorganismo consigue salvar esas barreras exteriores y penetra en el interior del macroorganismo, éste dispone de un sistema complejo, integrado por distintos mecanismos de respuesta, conocido como sistema inmunitario o de defensa. Personalmente, nos gusta más considerarlo como un sistema de limpieza y desintegración de los materiales extraños que penetran en el organismo por vía parenteral, concepción que es la misma de Grabar, como nos indicó personalmente. En un discurso pronunciado en esta Real Academia de Medicina exponíamos una interpretación en este sentido de la respuesta en anticuerpos. Nos llamaba la atención entonces, y nos la sigue llamando ahora, el hecho de que la acción del anticuerpo sobre el antígeno, incluso en los casos en que inmunológicamente es más efectiva, se reduzca a una simple modificación, más o menos ligera, de la estructura molecular del mismo en el sentido de modificaciones de tipo estérico. Una verdadera desintegración del mismo, o de la célula que lo contenga, no se produce si no es en colaboración con otros sistemas, como el del complemento o de las células T, o bien por la fagocitosis del complejo antígeno-anticuerpo y subsiguiente acción sobre el mismo de los enzimas intracelulares. Por ello nos parece oportuno presentar una breve síntesis de los avances obtenidos en estos últimos años en el conocimiento de este sistema de células fagocitarias encargadas de la captación de las substancias que penetran en el macroorganismo por vía parenteral y del sistema enzimático de que disponen para la final desintegración de las mismas, orientado única y exclusivamente en este sentido, y dejando de lado sus posibles acciones de cooperación en otros sistemas inmunológicos.

El sistema de células con acción fagocitaria incluye a los leucocitos polimorfonucleares, los eosinófilos, los basófilos y los monocitos, que forman un conjunto de células circulantes, y otro conjunto de células no circulantes y algunas de ellas fijas, constituido por los macrófagos de los tejidos, entre los que se encuentran los del bazo, de los alveolos pulmonares y de los ganglios linfáticos y, finalmente, las células de Kupffer del hígado y la microglia del cerebro. Por experiencias de recuperación de animales irradiados con la médula ósea protegida, o irradiados con dosis letales y repoblados con células de médula ósea isogénicas, se conoce que las series eritropoyética, mielopoyética y linfopoyética, pueden regenerarse a partir de una célula primitiva (*stem cell*) medular, lo que ha sido

confirmado más recientemente por marcadores cromosómicos (Wu A. M., Till J. E., Siminovitch L. y McCullock E. A., J. exp. Med. 127: 455, 1968). Ultimamente se han obtenido múltiples datos en favor de que esta célula primitiva tiene la morfología de un linfocito pequeño (Harris P. F., Brit. J. Exp. Parth. 39: 557, 1958, Harris P. F. y Kugler J. H. En «The lymphocyte in immunology and haemopoiesis». Edward Arnold. London, 1967. Host H., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22: 107, 1968); sin embargo, al microscopio electrónico parece que presenta pequeñas diferencias en relación a la mayoría de la población de linfocitos pequeños (Dekkum D. H., Noord M. J., Maat B. y Dicke K. A., Blood 38: 547, 1971, Rubinstein A. S. y Trobaugh F. E., Blood 42: 61, 1973). Por marcado prenatal, o en recién nacidos, con timidina, se ha demostrado la existencia de una subpoblación de linfocitos pequeños en reposo, es decir, con un recambio muy lento (Haas R. J., Bohme F. y Fliedner T. M., Blood 34: 791, 1969, Bohne F., Haas R. J., Fliedner T. M. y Fache J., Brit. J. Haematol. 19: 533, 1970, Hoelzer D., Kunle E., Harris E. B., Fliedner T. M. y Haas R. J., Biomédicine 22: 285, 1975), población que puede identificarse con las *'stem cells'*. La existencia de estas *'stem cells'* pluripotentes, capaces de regenerar a todas estas línas celulares, entre ellas la serie linfoide, tiene un gran interés para la discusión de la procedencia por línea genética o por mutaciones somáticas de la variabilidad específica de estas últimas, aunque en este momento nos interesa en relación con la población de células fagocitarias. La procedencia a partir de las mismas, del conjunto de células fagocitarias circulantes es evidente y también se tienen bastantes datos en favor de que los macrófagos tisulares se originan de los monocitos circulantes, lo que también es interesante en la discusión problemas de maduración-diferenciación de estas poblaciones, pero se tienen dudas en el caso de las células de Kupffer hepáticas (Van Furth R. y Cohn Z. A., J. Exp. Med. 128: 415, 1968, Howard J. G. En «Mononuclear phagocyte». Blackwell Scient. Publ. Oxford, 1970, Brumstetter M., Hardé J. A., Schiff R., Lewis J. P. y Cross C. E., Arch. Int. Med. 127: 1064, 1971, Wisse E. J., Ultrastruct. Res. 46: 499, 1974).

