

R. 14854

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 171 número 7 del libro
correspondiente.

Sevilla, 25 NOV. 1986

El Jefe del Negociado de Tesis,



Mabel González

"EFECTOS DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA SOBRE
LA TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R EN ESCHERICHIA COLI"

TD
P147



Trabajo realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, - Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor, por el licenciado D. RAFAEL PRADOS MOLINA.

Sevilla, Noviembre de 1986.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

CATEDRÁTICO JEFE DEPARTAMENTO

PROF. EVELIO J. PEREA

PROFESORES TITULARES

M.^a VICTORIA BOROBIO

JOSE C. PALOMARES

JAVIER AZNAR

Prof. EVELIO J. PEREA PEREZ, Catedrático de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, como Director, y Profesor JOSE CARLOS PALOMARES FOLIA, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla como Codirector:

CERTIFICAMOS

Que la presente Tesis Doctoral Titulada "EFECTOS DE LAS CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA SOBRE LA TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R EN ESCHERICHIA COLI" ha sido realizada por D. RAFAEL PRADOS MOLINA bajo nuestra dirección, y reúne a nuestro juicio méritos suficientes y originalidad para que su autor pueda obtener con ella el título de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

Y para que conste, expedimos el presente Certificado en Sevilla a diez de noviembre de mil novecientos ochenta y seis.

Prof. Evelio J. Perea

Prof. Jose C. Palomares



A mis Padres.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento, en primer lugar al Prof. D. Evelio J. Perea Pérez, Director de esta Tesis, por sus valiosas sugerencias y orientaciones en la realización del trabajo.

Al Dr. José C. Palomares Folia, codirector de la misma, por su ayuda inestimable en todo el proceso de desarrollo y elaboración del presente trabajo, mi más profundo agradecimiento.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario que de una manera u otra me han ayudado y soportado en la realización de este trabajo, muy especialmente mis compañeros del grupo de Genética.

A Rafael Mañas, que me ayudó con las gráficas, toda mi gratitud.

Y finalmente a todos aquellos que me han animado durante la realización de esta Tesis.

A todos gracias.

INDICE

	<u>Págs.</u>
I.- INTRODUCCION	2
II.- MATERIAL Y METODOS	11
MATERIAL	11
1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS	11
2. PRODUCTOS QUIMICOS Y BIOLOGICOS	13
3. ANTIBIOTICOS	14
4. TAMPONES	15
4.1. Tampón de electroforésis	15
4.2. Tampón fosfato 0.1 M pH 6.0	15
4.3. Tampón fosfato 0.1 M pH 8.0	16
4.4. Tampón Tris-borato	16
5. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS	16
5.1. Medios bases de crecimiento	16
5.2. Medios de aislamiento	16
5.3. Medios de identificación	16
5.4. Medio para la determinación de la sensibilidad a <u>an</u> <u>tibióticos</u>	17
5.5. Otros medios utilizados	17
5.6. Medio para la conservación de microorganismos	17
METODOS	18
1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS USADAS	18
2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS	18

	<u>Págs.</u>
2.1. Método disco-placa	18
2.2. Determinación de la concentración mínima inhibito-- ria	19
2.3. Criterios de sensibilidad y resistencia	20
3. METODO RAPIDO PARA LA DETECCION DE PLASMIDOS	20
4. CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE PLASMIDOS MEDIANTE LA ELA-- BORACION DE UNA RECTA DE CALIBRADO	21
5. DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MUTACION DE RESISTEN-- CIA ESPONTANEA A RIFAMPICINA	22
6. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION	25
7. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA POR CONJUGACION	26
8. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION BAJO TRATA-- TAMIENTO DE LAS CEPAS DONANTES CON AMPICILINA	27
9. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA POR CONJUGACION EN LAS CEPAS TRATADAS CON AMPICILINA	29
10. CURACION DE PLASMIDOS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITO-- RIAS DE AMPICILINA	29
11. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MORFOLOGICAS DE LAS BACTE-- RIAS TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AM PICILINA	30
12. FORMACION DE AGREGADOS BACTERIANOS DURANTE LA CONJUGA-- CION CON Y SIN TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES SUBINHI-- BITORIAS DE AMPICILINA DE LAS CEPAS DONANTES	31
12. 1. Método turbidimétrico	31
12. 2. Método microscópico	32
III.- RESULTADOS	35
1. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS EN LAS CEPAS DE <u>ESCHERICHIA COLI</u>	35
1.1. Antibiograma disco-placa	35
1.2. Método de dilución en agar	35
2. DEMOSTRACION DE LOS PLASMIDOS R EN LAS CEPAS DE <u>E. COLI</u> J53 CON POSTERIOR CALCULO DEL PESO MOLECULAR	37
3. FRECUENCIA DE MUTACION DE RESISTENCIA ESPONTANEA A RI--	

	<u>Págs.</u>
FAMPICINA	37
4. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION	37
5. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION EN LAS CE-- PAS TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPI CILINA	39
5.1. Tiempo de tratamiento antibiótico fijo y cambiando el tiempo de conjugación	39
5.2. Tiempo de tratamiento antibiótico variable y tiempo de conjugación fijo	41
6. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA POR CONJUGACION	41
7. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA BAJO TRATAMIENTO CON CONCEN- TRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA	43
8. COMPARACION ENTRE LAS FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA DE -- LAS CEPAS <u>ESCHERICHIA COLI</u> TRATADAS Y NO TRATADAS CON - AMPICILINA	44
9. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS DE <u>ESCHERICHIA</u> <u>COLI</u> TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AM- PICILINA DURANTE 2, 6, 20 Y 24 HORAS	48
10. CURACION DE PLASMIDOS EN LAS CEPAS TRATADAS CON CONCEN-- TRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA	49
11. ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN LAS CEPAS DE <u>ESCHERICHIA CO</u> <u>LI</u> TRATADAS CON DIFERENTES TIEMPOS DE CONCENTRACIONES -- SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA	51
12. FORMACION DE AGREGADOS BACTERIANOS DURANTE LA CONJUGA-- CION EN LAS CEPAS DE <u>ESCHERICHIA COLI</u> CON Y SIN TRATA--- MIENTO CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.	53
12.1. Método turbidimétrico	57
12.2. Método microscópico	66
IV.- DISCUSION	99
1. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE LAS CEPAS DE <u>ESCHERICHIA</u> <u>COLI</u>	100
2. PESOS MOLECULARES DE LOS PLASMIDOS DETECTADOS	101
3. FRECUENCIA DE MUTACION DE RESISTENCIA ESPONTANEA A RIFAM	

	<u>Págs.</u>
PICINA	101
4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA CONJUGACION Y DE LA - RESISTENCIA ANTIBIOTICA CODIFICADA POR LOS PLASMIDOS PRO- CEDENTES DEL GENERO <u>SALMONELLA</u>	101
5. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION	103
6. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R EN LAS CEPAS DE <u>E. COLI</u> TRA- TADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA DURANTE DOS HORAS	107
7. COMPARACION EN LA FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA DE LAS CE- PAS TRATADAS Y NO TRATADAS CON AMPICILINA	108
8. FACTORES QUE PODRIAN RELACIONARSE CON LA CAPACIDAD DE -- TRANSFERIRSE LOS PLASMIDOS EN CEPAS TRATADAS CON AMPICI- LINA COMO PESO MOLECULAR O RESISTENCIA ANTIBIOTICA QUE - CODIFICAN	109
9. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS TRATADAS CON -- CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA A DIFEREN- TES TIEMPOS	110
10. CURACION DE PLASMIDOS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITO--- RIAS DE AMPICILINA	113
11. ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN LAS CEPAS DE <u>E. COLI</u> TRATA- DAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA ..	115
12. FORMACION DE AGREGADOS BACTERIANOS DURANTE LA CONJUGA--- CION EN LAS CEPAS DE <u>E. COLI</u> CON Y SIN TRATAMIENTO CON - CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA	119
12.1. Método turbidimétrico	119
12.2. Método microscópico	119
V.- CONCLUSIONES	123
VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	127

INTRODUCCION

El rango de acción de los agentes antimicrobianos frente a los microorganismos es ampliamente conocido en la actualidad y va desde cambios metabólicos sin alteraciones morfológicas, cambios en las estructuras internas, alteraciones morfológicas externas, inhibición del crecimiento y por último muerte del microorganismo. Esta amplitud de acción de los antimicrobianos se ha venido expresando en términos de concentración del antibiótico que bien inhibe (efecto bacteriostático) o mata (efecto bactericida) al microorganismo "in vitro". Esta acción antibacteriana ha sido posteriormente confirmada usando los antimicrobianos en infecciones en animales de experimentación "in vivo", antes de extrapolar los resultados, utilizando estos antibióticos en el tratamiento de las infecciones en humanos.

El término más utilizado para determinar la actividad de un antibiótico frente a cualquier bacteria se denomina Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que se define como la más baja concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de un cultivo de 18 horas a 35°C en el que hemos inoculado un número aproximado de 10^5 bacterias/ml. Las unidades de este parámetro se expresan en $\mu\text{g/ml}$.

En los últimos años se ha comprobado que las concentraciones de antibióticos inferiores a la CMI producen alteraciones sobre las bacterias diferentes en un amplio rango a las producidas con la CMI. Estos efectos producidos sobre las bacterias sometidas a concentraciones subinhibitorias de antibióticos pueden ser evaluados observando cambios en la morfología, estructura, bioquímica y tasa de multiplicación bacterianas (1).

Es importante reseñar el término Concentración Antibiótica Mínima -- (CAM) que define la menor concentración de un antibiótico que produce alteraciones morfológicas en la estructura bacteriana (2), disminuye la tasa de -- crecimiento (3)(4) o ambas (5). El término CAM lo podemos definir en dos aspectos diferentes como CAM de "morfología y estructura", que es la menor concentración de antibiótico que produce alteraciones estructurales y morfológicas visibles al microscópio óptico con un aumento de 100.000 o al microscópio electrónico, en comparación con un control crecido en medio libre de antibiótico en las mismas condiciones, o como CAM de "inhibición", que indica la menor concentración de antibiótico que produce una disminución del 90% en la población bacteriana comparada con el control sin antibiótico (4)(6).