El tiempo de vida mitad de los leucocitos con granulaciones es de unas 6 a 7 horas. Con este dato y calculando el *pool* total de granulocitos sanguíneos se ha estimado que la médula ósea libera en un día 163×10^7 granulocitos/kg (Athens J. W., Raab S. O., Raab O. P., Mauer A. M., Ashenbrucker H., Cartwright G. E., Wintrobe M. M., J. Clin. Invest. 40: 159, 1961). El tiempo de vida de los monocitos se ha calculado en unos 2 a 3 días en animales de experimentación y, en el hombre, de 3 a 6 días. El de los macrófagos de los tejidos no se conoce bien, pero parece que puede oscilar entre días y semanas.

La existencia de granulaciones en los polimorfonucleares se conoce desde los primeros trabajos acerca de los mismos. En relación a su tiempo de aparición en la diferenciación de dichas células, estos gránulos se han clasificado en primarios, secundarios y terciarios. En el hombre, se han identificado, con seguridad, gránulos primarios y secundarios. Los gránulos primarios o azurófilos, aparecen ya en los mielocitos, son electrondensos y contienen un conjunto de enzimas hidrolíti-

cos activos a pH ácidos, o sea que son lo que desde de Duve conocemos como lisosomas. Los gránulos secundarios o específicos de los polinucleares, no contienen hidrolasas ácidas y, por el contrario, contienen fosfatasas alcalinas y la muramidasa o lisozima. Los monocitos circulantes, al diferenciarse a macrófagos tisulares, se enriquecen en lisosomas y por ello son, en general, ricos en hidrolasas y pobres en muramidasa y otros enzimas, como la mieloperoxidasa, de la que los polimorfonucleares son muy ricos, y que juega un papel importante en los mecanismos bactericidas de éstos, que después describiremos.

Los lisosomas son formaciones u «organelas» citoplasmáticas que fueron identificadas inicialmente por de Duve en 1955 en homogenados obtenidos en sacarosa 0,25 molar de hígado de rata, mediante centrifugación diferencial, al comprobar que se concentraban en la fracción microsomal. Se identifican también por microscopia electrónica mediante reacciones histoquímicas (Novikoff A. B. R. «Lysosomes and storage diseases». Academic Press. New York, 1973). Poseen una membrana, que hace que la acción de los enzimas que contienen no pueda manifestarse, si no es previa alteración o ruptura de la misma. Esto puede conseguirse por acciones mecánicas (congelación y descongelación), por la acción de substancias tensiactivas o, simplemente, por shock osmótico; un homogenado de órgano o de células en medio isotónico no es activo, si no se somete a la acción de alguno de estos agentes que rompan dicha membrana. Los lisosomas se forman en el aparato de Golgi y en ciertas partes del retículo endoplásmico. Inicialmente se habían descrito, en los mismos, cuatro enzimas, pero en la actualidad ya se han identificado más de 40. Entre ellos tenemos una fosfatasa ácida, una β-glucuronidasa, una ribonucleasa, una deoxiribonucleasa, la muramidasa y las catepsinas o proteinasas ácidas. Las más estudiadas han sido las fosfatasas ácidas, la β-glucoronidasa y las catepsinas. Estas últimas forman un conjunto de exo y endopeptidasas ácidas, la más abundante de las cuales es una de estas últimas, la catepsina D.

Estas catepsinas o proteinasas ácidas, con pH óptimos de 3 a 5, son las que han sido más estudiadas de estos enzimas, pues ya se conocían antes de la identificación de los lisosomas. En nuestro Instituto las hemos estudiado con la Dra. Tuset, en homogenados de bazo activados por shock osmótico, frente a distintas proteínas. Hemos comprobado que no se aprecian diferencias en su actividad en cuanto a que la proteína sea homóloga o heteróloga (globulina gamma), pero sí existen diferencias según el tipo de proteína. Por ejemplo, la albúmina es hidrolizada con mayor facilidad que la globulina gamma (Gras J., Rev. Esp. Fisiol. 22: 49, 1966, Sanz E., Palacios R., Tuset N. y Gras J., Bioquímica Clín. (Argentina) 7: 3, 1973, Batllé R., Tesis Farmacia, Barcelona, 1974, Segal H. J., Winkler J. R. y Miyagi M. P., J. Biol. Chem. 249: 6364, 1974). Estos datos son interesantes en cuanto a las posibles relaciones entre inmunogenicidad, velocidad de recambio metabólico de las proteínas propias y catabolización de proteínas propias y no propias por estos enzimas; hay, además, otros datos en favor de que estos enzimas lisosómicos son los encargados de la catabolización de todas las sustancias que

les lleguen, sean propias o no propias. Por eso, se les ha llamado también «sacos suicidas».

El sistema de células fagocitarias constituye, pues, un conjunto de laboratorios enzimáticos ambulantes preparados para la captación y desintegración de todas las substancias propias y no propias que penetren en su interior. No sería oportuno exponer el mecanismo, o los mecanismos, de dicha captación e introducción en el interior de la célula, o «endocitosis». Tanto si se trata de moléculas o partículas muy pequeñas, en cuyo caso el fenómeno se le denomina «pinocitosis», como de partículas grandes, en que se le da el nombre de «fagocitosis», se trata de una invaginación de la membrana celular, formando una vesícula o vacuola que engloba la molécula o partícula y que penetra en el citoplasma celular. Esta vacuola (vacuola primitiva, endocitoma o fagosoma) va a fundirse con un lisosoma, de manera que todo el equipo enzimático de éstos penetra en aquéllas.

La fagocitosis es más difícil en medio líquido que en una superficie, especialmente si ésta es rugosa, a la que los macrófagos se adhieren bien, produciéndose una serie de fenómenos de orientación de las organelas citoplasmáticas que la facilitan (Cohn Z. A., Fed. Proc. 34: 1728, 1975). En medio líquido se conocía clásicamente la importancia de las características de superficie y de carga, de la partícula y del medio, y el hecho de que sustancias existentes en el suero normal, pero especialmente en el de los sujetos inmunes, las «opsoninas», la facilitan. En la actualidad sabemos que las opsoninas de máxima efectividad son los anticuerpos específicos y, especialmente interesante, que no actúan simplemente por modificación de la superficie de la partícula o bacteria, sino también porque la molécula anticuerpo sirve de pieza de fijación de las mismas a la membrana del fagocito, a través de su porción Fc, ya que el fagocito posee receptores de membrana para dicha porción. Además, parece que en la membrana del mismo existen también otros tipos de receptores, como, por ejemplo, para segmentos del complemento, por lo que la unión con éste facilitaría la fagocitosis (Huber H., Polley M. J., Linscott W. D., Fudenberg H. H. y Müller-Eberhard H. J., Science 162: 1281, 1968; Quie P. G., Messner R. P. y Williams R. C., J. Exp. Med. 128: 553, 1968; Messner R. P. y Jelinek J., J. Clin. Invest. 49: 2165, 1970; Papadimitriou J. M., J. Path. 110: 213, 1973). De manera que la fijación específica del anticuerpo al antígeno serviría para facilitar su captación no específica por dichas células, su introducción al interior de las mismas y ulterior catabolización; es un dato más en favor del papel bioquímico que atribuíamos al anticuerpo y que discutíamos en el discurso que antes hemos citado. Este efecto sería debido, principalmente, a la IgG. En la IgA no ha podido demostrarse *in vitro* frente a los estafilococos (Wilson J. D., J. Immunol. 108: 726, 1972). Por el contrario, se ha señalado que esta inmunoglobulina, en su forma secretoria, disminuiría la adherencia de los estreptococos a las células epiteliales y por ello dificulta su colonización en las mucosas, lo que tiene efecto protector (Williams R. C. y Gibbons R. J., Science 177: 697, 1972). La proteína C reactiva facilita también la fagocitosis de distintas especies bacterianas (Kindmark C. O., Clin. Exp. Immunol. 8: 941, 1971).

Se ha señalado que la fagocitosis de los complejos bacteria-anticuerpo, complejos antígeno-anticuerpo, agregados proteicos o partículas inertes, puede inducir una liberación de enzimas lisosómicos (Axline S. G. y Cohn Z. A., J. Exp. Med. 131: 1239, 1970; Jacob K. H. A. y Weir D. M., Immunol. 21: 419, 1971; Martin R. R., Crouder J. G. y White A., Inmmunol. 99: 269, 1967; Saito K. y Suter E., J. Exp. Med. 121: 727 y 739, 1965). Personalmente, trabajando en homogenados de bazo de gallina y de conejo, activados por shock osmótico, correspondientes a animales inmunizados y no inmunizados, no hemos encontrado diferencias de actividad en cuanto a las proteinasas ácidas, aunque ello puede ser debido a que en nuestras condiciones de trabajo liberamos previamente toda la actividad enzimática y las diferencias pueden consistir, precisamente, en diferencias de liberación, pero no de actividad total potencialmente liberable (Sanz E., Palacios R., Tuset N. y Gras J., Bioquím. Clín. (Argentina) 7: 3, 1974). Nos referimos a la liberación intracelular de estos enzimas y no a su liberación extracelular por mecanismos de exocitosis, que también se produce.