Una forma de expresar el efecto de las concentraciones subinhibitorias de antibióticos "in vitro" es examinando la relación existente entre -- CMI y CAM, como definió por primera vez V. Lorian en el caso de la ampicilina frente a Escherichia coli (3).

Los efectos de los antibióticos sobre la morfología bacteriana, empezaron a observarse desde el comienzo del empleo de los mismos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Estos trabajos eran en su mayoría descriptivos y se limitaban a observar la aparición de formas alteradas, inducidas por los antibióticos, en diferentes géneros bacterianos (7)(8).

Posteriormente Lederberg describe largos filamentos de E. coli, que resultaban de la exposición del microorganismo a bajas concentraciones de -- penicilina, la cual inhibía la formación normal de la pared, permitiendo la supervivencia de éste en un medio osmóticamente estable (9). Así mismo se -- comprueba la disminución de la tasa de crecimiento de E. coli inducida por -- concentraciones subinhibitorias de antibióticos (10).

Es, sin embargo recientemente a partir de los años 70 cuando comienza a desarrollarse más profundamente el estudio de los antibióticos empleados a concentraciones subinhibitorias, donde diversos autores destacando entre ellos V. Lorian, hacen un estudio más sistemático de todos los posibles

efectos que dichos antibióticos pueden causar en las bacterias, haciendo incapié en los patógenos más habituales aislados en muestras clínicas (11).

Estas alteraciones morfológicas de las bacterias con producción de largos filamentos o esferoplastos en los bacilos gram-negativos, podría deberse a la inhibición selectiva de la D-alanina carboxipeptidasa, que inhibiría o prevendría la formación de los septos de la pared en las células de E. coli tratadas con benzylpenicilina o ampicilina (12).

Igualmente habría que considerar la afinidad de los antibióticos B-lactámicos por ciertas proteínas de la pared celular, sobretodo sobre las proteínas de unión a penicilinas (PBPs) (13). En el caso de la ampicilina se ha comprobado que actúa principalmente sobre las PBPs Ib y III de Escherichia coli. La primera tiene una acción importante en el crecimiento celular, destacando su papel en la producción de la lisis bacteriana, mientras que la PBP III está íntimamente relacionada con la síntesis del peptidoglicano, permitiendo la septación y división celular. Ambas junto con la PBP II son de gran importancia en la biosíntesis de la pared celular. Es importante reseñar que si la unión de la ampicilina se hace primeramente a la Ib ocurriría la lisis bacteriana, mientras que si se une primero a la III daría lugar a formas alargadas o esferoplastos (14).

Posteriormente se descubrió que las bajas concentraciones de penicilina podrían inhibir tanto la síntesis de proteínas como la del ARN (15). Esto se ha visto confirmado ya que Lorian et al., comprobaron estudiando P. mirabilis sometidos a concentraciones subinhibitorias de ampicilina, que se producía una disminución en el número y distribución de los ribosomas incluso antes de alterarse la morfología de la pared celular (16).

Por otro lado sabemos que en todo proceso infeccioso intervienen una serie de factores que dependen tanto de la capacidad infectiva del microorganismo como de los mecanismos de defensa del huésped. Diversos autores han estudiado como las concentraciones subinhibitorias de antibióticos podrían alterar estos factores. Así se ha estudiado que los cambios morfológicos --

producidos en la pared bacteriana como consecuencia de la acción de los antibióticos B-lactámicos y en menor grado los aminoglicósidos conllevan cambios en la estructura antigénica de algunos bacilos gram-negativos (17)(18).

Otros autores han estudiado como las concentraciones subinhibitorias de antibióticos actúan sobre la adherencia bacteriana utilizando cepas de E. coli, ya que es de sobra conocido como la adherencia de las bacterias a las células humanas es el primer paso indispensable para ejercer su acción patógena. Sin embargo los resultados obtenidos son todavía contradictorios ya -- que algunos antibióticos inhiben la adherencia, mientras otros no la alteran o incluso son capaces de aumentarla (19)(20)(21).

Así mismo, la aplicación en la práctica clínica del tratamiento de - pacientes con concentraciones subinhibitorias de antibióticos se ha visto refrendado con diversos trabajos, comprobándose como las concentraciones subinhibitorias de algunos antibióticos consiguen la resolución de algunos procesos infecciosos en humanos (11)(22).

Esta acción antibacteriana que se ejerce a bajas concentraciones de antibióticos, puede permitir la resolución de la infección al reducir el número de bacterias en un 90% y al inducir cambios morfológicos que podrían hacer o no más susceptible la bacteria a los mecanismos de defensa del huésped como la fagocitosis y acción lítica del suero y del complemento y alterar la capacidad de adherencia del microorganismo (23)(24)(25)(26)(27).

Por otro lado debemos considerar que la aparición de formas anorma-- les de bacterias en muestras clínicas y cultivos de enfermos tratados con antiobióticos, es frecuente en la actualidad y no se debe a ningún artefacto -- del laboratorio ya que muchos pacientes ingresados en el hospital habían recibido previamente terapia antimicrobiana, aunque también esta aparición de formas alteradas bacterianas puedan observarse sin relación con terapia antibiótica (28)(29)(30).

Dentro de los diversos campos de estudio sobre las concentraciones -

subinhibitorias de antibióticos, en nuestro trabajo nos planteamos como éstas podrían afectar a la transferencia de plásmidos R.

El destacado papel que los plásmidos tienen en la actualidad, como una de las más importantes causas de resistencia de las bacterias frente a los antibióticos, es de sobra conocido, destacando como propiedades más significativas de ellos:

1. Están constituidos por ADN extracromosómico con replicación autónoma y capacidad de transferirse de una bacteria a otra.
2. Tienen una gran difusión entre los distintos géneros bacterianos sobretodo en las Enterobacterias, que constituyen parte importante de la flora intestinal humana.
3. Confieren resistencia a antibióticos y por tanto pueden transferir esta capacidad de resistencia antibiótica de una bacteria a otra.

Una de las principales formas de transferencia plasmídica es mediante la conjugación bacteriana. La conjugación es un proceso altamente específico donde el ADN es transferido desde una bacteria donadora a otra receptora por un mecanismo que implica un íntimo contacto célula a célula. La conjugación es determinada casi invariablemente por plásmidos y no por cromosoma bacteriano, ya que está determinada por un grupo de genes usualmente localizados en los plásmidos. Esto implica que los plásmidos se repliquen más frecuentemente que los genes cromosómicos y éstos sean capaces de transferirse a otras bacterias. Existen por tanto una gran cantidad de plásmidos procedentes de muchas bacterias que son conjugativos. La especificación del sistema de conjugación requiere una gran cantidad de ADN, que ocupa aproximadamente la tercera parte del genoma plasmídico. En el caso de los plásmidos F esto equivale a 33 kilobases y esta gran cantidad de información genética puede estar correlacionada con la eficiencia de transferencia por conjugación que puede llegar al 100% incluso en pequeñas mezclas bacterianas (31).

La conjugación está dividida en dos partes: el reconocimiento de las células receptoras por las donadoras que permite la formación de parejas y posteriormente la transferencia física del plásmido. Centrándonos en la ----

transferencia del ADN plasmídico en el proceso de la conjugación, este proceso incluye, inicio de la transferencia en el origen OriT, en la célula donadora, separación de las dos cadenas de ADN, transferencia de una cadena de la célula donadora a la receptora, síntesis del ADN conjugativo en ambas bacterias y recirculación de la cadena replicada dentro de la bacteria formando se el plásmido completo (32).

Los plásmidos se clasifican en diversos grupos de incompatibilidad - en función de que se mantengan de manera estable dentro de una misma célula. Dos plásmidos del mismo grupo no pueden coexistir de modo estable en la misma bacteria por lo que uno de ellos será eliminado y serán por tanto clasificados como pertenecientes al mismo grupo de incompatibilidad. Se cree que este fenómeno refleja una competencia por el lugar específico de unión a la membrana celular. Esta característica ha permitido clasificarlos, conociéndose en la actualidad más de 20 grupos distintos de incompatibilidad (33).

Así mismo las bacterias gram-negativas que poseen plásmidos conjugativos son capaces de sintetizar unos orgánulos extracelulares llamados pilis que son esenciales para el reconocimiento de las células receptoras y para la formación de parejas con ellas, siendo a través de ellos por donde se realiza el paso plasmídico de una bacteria a otra. La formación de estas parejas son el primer paso importante antes de iniciarse la conjugación bacteriana. Este hecho estudiado por diversos autores ha demostrado que las bacterias durante la conjugación forman más que parejas individuales agrupaciones de bacterias donadoras y receptoras, formando grupos o agregados bacterianos.

Estos pilis sintetizados por las bacterias son de diverso tipo y han podido diferenciarse mediante la adsorción con bacteriófagos pili-específicos y también observando su morfología con el microscopio electrónico (34). Los pilis pueden ser rígidos o flexibles, gruesos o delgados. Habiéndose comprobado que los plásmidos que sintetizan pilis rígidos y algunos gruesos flexibles transfieren eficazmente cuando la conjugación se realiza sobre superficie en medio sólido, mientras que los plásmidos que determinan pilis delgados flexibles también pueden transferir eficazmente en medio líquido (35).

En base a lo anteriormente dicho, en nuestro trabajo nos propusimos estudiar como actuaría la ampicilina en concentraciones subinhibitorias sobre la conjugación bacteriana y la transferencia de plásmidos de resistencia. Para ello seleccionamos 14 plásmidos conocidos pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad y que poseían distinto peso molecular. Todos ellos -- eran albergados en una cepa de Escherichia coli J53.

A esta cepa con cada uno de los 14 plásmidos albergados, le determinamos:

1. Comprobación de la sensibilidad antibiótica codificada por estos plásmidos por un método cualitativo (disco-placa) y otro cuantitativo (dilución en agar).

2. Demostración de la existencia de los 14 plásmidos en la cepa estudiada y posterior cálculo de su peso molecular.

3. Frecuencia de transferencia de los plásmidos estudiados. Para ello conjugamos esta cepa portadora de los plásmidos con otra de Escherichia coli Hfr Rif^r de probada capacidad receptora.

a) Previamente a la realización de la conjugación bacteriana, determinamos la frecuencia de mutación de resistencia espontánea a rifamicina a la cepa con los 14 plásmidos estudiados, por ser este antibiótico el marcador cromosómico de resistencia en la cepa receptora.

b) Posteriormente realizamos la conjugación, calculando la frecuencia de transferencia de los plásmidos, con la cepa portadora previamente tratada con concentraciones subinhibitorias del antibiótico. -- Realizado en paralelo con la con los mismos plásmidos usada como control sin tratamiento antibiótico. Hay que destacar que la temperatura de conjugación fué de 35°C en todos, excepto en el caso de los plásmidos R27 y R144, realizada a 25°C.

Este proceso se realizó con dos variantes:

1) Calculando la frecuencia de transferencia de los plásmidos utilizando distintos tiempos de conjugación: 30, 60, 90 y 120 minutos. Tanto en los controles como al tratar la cepa portadora -- con concentraciones subinhibitorias de ampicilina durante dos -

horas.

- 2) Por otro lado cambiando los tiempos de tratamiento de las cepas con ampicilina, que fueron de 2, 6, 20 y 24 horas previas a la realización de la conjugación. En este proceso se utilizaron la mitad de los plásmidos estudiados y se mantuvo el -- tiempo de conjugación de las cepas fijo en dos horas.

4. Afectación de la permanencia de los plásmidos dentro de las células de E. coli al tratarlas éstas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, basándonos en el hecho de que existen diversos antibióticos como rifampicina y novobiocina y algunos agentes químicos que en determinadas con centraciones son capaces de liberar o curar de plásmidos a las bacterias por tadoras de ellos.

5. La afectación de la morfología bacteriana al tratar dichas bacte rias con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, con tiempos de trata miento de 2, 6, 20 y 24 horas.

6. Por último determinamos como se afectaría la formación de agrega dos bacterianos durante la conjugación, en los cuatro tiempos usados, en las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, comparadas con los controles sin antibiótico. Ya que como se ha visto anteriormente la formación de parejas o agregados de bacterias durante la conjugación es el primer paso antes de la iniciación de la transferencia plasmídica.

A tenor de lo anteriormente expuesto consideramos de gran interés -- profundizar en el estudio de las concentraciones subinhibitorias de antibió-- ticos y como éstas pueden afectar al proceso de la conjugación bacteriana, - incluyendo la afectación de la morfología celular, curación o liberación de plásmidos y formación de agregados bacterianos necesarios para la transferen cia de plásmidos de Resistencia que tanta trascendencia tienen en la micro-- biología clínica actual.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

1. CEPAS BACTERIANAS Y PLASMIDOS.

Como cepas donantes se empleó la cepa Escherichia coli J53, portando 14 plásmidos R diferentes de peso molecular conocido y pertenecientes a diferentes grupos de incompatibilidad, cuyas propiedades más significativas aparecen reflejadas en la TABLA 1.

Esta cepa que es de la colección del Departamento de Microbiología del HUS, estaba conservada en leche descremada al 10% en agua destilada a -40°C y fué identificada como perteneciente al género Escherichia coli. -- Esta cepa conteniendo los diversos plásmidos fué cedida originalmente por N. Datta (Royal Postgraduate Medical School, Londres) e Y. Chabbert (Institute Pasteur, París).

CEPA RECEPTORA.

La cepa receptora empleada para los experimentos de conjugación fué:

Escherichia coli Hfr, H, thy, Rif^r (N. Datta, 1977)(36)

CEPAS PATRONES DE SENSIBILIDAD.

Las tres cepas siguientes fueron utilizadas como patrones de -- sensibilidad conocida e invariable en la determinación de la actividad de los antibióticos:

Staphylococcus aureus . . . ATCC 25923

TABLA 1. PLASMIDOS ALBERGADOS EN LA CEPA ESCHERICHIA COLI J53 USADOS EN EL ESTUDIO Y SUS PROPIEDADES MAS SIGNIFICATIVAS.

PLASMIDOS	GRUPO DE INCOMPATIBILIDAD	PESO MOLECULAR (Mda)	RESISTENCIA ANTIBIOTICA	BACTERIA DONDE SE AISLO POR PRIMERA VEZ
R1	F _{II}	62	Am, Cm, Km, Su, Sm	S. paratyphi B
R124	F _{IV}	72	Tc	S. typhimurium
pIP55	C	102	Am, Cm, Gm, Su	K. pneumóniae
R16a	C	106	Am, Km, Su	Providence
R27	H1	112	Tc	S. typhimurium
R144	I _α	62	Tc, Km	S. typhimurium
pIP175	I ₂	46	Am	S. wien
R391	J	38	Am, Km, Nm	P. rettgeri
R387	K	46	Sm, Cm	S. flexneri
R471a	M	52	Am	S. marcescens
p̄IP69	M	47	Am, Km, Tc, Nm	S. paratyphi B
RP1	P	38	Am, Tc, Km	P. aeruginosa
R401	T	108	Am, Sm	P. rettgeri
R6K	X	26	Am, Sm	P. rettgeri

Escherichia coli . ATCC 25922

Bacillus subtilis ATCC 6336

2. PRODUCTOS QUIMICOS Y BIOLÓGICOS.

Acido bórico (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

Agarosa tipo II: Medium EEO (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA).

Azul de Bromofenol (Difco, Michigan, USA)

Bromuro de Etidio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

EDTA Na₂ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

Formaldehido (Panreac, Montplet & Esteban S.L., Barcelona, ESPAÑA).

Fosfato monosódico : PO_4H_2Na (Merck, Dr. Theodor Schuchardt, --- Darmstadt, RFA)

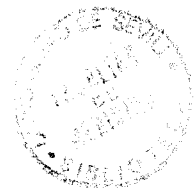
Fosfato disódico : PO_4HNa_2 (Merck, Dr. Theodor Schuchardt, ---- Darmstadt, RFA)

Gelatina (Difco, Michigan, USA)

Lauril sulfato sódico (SDS) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

Lisozima clorhídrica (Sigma, Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

Ribonucleasa A tipo III (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)



Sacarosa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

Sulfato cromo-potásico : $KCr (SO_4)_2 + 12 H_2O$ (Merck, Dr. Theodor Shuchardt, Darmstadt, RFA)

TRIS BASE (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA)

3. ANTIBIOTICOS

Se utilizaron en dos formas diferentes en disco y en polvo valorado.

En disco presentaban las siguientes concentraciones:

Acido Nalidíxico (Nal)	30 µg/ml
Ampicilina (Am)	10 µg/ml
Cloranfenicol (Cm)	30 µg/ml
Estreptomicina (Sm)	10 µg/ml
Gentamicina (Gm)	10 µg/ml
Kanamicina (Km)	30 µg/ml
Neomicina (Nm)	30 µg/ml
Rifampicina (Rif)	30 µg/ml
Sulfadiacina (Su)	300 µg/ml
Tetraciclina (Tc)	30 µg/ml

En la TABLA 2 se muestran los antibióticos utilizados en forma de polvo valorado, así como sus solventes y diluyentes correspondientes.

TABLA 2. Antibióticos usados en la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en agar. Solventes y diluyentes empleados en las soluciones stock de dichos antibióticos en la forma de polvo valorado.

ANTIBIOTICO	SOLVENTE	DILUYENTE
Ampicilina (Am)	Tampón fosfato 0'1 M pH 8	Tampón fosfato 0'1 M pH 6
Cloranfenicol (CM)	Metanol	Agua
Estreptomicina (Sm)	Agua	Agua
Kanamicina (Km)	Agua	Agua
Rifampicina (Rif)	N-N-Dimetil formamida	Agua
Sulfadiacina (Su)	NaOH 0'1 M	Agua
Tetraciclina (Tc)	Agua	Agua

4. TAMPONES.

1. Tampón de electroforésis.

Preparado según Eckhardt, 1978 (37). Su composición es la siguiente:

Tris base (Sigma)	89.0 mM
EDTA Na ₂ (Sigma)	2.5 mM
Acido bórico (Sigma)	89.0 mM

Una vez disueltos todos los componentes en un litro de agua destilada se añadieron 5 µg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma) y se ajustó el pH a 8.2 .

2. Tampón fosfato 0.1 M pH 6.0.

Se prepararon dos soluciones diferentes:

Solución A: PO₄H₂Na (Merck) 0'2 M

Solución B: $\text{PO}_4\text{H Na}_2$ (Merck) 0.2 M

El pH deseado (6.0) se consiguió mezclando 87.5 ml de la solución A, con 12.3 ml de la solución B y se completó con agua destilada -- hasta 200 ml. Esta mezcla se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3. Tampón fosfato 0.1 M pH 8.0.

Partiendo de las soluciones A y B descritas anteriormente, se mezclaron 5.3 ml de la solución A con 94.7 ml de la solución B, completándose hasta 200 ml con agua destilada y esterilizando la mezcla en autoclave durante 20 minutos a 121°C.

4. Tampón Tris-borato.

Fué preparado según Eckhardt, 1978 (37) :

Tris base (Sigma)	89.0 mM
EDTA Na_2 (Sigma)	12.5 mM
Acido bórico (Sigma)	89.0 mM

Se disolvieron los tres componentes en un litro de agua destilada y se ajustó el pH a 8.2 .

5. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.

1. Medios bases de crecimiento.

Agar-sangre enriquecido (AS)

Caldo nutritivo (CN)

Caldo Mueller-Hinton (CMH)

2. Medios de aislamiento.

Agar Mueller-Hinton (AMH)

Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)

3. Medios de identificación.

Agar tres azucares e hierro (TSI)

Agar de citrato de Simmons (AC)

Agar de movilidad (AM)

Agar urea de Christensen (AU)

Agar fenilalanina (AF)

Caldo malonato (CM)

Caldo lisina (CL)

Caldo ornitina (CO)

Agua peptonada (AP)

Reactivos de Kovacs y de Citrato férrico

4. Medio para la determinación de la sensibilidad a antibióticos.

Agar Mueller-Hinton (AMH)

5. Otros medios utilizados.

En el resto de las pruebas realizadas se usaron los medios de cultivo que se especifican en cada una de ellas en el apartado de métodos y que han sido mencionados en los apartados anteriores.