Los cambios metabólicos que se presentan después de la fagocitosis de bacterias o partículas han sido extensamente estudiados, especialmente en los polinucleares. Se produce un aumento del consumo de oxígeno, de la glucolisis, de la glucogenolisis, de la actividad del shunt de las pentosas (de la hexosa monofosfato), de la producción de ácido láctico, un aumento de la formación de peróxido de hidrógeno y una liberación de mieloperoxidasa. El aumento de la glucolisis y glucogenolisis parecen relacionados con la obtención de energía para la fagocitosis, pero el aumento de la actividad del shunt de las pentosas y la formación de peróxido de hidrógeno están relacionadas entre sí y con la acción bactericida. El camino más probable de la formación de peróxido de hidrógeno pasa a través de la reducción del NADP a $NADPH_2$, por el shunt de las pentosas, y la ulterior reoxidación de este último por la $NADPH_2$-oxidasa, con formación de peróxido de hidrógeno (Sbarra A. J. y Karnovsky M. L., Biol. Chem. 234: 1355, 1959; McRipley R. J. y Sbarra A. J., J. Bact. 94: 1417 y 1425, 1967; Kvarstein B., Scand. J. Clin. Lab. Invest. 25: 337, 1970). La acción bactericida de este peróxido de hidrógeno se desarrolla por su reacción con la mieloperoxidasa activada dando, por una parte, el radical superóxido (O_2^-) y, por otra, liberando yodo inorgánico, a partir de yodo orgánico, yodo inorgánico que es, a su vez, utilizado para la yodinación de las bacterias fagocitadas. En favor de este mecanismo ha podido comprobarse que *E. coli* cultivado en medios óptimos para su enriquecimiento en superóxido-dismutasas es más resistente a la acción bactericida post-fagocitosis (McRipley R. J. y Sbarra A. J., J. Bact. 94: 1425, 1967; Woeber K. A., Doherty G. F. e Ingbar J. M., Science 176: 1039, 1972; Yost F. J. y Fridovich I., Arch. Biochem. Biophys. 161: 491, 1974). Como todos Vdes. saben, el peróxido de hidrógeno no es más que la vulgar agua oxigenada, por lo que, a fin de cuentas, parece que estas células hacen lo mismo que hacía nuestra madre, cuando nos lavaba las heridas o rasguños con agua oxigenada y, después, nos ponía tintura de yodo.

Foz nos ha recordado en su discurso que la enfermedad infecciosa es la con-

secuencia de un proceso dinámico entre el hombre enfermo y el microorganismo productor de la enfermedad y nos señala que al disponerse de substancias antimicrobianas eficaces, este esquema ha de ampliarse en el sentido de la triple interrelación: macroorganismo y microorganismo, macroorganismo y fármaco y fármaco y microorganismo. Nos ha expuesto magníficamente en su discurso la lucha entre el microorganismo y el fármaco, es decir, los mecanismos de adquisición de resistencia del microorganismo al fármaco. Personalmente, acabamos de recordar sintéticamente una faceta de los mecanismos de la lucha entre macroorganismo y microorganismo, concretamente de los sistemas enzimáticos de que aquél dispone para la desintegración de este último. Estos mecanismos de protección del macroorganismo, como indica Foz, son muchas veces fundamentales y cuando fallan, como puede ocurrir en el caso de los mecanismos bactericidas que acabamos de exponer, uno de cuyos ejemplos es la enfermedad granulomatosa crónica, y en los déficits de los enzimas lisosómicos, su fallo puede repercutir también en la falta de eficacia de un antibiótico bacteriostático.

Al principio señalábamos que nos sería fácil poner de manifiesto el acierto de la Academia en elegir a Foz como uno de sus miembros, acierto que después de todo lo que acabamos de señalar resulta evidente. Sin embargo, vamos a aportar otra prueba de ello. En 1958, fue nombrado miembro del Cuadro de Expertos en Brucelosis de la Organización Mundial de la Salud, nombramiento que desde esta fecha hasta la actualidad ha sido repetidamente renovado. En nuestra Academia no existe este requisito, pero si existiese, seguro que, como ha hecho la OMS, su renovación se produciría repetida y constantemente sin la más pequeña duda.

Foz nos ha confesado que se encuentra con la incómoda sensación de que no puede dar ni ofrecer aquello que de él se espera. Me permito afirmar que puede «sentirse», pero que no «está» en esta situación, pues, con toda seguridad puede no tan sólo ofrecer, sino dar con creces lo que la Academia de él espera. Por ello, Excmo. Sr. Presidente, me permito rogarle que, en nombre de esta Real Academia de Medicina, se sirva imponerle la medalla de miembro de la misma.