Todos los medios utilizados eran de la marca Difco, Michigan, USA.

6. Medio para la conservación de microorganismos.

Todas las cepas utilizadas se conservaron en leche descremada (Molico) al 10% en agua destilada, y conservadas a -40°C.

METODOS

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LAS CEPAS USADAS.

Los viales con las suspensiones de las cepas conservadas en leche descremada al 10% en agua fueron descongelados, siendo identificadas bioquímicamente dichas cepas como pertenecientes al género Escherichia coli, siguiendo la metódica de LeMinor, 1972 y Edward y Ewing, 1972 (38)(39).

Las 15 cepas fueron identificadas por sus características bioquímicas de:

Fermentación de glucosa y lactosa

No producción de SH₂

No utilización de citrato

No utilización de malonato

Movilidad

No producción de fenilalanina desaminasa

Producción de lisina descarboxilasa

Producción de indol

2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

2.1. Método disco-placa.

A todas las cepas de E. coli se le determinó primero su sensibilidad a antibióticos utilizando el método de disco-placa de Bauer-Kirby, 1966 (40), usando los discos de antibióticos anteriormente citados

y midiendo el halo de inhibición, clasificando de esta forma a las bacterias como sensibles o resistentes.

2.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se define como la más baja concentración de antibiótico que inhibe el crecimiento de un cultivo de 18 horas a 35°C en el que hemos inoculado un número aproximado de 10^5 bacterias/ml. Las unidades de este parámetro se expresan en $\mu\text{g/ml}$.

Siguiendo el método de dilución en agar descrito por Washington y Barry, 1974 (41) y utilizando un aparato replicador descrito por Steer et al., 1959 (42), se determinó la CMI a las 15 cepas de E. coli (donantes y receptora) utilizadas, frente a los antibióticos: Am, Cm, Sm, Km, Rif, Su y Tc.

Preparación del inóculo: De un cultivo de 18 horas en medio agar-sangre enriquecido incubado a 35°C, se resuspendieron de tres a cuatro colonias en caldo nutritivo y se incubaron a 35°C hasta alcanzar 10^8 bacterias/ml aproximadamente.

Las placas conteniendo las diluciones seriadas de antibióticos son inoculadas con 0.001 ml (aproximadamente 3×10^5 bacterias) mediante el replicador de Steer, empezando siempre por la placa que contiene la menor concentración del antibiótico. Se incuban a 35°C durante 18 horas.

Las concentraciones de antibióticos empleadas fueron:

1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 y 2048 $\mu\text{g/ml}$ para Am.

1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 y 256 $\mu\text{g/ml}$ para Cm, Sm, Km y Tc.

64, 128, 256, 512, 1024 y 2048 $\mu\text{g/ml}$ para Su.

12, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$ para Rif.

Como controles de una buena inoculación y viabilidad de las cepas estudiadas, se emplearon placas de medio sin antibiótico al principio y al final de cada serie de antibiótico. Para el control de posibles erro-

res en las diluciones de los antibióticos probados, se inocularon las tres estirpes bacterianas patrones descritas en el apartado de material cuya -- sensibilidad frente a ellos es conocida e invariable.

2.3. Criterios de sensibilidad y resistencia.

Fueron consideradas resistentes las cepas que crecieron en medio que contenía una concentración de Am, Cm, Km o Tc mayor o igual a -- 16 $\mu\text{g/ml}$; de Sm mayor o igual a 32 $\mu\text{g/ml}$; de Rif mayor o igual a 100 $\mu\text{g/ml}$ y de Su mayor o igual a 128 $\mu\text{g/ml}$.

2.4. Determinación de la concentración antibiótica mínima.

La concentración antibiótica mínima (CAM) se define como la menor concentración de antibiótico que produce una reducción del crecimiento del 90% en el número de bacterias/ml de cultivo, comparado con un cultivo control sin antibiótico (3)(6).

Siguiendo el método descrito por Lorian et al. , 1980 (43) cada cepa se incuba en CMH a 36°C durante 18 horas. Se diluye al 1/10 y se toman 0'5 ml de la dilución y se añaden a 200 ml de CMH, incubándose a 36°C durante 105 minutos. Pasado este tiempo se toman 4'5 ml y se le añaden 0'5 ml de CMH y una concentración de Am con rango desde 8 veces la CMI hasta -- 1/128 de la CMI de la cepa probada.

El cultivo control sin antibiótico se prepara de forma similar. Ambos cultivos se incuban a 36°C durante 5 horas y media. Posteriormente -- se hacen diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} de cada cultivo. De cada dilución tomamos 0'2 ml y se siembran en AMH, incubándose a 36°C durante 18 a 24 horas. Al día siguiente realizamos el recuento de las colonias aisladas, determinando la CAM de cada cepa probada.

3. METODO RAPIDO PARA LA DETECCION DE PLASMIDOS.

El método seguido fué descrito por Eckhardt en 1978 (37), basado en la propiedad física de los ADNs cromosómico y plasmático de emigrar a -- distinta velocidad a través de un gel de agarosa sometido a un campo elec-

trico. Para ello, se utilizó una cubeta de electroforésis del tipo 613 X 52, Vertical Slab Unit (Shandon Southern) de placas de gel cuyas dimensiones eran 137 X 174 X 5 mm y cada una de ellas constaba de 12 pocillos de 15 X 10 X 5 mm para la colocación de las muestras.

El gel se preparó con agarosa al 0'8% en tampón tris-borato, pH 8'2. Partiendo de un cultivo bacteriano de 18 horas creciendo en medio sólido se tomaron una o dos colonias (10^6 a 10^7 células) con la parte plana de un palillo de madera esteril y se resuspendieron en 100 μ l de una mezcla de Lisozima (lisozima 7500 U/ml; ribonucleasa A tipo III, 0'3 u/ml; azul de bromofenol al 0'05% y sacarosa al 20%, todo ello disuelto en tampón tris-borato a pH 8'2) que se había colocado previamente en los pocillos de la parte superior del gel. La suspensión se hará ligeramente turbia y se incubará de 2 a 5 minutos a 35°C. Después se añaden con cuidado 100 μ l de una mezcla de SDS al 0'2% en tris-borato y 10% de sacarosa. Se mezcla cuidadosamente con el homogeneizado bacterias-lisozima, permaneciendo las dos capas perfectamente diferenciadas.

Se añade una tercera capa de recubrimiento consistente en 200 μ l de SDS al 2% y sacarosa al 5%, disueltos en tampón de electroforésis, cubriendo posteriormente los pocillos con agarosa caliente (50°C).

Una vez que los compartimentos superior e inferior de la cubeta de electroforésis se llenaron de tampón, se sometió la placa de gel a una corriente eléctrica de 50 mA y 100 V durante 4 horas.

Los geles una vez finalizada la electroforésis se tiñen 10 minutos con una solución de Bromuro de Etidio (5 μ g/ml en tampón tris-borato). Se visualiza usando un transiluminador de rayos ultravioletas tipo C61 (U.V. Products, Inc., San Gabriel, California, USA). Fotografiándose con una cámara Polaroid X70 Land Film, a través de un filtro rojo (Wratten nº 9).

4. CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE PLASMIDOS MEDIANTE LA ELABORACION DE UNA RECTA DE CALIBRADO.

Nos interesaba conocer y comprobar el peso molecular de los plásmidos de las cepas estudiadas, mediante un método sencillo y para ello se procedió a la elaboración de una recta de calibrado, utilizando los pesos moleculares de algunos de los plásmidos estudiados y comparándolos con los hallados en el resto de las cepas estudiadas. Utilizamos como valores conocidos en este proceso los pesos moleculares de los plásmidos: R1 = 62; R27 = 112 ; RP1 = 38 y R6K = 26 Mda. (Figura 1).

Sabemos que la emigración relativa del ADN en el gel de agarosa bajo la corriente eléctrica está inversamente relacionada con el logaritmo del peso molecular del plásmido.

Si representamos sobre un papel logaritmico en ordenadas el peso molecular y en abcisas la movilidad relativa del ADN (Meyers et al., 1976; Macrina et al., 1978; Willshow et al., 1979) (44)(45)(46) de los plásmidos tipo de peso molecular conocido, mencionados anteriormente, conociendo la movilidad relativa de estos plásmidos en una electroforésis determinada y comparándola con sus pesos moleculares, podemos trazar la recta patrón de cada una de las electroforésis y así calcular el peso molecular de todos los plásmidos que se estudian en la misma. (Figura 2).

5. DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MUTACION DE RESISTENCIA ESPONTANEA A RIFAMPICINA.

Las cepas donantes se cultivan a 35°C en caldo nutritivo con agitación hasta alcanzar una cantidad aproximada de 10^8 bacterias/ml.

A partir de estos cultivos se hacen diluciones progresivas en base 10, 1 ml de caldo con bacterias en 9 ml de caldo esteril o de suero fisiológico. Este paso se hace progresivamente hasta 8 diluciones: desde 10^{-1} hasta 10^{-8} .

De cada dilución se toma 0.1 ml se siembra en medio EMB con 100 µg/ml de Rif y 0.1 ml en medio EMB sin antibiótico. Posteriormente se incuban todas las placas a 35°C durante 18 a 24 horas.

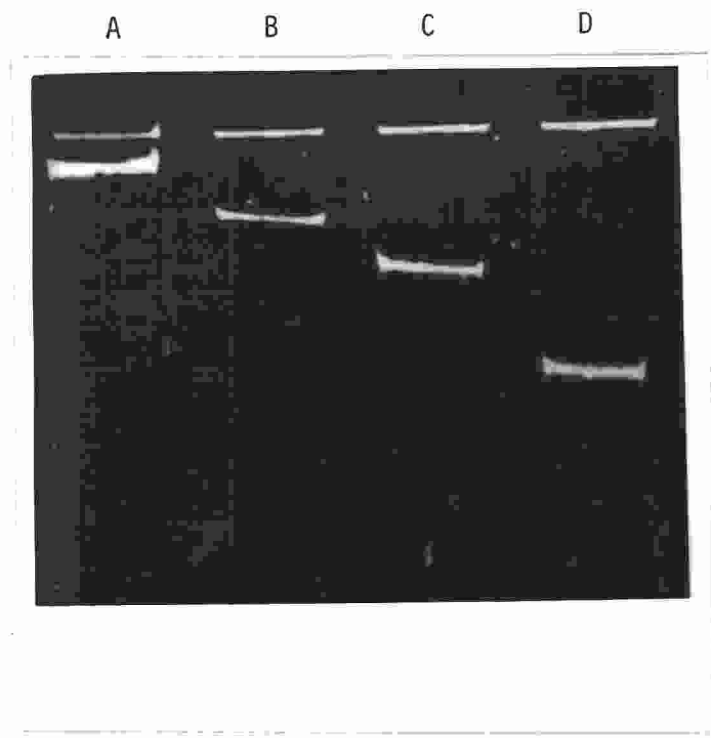


FIGURA 1. Electroforésis en gel de agarosa al 0'8% durante 4 horas a 100 V y 50 mA, donde podemos observar los cuatro plásmidos usados como patrones para calcular el peso molecular, que son: A = Plásmido R27, con peso molecular de 112 Mda; B = Plásmido R1, con peso molecular de 62 Mda; C = Plásmido RP1, con peso molecular de 38 Mda - y D = Plásmido R6K, con peso molecular de 26 Mda.

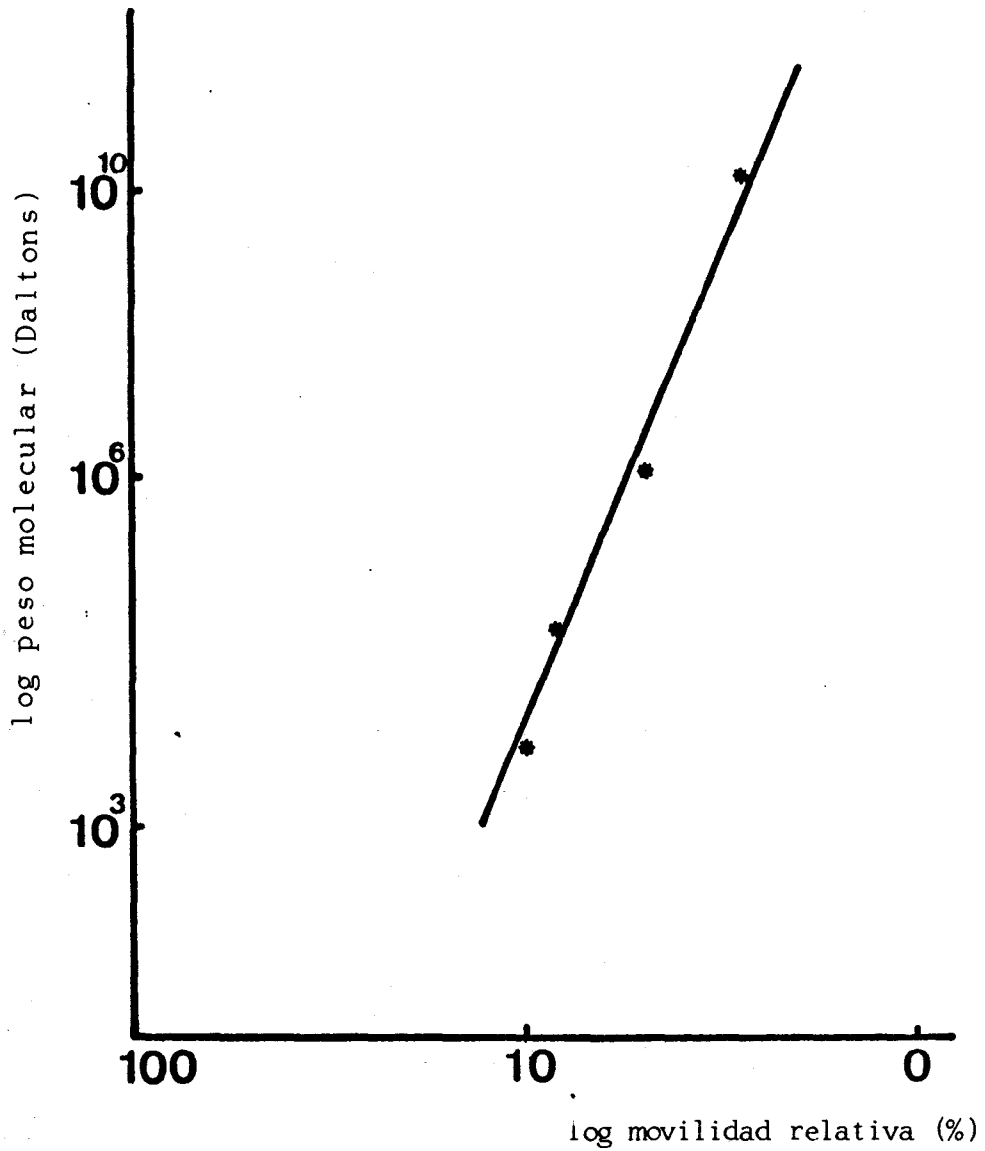


FIGURA 2. Representación gráfica de la movilidad relativa en gel de agarosa al 0,8 % de diversos plásmidos de peso molecular conocido sometidos a electroforesis durante 4 horas a 100 V y 50 mA.

Al día siguiente efectuamos el recuento de colonias de cada una de las placas. El número total de colonias de cada placa multiplicado por el exponente de la dilución y por 10 debe ser equivalente y correspondería al número de bacterias por ml que había en el primer tubo.

Tenemos que considerar:

Cepas originales : Todas son sensibles a Rifampicina.

Cepas mutantes : Todas son resistentes a Rifampicina.

Así por tanto nos encontramos que:

Placas sin Rifampicina : crecen todas las bacterias originales.

Placas con Rifampicina : crecen solamente las mutantes resistentes a dicho antibiótico.

Para calcular la frecuencia de mutación espontánea de resistencia a Rifampicina aplicaremos la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de mutación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Mutantes} / \text{ml}}{\text{N}^\circ \text{ de originales} / \text{ml}}$$

6. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION.

El método seguido para esta experiencia fué el descrito por -- Clowes y Hayes en 1968 (47), con algunas modificaciones de Datta y Hedges en 1972 (48). Las cepas donantes y receptora se cultivan a 35°C en medio líquido con agitación hasta alcanzar una cantidad aproximada de 10^8 células/ml.

Se mezclan en la proporción 1 a 10 (donante - receptora) (Meynell y Meynell, 1970)(49). La mezcla se incuba a 35°C durante 18 horas para permitir el establecimiento de la unión celular y la transferencia de los posibles plásmidos. En nuestros experimentos utilizamos distintos tiempos de conjugación: 30, 60, 90 y 120 minutos; suficientes para la transferencia plasmídica en las cepas de E. coli empleadas. En dos cepas que no conjugaron se les volvió a repetir el proceso pero utilizando como temperatura de

incubación 25°C, ya que los plásmidos de estas dos cepas procedían originalmente de Salmonella (Yoshida et al., 1974; Nakaya et al., 1975) (50) - (51).

La selección de los transconjugantes se hizo con todos los antibióticos a que era resistente la cepa donante y se llevó a cabo inoculando 0'1 ml del cultivo mixto en placas de EMB suplementado con 100 µg/ml de Rif más cada uno de los antibióticos requeridos en función de la resistencia de la cepa donante, a las concentraciones críticas expuestas en el apartado de métodos (2.3). Posteriormente los transconjugantes se comprobaron para los requerimientos nutritivos de la cepa receptora más aquellos otros caracteres codificados por el ADN plasmídico transferido.

7. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA POR CONJUGACION.

Se utilizó el método descrito por Aoki et al. en 1977 (52).

A partir de la mezcla de donantes-receptoras se hacen diluciones en base 10 (de 10^{-1} hasta 10^{-8}). De estas se toma 0'1 ml y se siembra en dos tipos de placas: unas de medio EMB con el antibiótico requerido por cada cepa y otras con dicho antibiótico más Rif.

Dichas placas se incuban a 35°C durante 18 a 24 horas, al cabo de las cuales se determinó el número de colonias de cada placa. Así nos encontramos tres tipos de cepas:

Cepas donantes: todas sensibles a Rif y resistentes a determinados antibióticos.

Cepa receptora: resistente a Rif y sensible a los antibióticos estudiados.

Cepas transconjugantes: resistentes a Rif y a los antibióticos estudiados (tras la conjugación).

Así por tanto nos encontramos que:

Placa con antibiótico: crecen bacterias donantes y transconjugan

tes puesto que ambas son resistentes al antibiótico, no crecen las bacterias receptoras que son sensibles.

Placa con antibiótico y Rifampicina: crecen sólo las bacterias - transconjugantes, ya que las donantes son sensibles a Rif y las receptoras a los otros antibióticos.

Número de donantes / ml: (Nº de donantes + Nº de transconjugantes) - Nº de transconjugantes, todo ello multiplicado por la dilución en que aparezcan las colonias.

Número de transconjugantes / ml: Nº de transconjugantes multiplicado por la dilución en que aparezcan las colonias.

Por último para calcular la frecuencia de transferencia se aplicará la siguiente fórmula:

$$\text{Frecuencia de transferencia} = \frac{\text{Nº de transconjugantes / ml}}{\text{Nº de donantes / ml}}$$

8. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION BAJO TRATAMIENTO DE LAS CEPAS DONANTES CON AMPICILINA.

Se utilizó el mismo método descrito anteriormente (Clowes y Hayes, 1968; Datta y Hedges, 1972) (47)(48), pero introduciendo ciertas modificaciones. Para ello se cultivaron las cepas donantes y receptoras a 35°C en caldo nutritivo con agitación hasta alcanzar una concentración -- aproximada de 10^8 bacterias/ml.

A partir de estos cultivos se realizaron dos procesos distintos:

1. Mantenimiento fijo el tiempo de tratamiento previo con Ampicilina de las cepas donantes que fué de dos horas, se estudiaron cuatro tiempos distintos de conjugación de la mezcla bacteriana: 30, 60, 90 y 120 minutos. Este proceso se realizó en las 14 cepas.

1.1. Para ello las bacterias donantes se sometieron en ese momento al tratamiento con una concentración de Am 1/4 de la concentración capaz de inhibir el crecimiento de la cepa (CMI), durante dos horas.

1.2. Antes de realizar la mezcla para la conjugación, se centrifugaron las suspensiones a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron nuevamente en la misma cantidad de líquido, sin antibiótico.

1.3. Se mezclaron donantes y receptora en la proporción 1 a 10 - (Meynell y Meynell, 1970)(49), incubándose la mezcla en reposo a 35°C o a 25°C (en dos cepas) durante tiempos de 30, 60, 90 y 120 minutos para permitir la transferencia de los plásmidos.

1.4. La selección de los transconjugantes se realizó inoculando 0.1 ml del cultivo mixto en placas de EMB suplementado con Rif y otro antibiótico requerido en función de la resistencia de la cepa donante. Posteriormente los transconjugantes se comprobaron para los requerimientos nutritivos de la cepa receptora, más aquellos otros caracteres codificados por el ADN plasmídico.

2. Se estudiaron cuatro tiempos distintos de tratamiento: 2, 6, 20 y 24 horas con Ampicilina en las cepas donantes, previas a la conjugación. Manteniendo el tiempo de incubación fijo en dos horas de la mezcla donantes-receptoras. Este proceso se realizó en siete cepas.

2.1. Las bacterias donantes se sometieron al tratamiento previo con una concentración de Am 1/4 de sus CMI's respectivas, durante 2, 6, 20 y 24 horas.

2.2. Antes de la mezcla para la conjugación se centrifugaron al igual que en el proceso anterior, para eliminar el antibiótico.

2.3. Se mezclaron donantes y receptora en la proporción 1 a 10 - (49), incubándose la mezcla en reposo a 35°C o a 25°C (en dos cepas) durante dos horas para permitir la transferencia plasmídica.

2.4. Por último se realizó la selección de los transconjugantes

y su posterior comprobación siguiendo el mismo método realizado en el proceso anterior.

9. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA POR CONJUGACION EN LAS CEPAS TRATADAS CON AMPICILINA.

Se realizó este proceso en las cepas tratadas previamente -- con 1/4 de sus CMIs frente a Am, siguiendo el mismo método descrito anteriormente de Aoki et al., 1977 (52).

10. CURACION DE PLASMIDOS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS - DE AMPICILINA.

Las cepas donantes se cultivan a 35°C en CMH con agitación hasta alcanzar una concentración aproximada de 10^8 bacterias/ml. Este proceso se realiza con dos tubos en paralelo. En uno de los tubos cuando se ha alcanzado esta concentración bacteriana se le añade una concentración de Am 1/4 de su CMI por ml de medio, según la cepa a probar y el otro se utiliza como control. Manteniendose ambos tubos a 35°C en incubación durante dos horas.

A partir de ambos tubos se hacen diluciones seriadas en base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-8} . De estas diluciones se toma 0.1 ml y se siembra en placas de AMH sin antibiótico. Estas placas se incuban de 18 a 24 horas.

Al día siguiente de las dos series de placas con microorganismos, tratados y sin tratar con Am, se toman colonias aisladas con un palillo de madera esteril y se inoculan en placas, que hemos dividido en cuadrantes previamente, con AMH sin y con antibiótico al cual es resistente la cepa donante. Posteriormente se incuban ambas placas a 35°C durante 18 a 24 horas.

Al día siguiente realizamos un recuento en paralelo de las colonias crecidas en ambas placas y comprobaremos si existe pérdida de colonias en las placas con antibiótico, comparándolas con las correspondientes en las placas sin antibiótico.

Consideraremos que hay pérdida de plásmidos de una colonia cuando haya crecido la misma en la placa testigo sin antibiótico y no crezca en su correspondiente con el antibiótico, al cual le confería resistencia dicho plásmido.

Para comprobar esto, las colonias que habían crecido en la placa sin antibiótico pero no en la placa con antibiótico, se resuspenden y se vuelven a cultivar en placas sin antibiótico, para la determinación de su CMI, para comprobar si ésta había cambiado frente a su patrón de resistencia determinada por el plásmido que dicha cepa albergaba.

El recuento de todas las colonias nos dará el porcentaje de pérdida de plásmidos de cada cepa sometida a tratamiento con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina.

11. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MORFOLOGICAS DE LAS BACTERIAS - TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

Se realizó utilizando la técnica de crecimiento sobre membrana en medio sólido descrita por V. Lorian en 1980 (11). Los tiempos de tratamiento con concentraciones subinhibitorias de Am fueron de 2, 6, 20 y 24 horas.

Para ello se coloca una membrana filtrante (0.3 μ -poro PHWPO---4750, Millipore Corporation, Bedford, Mass., USA) en una placa de 10 cm de diametro con AMH y se deja unos 10 minutos a temperatura ambiente para que se humedezca la membrana.

De un cultivo de 24 horas a 35°C en CMH se diluye 1/100. Se toma 0.1 ml de la dilución, se pone sobre la membrana y se extiende con un asa de cristal esteril en forma de L. Se incuba la placa a 35°C de 3 a 4 horas para alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se retira la membrana con unas pinzas y se coloca sobre una placa de AMH conteniendo una concentración de Am 1/4 de la CMI de la cepa por ml de medio.

Estas placas se reincubaron a 35°C durante 2, 6, 20 y 24 horas.

EXAMEN MORFOLOGICO: FIJACION Y TINCION DE LAS MEMBRANAS.

Se utilizó la técnica de la huella de membrana descrita por V. Lorian en 1980 (11).

Para ello se coloca un cubreobjetos sobre la membrana, se presiona ligeramente y con unas pinzas finas se retira el cubreobjetos y se agita suavemente para secarlo. Se fija el cubreobjetos al calor con la llama de un mechero y se tiñe con el método de Gram. Después de secado se pone una gota de aceite de inmersión sobre un portaobjetos y se coloca el cubreobjetos boca abajo por la parte teñida sobre el portaobjetos. Se coloca otra gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y se examina al microscópio con 1.000 aumentos.

12. FORMACION DE AGREGADOS BACTERIANOS DURANTE LA CONJUGACION CON Y SIN TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA DE LAS CEPAS DONANTES.

Fué determinada en ambos casos utilizando dos métodos:

1. Método turbidimétrico.

Método utilizado y descrito por G.B. Calleja en 1984 (53). - Para ello se cultivan tanto las cepas donantes como la receptora en CMH a 35°C con agitación hasta alcanzar una concentración aproximada de 10^8 bacterias/ml.

Posteriormente realizamos la mezcla para la conjugación en la proporción 1 a 10 (Meynell y Meynell, 1970)(49), manteniendo la mezcla en reposo durante 30, 60, 90 y 120 minutos, a 35°C.

Al cabo de estos tiempos se agita el tubo conteniendo la mezcla y se mide su adsorbancia en un espectrofotómetro (Spectronic 80, Bausch and Lomb, Analytical Systems Div., USA) usando una longitud de onda de 550 nm, anotando el valor obtenido (A_1). Dejamos los tubos en reposo y al cabo

de 10 minutos volvemos a medir su absorbancia (A_2). La diferencia de valores entre ambos nos dará el índice global de formación de agregados, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de adsorbancia (I.A.)} = A_2 - A_1$$

Lógicamente A_2 será siempre igual o mayor a A_1 .

Este método nos indica el volumen total de agregados que se han formado, pero no nos permite conocer de cuantas bacterias está formado cada agregado, para ello necesitamos un método visual u optico que fué el segundo que utilizamos.

2. Método microscópico.

Este método fué descrito por M. Achtman en 1975 (54).

Para ello se realiza el proceso de incubación y mezcla en las mismas condiciones descritas para el método anterior, utilizando los mismos tiempos de conjugación.

A partir de la mezcla se toma un mililitro en un tubo esteril y se le añade 0'01 ml de Formaldehido (Panreac), manteniendo dicho tubo a temperatura ambiente durante una hora para permitir la fijación de los agregados formados.

Despues de esto, tomamos una gota con una pipeta pasteur esteril (de 0'02 a 0'1 ml aproximadamente) y la colocamos sobre un porta que hemos tratado previamente.

Estos portas se preparan sumergiendolos en una solución que contiene 1% de Gelatina (Difco) y 0'1% de $KCr(SO_4)_2 + 12 H_2O$ (Merck). Una vez sacados de la solución se dejan secar a temperatura ambiente, siendo posteriormente conservados a 4°C.

Los portas antes de utilizarlos se calientan ligeramente (unos

10 minutos a 37°C) antes de depositar la gota de la mezcla sobre ellos, - para permitir una mayor fijación de ésta, luego se dejan secar a temperatura ambiente.

Para la observación microscópica de las muestras, una vez la -- preparación seca se pone una gota de Etanol al 30% sobre ellas, encima se coloca un cubreobjetos y se observan los agregados con un microscopio de contraste de fases usando los objetivos de 400 y 800 aumentos para ver de cuantas bacterias estaban compuestos dichos agregados bacterianos.

En el caso de las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina, el proceso fué el mismo por ambos métodos, pero con una ligera modificación.

Para ello, una vez conseguida una concentración aproximada de - 10^8 bacterias/ml de las cepas donantes, se tratan éstas con una concentración 1/4 de su CMI de Am por ml de medio, durante dos horas. Antes de realizar la mezcla para la conjugación, se centrifugaron las suspensiones a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron nuevamente en la misma cantidad de CMH. Siendo el resto del proceso el descrito anteriormente para los dos métodos.



RESULTADOS

1. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS EN LAS CEPAS - DE ESCHERICHIA COLI.

1.1. Antibiograma disco-placa.

Los resultados de sensibilidad realizados con este método -- cualitativo, mostraron que las 14 cepas donantes eran sensibles a Rifampicina y resistentes a uno o varios antibióticos, coincidente con el patrón de resistencia codificado por el plásmido que albergaba cada una de ellas. Por el contrario la cepa receptora fué resistente a Rifampicina y sensible a todos los demás antibióticos probados.

1.2. Método de dilución en agar.

Los resultados de sensibilidad realizados por este método -- cuantitativo y expresados en valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a los antibióticos estudiados aparecen reflejados en la ---- TABLA 3.

Estos resultados confirmaban los obtenidos con el método disco--- placa y se comprobó, considerando los criterios de sensibilidad y resistencia consignados en el apartado de métodos, que las 14 cepas donantes -- eran resistentes a los diferentes antibióticos y todas eran sensibles a -- Rifampicina. Al contrario la cepa receptora era resistente a Rifampicina y sensible a todos los demás antibióticos.

Destacaremos que de las 14 cepas estudiadas 10 eran resistentes a Ampicilina con una CMI $\geq 256 \mu\text{g/ml}$ y 4 eran sensibles con una CMI $\leq 4 \mu\text{g/ml}$.

TABLA 3. VALORES DE LAS CONCENTRACIONES MINIMAS INHIBITORIAS DE ANTIBIOTICOS DE LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI ESTUDIADAS (EXPRESADOS EN UG/ML).

CEPA	AM	CM	SM	KM	SU	TC	RIF
J53R1	512	> 256	32	> 256	> 2048	< 1	< 12
J53R124	2	8	< 1	< 1	64	64	< 12
J53pIP55	256	> 256	< 1	8	1024	< 1	< 12
J53R16a	1024	8	< 1	> 256	1024	< 1	< 12
J53R27	4	4	< 1	< 1	64	256	< 12
J53R144	2	8	< 1	> 256	64	32	< 12
J53pIP175	512	8	< 1	< 1	64	< 1	< 12
J53R391	1024	4	< 1	256	64	8	< 12
J53R387	2	> 256	32	< 1	64	< 1	< 12
J53R471a	1024	4	< 1	< 1	64	< 1	< 12
J53pIP69	1024	4	< 1	> 256	64	128	< 12
J53RP1	1024	8	< 1	128	64	64	< 12
J53R401	256	8	32	< 1	64	< 1	< 12
J53R6K	1024	8	32	< 1	64	< 1	< 12
Hfr Rif ^r	4	8	< 1	2	64	< 1	> 200

2. DEMOSTRACION DE LOS PLASMIDOS R EN LAS CEPAS DE E. COLI J53 -- CON POSTERIOR CALCULO DEL PESO MOLECULAR.

Realizamos la electroforésis a 100 V y 50 mA, durante 4 horas y utilizando un gel con una concentración de agarosa del 0'8%, se detectó un sólo plásmido en cada una de las 14 cepas estudiadas.

Posteriormente se calculó el peso molecular de los 14 plásmidos encontrados mediante la elaboración de una recta de calibrado. Estos pesos moleculares oscilaron entre tamaños de 26 Mda (R6K) y 112 Mda (R27), y aparecen todos con sus distintos valores en la TABLA 1.

3. FRECUENCIA DE MUTACION DE RESISTENCIA ESPONTANEA A RIFAMPICINA.

Previamente a la realización de la conjugación bacteriana, se determinó la aparición de mutantes espontáneos resistentes a Rifampicina, en las cepas E. coli J53 donantes estudiadas. Ya que siendo Rif el antibiótico utilizado como marcador cromosómico en la cepa receptora para seleccionar los transconjugantes, no fueran estos confundidos con bacterias mutantes espontáneas resistentes a dicho antibiótico.

Los resultados muestran que no se detectó ninguna bacteria mutante espontánea resistente a Rif en las 14 cepas estudiadas, tal como aparecen reflejados en la TABLA 4.

En ellos se observa que esta frecuencia fué siempre inferior a 10^{-8} , dilución máxima empleada en los estudios de conjugación bacteriana, descartándose por tanto la aparición de mutantes espontáneos en todos los procesos de conjugación realizados.

4. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION.

Se realizó la transferencia de plásmidos por conjugación en todas las cepas estudiadas, utilizando como cepa receptora E. coli Hfr, H, thy, Rif^r, de probada capacidad receptora, según el método referenciado anteriormente.

TABLA 4. VALORES DE LA FRECUENCIA DE MUTACION ESPONTANEA A RIFAMPICINA (F.M.R.R.) EN LAS 14 CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 ESTUDIADAS.

CEPA	F.M.R.R.	CEPA	F.M.R.R.
J53R1	$< 5 \times 10^{-8}$	J53R391	$< 2 \times 10^{-8}$
J53R124	$< 2 \times 10^{-8}$	J53R387	$< 5 \times 10^{-8}$
J53pIP55	$< 8 \times 10^{-8}$	J53R471a	$< 9 \times 10^{-7}$
J53R16a	$< 1 \times 10^{-9}$	J53pIP69	$< 5 \times 10^{-8}$
J53R27	$< 4 \times 10^{-8}$	J53RP1	$< 6 \times 10^{-8}$
J53R144	$< 2 \times 10^{-8}$	J53R401	$< 4 \times 10^{-8}$
J53pIP175	$< 7 \times 10^{-8}$	J53R6K	$< 3 \times 10^{-8}$

En todos los casos se realizó el proceso con diversos tiempos de conjugación de la mezcla que fueron: 30, 60, 90 y 120 minutos. Incubándose la mezcla a 35°C de temperatura.

Todas las cepas donantes, excepto dos, transfirieron sus plásmidos ya a los 30 minutos. En las dos cepas que no hubo transferencia en ninguno de los cuatro tiempos, incubadas a 35°C, se les repitió la conjugación con los mismos cuatro tiempos estudiados a 25°C, temperatura en la cual hubo transferencia plasmídica. Dichas cepas eran las J53R27 y J53R144.

Una vez seleccionados los posibles transconjugantes se comprobaron que estos tenían los requerimientos nutritivos de la cepa receptora más los caracteres de resistencia antibiótica codificados por el ADN plasmídico transferido de la bacteria donante, comprobándose que eran auténticos transconjugantes.

5. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION EN LAS CEPAS TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

Este proceso se realizó al igual que el anterior utilizando la misma cepa receptora. Sin embargo como aparece referenciado en el apartado de métodos todas las cepas donantes fueron tratadas, previamente a la conjugación bacteriana, con una concentración de Ampicilina 1/4 de su CMI por ml de medio. Dichas concentraciones aparecen reflejadas en la TABLA 5.

En este proceso se utilizaron dos métodos distintos:

5.1. Tiempo de tratamiento antibiótico fijo y cambiando el tiempo de conjugación.

En este proceso se sometieron las 14 cepas a tratamiento con Ampicilina, durante dos horas y utilizando distintos tiempos de conjugación: 30, 60, 90 y 120 minutos.



TABLA 5. VALORES DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS (SUBCMI) DE AMPICILINA UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LAS 14 CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 ESTUDIADAS (EXPRESADOS EN UG/ML).

CEPA	CMI-AM	SUBCMI-AM	CEPA	CMI-AM	SUBCMI-AM
J53R1	512	32	J53R391	1024	64
J53R124	2	0'12	J53R387	2	0'12
J53pIP55	256	16	J53R471a	1024	64
J53R16a	1024	64	J53pIP69	1024	64
J53R27	4	0'25	J53RP1	1024	64
J53R144	2	0'12	J53R401	256	16
J53pIP175	512	32	J53R6K	1024	64

Los resultados obtenidos mostraron transferencia en 11 cepas (78'57%) en los cuatro tiempos probados, mientras que los controles transfirieron sus plásmidos en todos estos tiempos. En una cepa la J53pIP55 -- (7'14%) no hubo transferencia ni a los 30 ni a los 60 minutos, pero sí la hubo a los 90 y 120. Por último hubo dos cepas (14'28%), las únicas conjugadas a 25°C, que no transfirieron al tratarlas con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina en ninguno de los cuatro tiempos, estas fueron la J53R27 y la J53R144.

5.2. Tiempo de tratamiento antibiotico variable y tiempo de conjugación fijo.

Se utilizaron siete cepas: J53R27, J53R144, J53R391, J53R387, J53R471a, J53RpIP69 y J53R6K, las cuales fueron sometidas a concentraciones subinhibitorias de Ampicilina durante 2, 6, 20 y 24 horas, manteniendo se fijo el tiempo de conjugación que fué de dos horas.

Los resultados de este estudio, mostraron transferencia en todos los tiempos de tratamiento con Am en cinco cepas (71'42%). En dos cepas -- (28'57%) la J53R27 y la J53R144, no hubo transferencia en ninguno de ---- ellos, siendo las dos cepas las únicas conjugadas a 25°C de temperatura.

Una vez seleccionados los posibles transconjugantes se comprobaron estos según los requerimientos nutritivos de la cepa receptora y los caracteres de resistencia antibiótica codificados por el plásmido transferido.

6. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA POR CONJUGACION.

En todas las cepas estudiadas se calculó la frecuencia de ---- transferencia (F.T.), tanto en las cepas controles como en las previamente tratadas con dos horas de Ampicilina, con tiempos de conjugación de 30 60, 90 y 120 minutos. Los resultados aparecen en la TABLA 6.

Los resultados globales de la conjugación de las 14 cepas controles no tratadas oscilaron en los distintos tiempos de conjugación emplea-

dos entre : 5×10^{-2} la más alta F.T. en la cepa J53R16a y 3×10^{-5} la -- más baja en la cepa J53R27. Desglosando los valores en los distintos tiempos de conjugación observamos que oscilaron entre:

A) 30 minutos: Desde 5×10^{-2} (J53R16a) a 6×10^{-5} (J53R27).

B) 60 minutos: Desde 8×10^{-3} (J53RP1) a 3×10^{-5} (J53R27).

C) 90 minutos: Desde 7×10^{-3} (J53pIP55) a 4×10^{-5} (J53R27).

D) 120 minutos: Desde 1×10^{-2} (J53R16a) a 9×10^{-5} (J53R27).

De aquí podemos deducir, que considerando la evolución de los valores de F.T. en los cuatro tiempos, la cepa J53R16a fué la que obtuvo -- una más alta F.T. y la J53R27 la más baja. Considerando los valores de F. T. a lo largo del tiempo de incubación, observamos que:

La cepa J53R1, fué la única cepa que fué aumentando su transferencia conforme aumentaba el tiempo de conjugación.

Las cepas J53R124, J53R27, J53R387, J53RP1, J53R401 y J53R6K, aumentaron su F.T. desde los 30 a los 120 minutos, aunque su aumento no fué continuado a lo largo del tiempo, presentando oscilaciones a los 60 y 90 minutos.

La cepa J53pIP55 tenía el mismo valor a los ~~30~~ y 120 minutos, sin embargo presentó un ligero aumento a los 60 y 90 minutos, que fué su va--lor más alto.

El resto de las cepas: J53R16a, J53R144, J53pIP175, J53R391, J53-R471a y J53pIP69 presentaron un descenso en la F.T. desde los 30 a los -- 120 minutos de conjugación.

Como resultado general destacamos que las cepas J53pIP55, J53R27,

J53R391 y J53R471a, presentaban los valores más uniformes en la F.T. en los cuatro tiempos, siendo sus exponentes idénticos. En el resto de las cepas probadas hubo oscilaciones en los valores entre 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} en las distintas cepas y tiempos de conjugación.

Es de destacar que generalmente todas las cepas conjugaron con una tasa de transferencia relativamente alta y que siempre fué muy superior en cada una de ellas a la frecuencia de mutación de resistencia espontánea a Rifampicina, no pudiendo considerarse nunca los transconjugantes como mutantes espontáneos resistentes a este antibiótico.

7. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA BAJO TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

Los resultados de los valores de la frecuencia de transferencia (F.T.) de las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina durante dos horas, aparecen en la TABLA 6 comparados con sus respectivos controles sin tratamiento antibiótico.

De los 14 plásmidos estudiados dos: R27 y R144 no transfirieron en ninguno de los cuatro tiempos de conjugación estudiados con pérdida de su capacidad de transferir si los comparamos con sus controles sin tratamiento antibiótico. Ambos fueron los únicos albergados en E. coli incubada a 25°C para la conjugación.

En la cepa J53pIP55, no hubo transferencia ni a los 30 ni 60 minutos de incubación pero sí transfirió a los 90 y 120 minutos, aunque con valores mucho más bajos que cuando se realizó sin previo tratamiento antibiótico.

En las 11 cepas restantes hubo transferencia de sus plásmidos en los cuatro tiempos de conjugación.

Globalmente los valores de F.T. fueron inferiores a sus controles

respectivos sin tratamiento antibiótico y oscilaron entre 2×10^{-3} el valor más alto (J53RP1) y 3×10^{-6} el valor más bajo (J53R6K).

Estudiando los distintos tiempos de conjugación los valores de la F.T. oscilaron entre:

- A) 30 minutos: Desde 1×10^{-3} (J53R16a) a 1×10^{-5} (J53R6K).
- B) 60 minutos: Desde 2×10^{-3} (J53RP1) a 6×10^{-6} (J53R401).
- C) 90 minutos: Desde 2×10^{-3} (J53RP1) a 9×10^{-6} (J53pIP55).
- D) 120 minutos: Desde 2×10^{-3} (J53RP1) a 3×10^{-6} (J53R6K).

En estos resultados destacamos que:

Las cepas J53R1 y J53R387 aumentaron progresivamente su F.T. a lo largo del tiempo de conjugación. La cepa J53RP1 aumentó su F.T. de los 30 a los 60 minutos de conjugación, permaneciendo igual a los 90 y 120 minutos. Las cepas J53R124, J53R391 y J53R401, aumentaron su F.T. desde los 30 a los 120 minutos, aunque este aumento no fué progresivo presentando oscilaciones a los 60 y 90 minutos. La cepa J53pIP55, aumentó su F.T., pasando de no transferir a los 30 y 60 minutos a hacerlo a los 90 y aumentar a los 120 minutos de conjugación. La cepa J53pIP175, se mantuvo estable a los 30 y 120 minutos con ligero aumento a los 60 y 90 minutos. Las cepas J53R16a, J53R471a, J53pIP69 y J53R6K, descendieron en sus valores de F.T. desde los 30 a los 120 minutos, con oscilaciones a los 60 y 90 minutos. En la cepa J53R6K hubo el mismo valor de F.T. a los 30, 60 y 90 minutos, con un descenso a los 120 minutos. Por último destacar que las cepas J53R27 y J53R144, las únicas conjugadas a 25°C de temperatura, no transfirieron en ninguno de los tiempos probados de conjugación.

8. COMPARACION ENTRE LAS FRECUENCIAS DE TRANSFERENCIA DE LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI TRATADAS Y NO TRATADAS CON AMPICILINA.

Los resultados comparativos entre ambos valores de F.T. sin y con tratamiento con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina apare-

cen reflejados en la TABLA 6.

En primer lugar destacan las cepas J53R27 y J53R144, que fueron las cepas que se afectaron más profundamente con el tratamiento con Am, hasta el punto de que no transfirieron sus plásmidos en ninguno de los tiempos probados.

La cepa J53pIP55, sufrió un brusco descenso en la F.T. comparada con el control, no habiendo transferencia en los dos primeros tiempos y transfirió con descenso en 3 y 2 exponentes a los 90 y 120 minutos. En esta cepa la F.T. aumentaba al aumentar el tiempo de conjugación.

La cepa J53R401, fué descendiendo su F.T. comparada con el control, de 1 exponente a los 30 minutos hasta 2 a los 90 y 120 minutos, siendo el valor más bajo a los 60 minutos con 3 exponentes más bajos que el control. En general la F.T. fué aumentando al aumentar el tiempo de conjugación exceptuando a los 30 minutos, que fué el valor más alto.

En la cepa J53R6K, la F.T. descendió progresivamente comparada con el control en 1 exponente a los 30 minutos, 2 a los 60 y 90 y 3 a los 120 minutos. En esta cepa la F.T. fué descendiendo al aumentar el tiempo de conjugación.

Las cepas J53R16a y J53pIP69, sufrieron ambas un ligero descenso de 1 exponente en dos tiempos y de 2 en los restantes, comparadas con sus respectivos controles, siendo diferentes entre sí los tiempos en cada una de ellas, el comportamiento global fué similar. Sin embargo la primera se afectaba más la F.T. al aumentar el tiempo de conjugación, mientras la segunda se mantenía uniforme a lo largo del tiempo de conjugación.

La cepa J53R391, sufrió ligera afectación con descenso de 1 exponente en tres de los tiempos de conjugación y de 2 a los 90 minutos, comparada con el control. La F.T. fué aumentando al aumentar el tiempo de conjugación, con excepción de los 90 minutos.

TABLA 6. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 SIN TRATAMIENTO Y TRAS TRATAMIENTO (*) CON AMPICILINA DURANTE DOS HORAS, CON TIEMPOS DE CONJUGACION DE 30, 60, 90 Y 120 MINUTOS.

CEPA	30 M	60 M	90 M	120 M
J53R1	6×10^{-4}	9×10^{-4}	2×10^{-3}	4×10^{-3}
J53R1*	3×10^{-4}	5×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-3}
J53R124	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-3}	9×10^{-4}
J53R124*	8×10^{-5}	7×10^{-4}	9×10^{-4}	7×10^{-4}
J53pIP55	3×10^{-3}	6×10^{-3}	7×10^{-3}	3×10^{-3}
J53pIP55*	---	---	9×10^{-6}	4×10^{-5}
J53R16a	5×10^{-2}	3×10^{-3}	6×10^{-3}	1×10^{-2}
J53R16a*	1×10^{-3}	3×10^{-4}	7×10^{-5}	1×10^{-4}
J53R27	6×10^{-5}	3×10^{-5}	4×10^{-5}	9×10^{-5}
J53R27*	---	---	---	---
J53R144	4×10^{-3}	2×10^{-3}	7×10^{-4}	5×10^{-4}
J53R144*	---	---	---	---
J53pIP175	2×10^{-3}	4×10^{-4}	5×10^{-4}	3×10^{-4}
J53pIP175*	3×10^{-4}	5×10^{-4}	5×10^{-4}	3×10^{-4}

TABLA 6. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 SIN TRATAMIENTO Y TRAS TRATAMIENTO (*) CON AMPICILINA DURANTE DOS HORAS, CON TIEMPOS DE CONJUGACION DE 30, 60, 90 Y 120 MINUTOS.

CEPA	30 M	60 M	90 M	120 M
J53R391	5×10^{-3}	6×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}
J53R391*	2×10^{-4}	3×10^{-4}	4×10^{-5}	5×10^{-4}
J53R387	5×10^{-4}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	1×10^{-3}
J53R387*	3×10^{-5}	2×10^{-4}	4×10^{-4}	8×10^{-4}
J53R471a	7×10^{-3}	3×10^{-3}	2×10^{-3}	1×10^{-3}
J53R471a*	9×10^{-4}	8×10^{-4}	1×10^{-4}	2×10^{-4}
J53pIP69	3×10^{-2}	2×10^{-3}	3×10^{-3}	2×10^{-3}
J53pIP69*	5×10^{-4}	3×10^{-4}	5×10^{-5}	4×10^{-4}
J53RP1	4×10^{-4}	8×10^{-3}	5×10^{-3}	7×10^{-3}
J53RP1*	4×10^{-4}	2×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}
J53R401	4×10^{-4}	3×10^{-3}	3×10^{-3}	2×10^{-3}
J53R401*	1×10^{-5}	6×10^{-6}	1×10^{-5}	9×10^{-5}
J53R6K	3×10^{-3}	9×10^{-4}	3×10^{-3}	5×10^{-3}
J53R6K*	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	3×10^{-6}



Tanto la cepa J53R387 como la J53R471a se afectaron uniformemente en un sólo exponente en los cuatro tiempos comparadas con sus controles, pero en la primera aumentaba la F.T. al aumentar el tiempo de conjugación, mientras que en la segunda ocurrió el proceso inverso haciéndose ésta cada vez más baja.

La cepa J53R124, disminuyó en 1 exponente en los tres primeros -- tiempos, igualándose al control a los 120 minutos, ya que la F.T. fué aumentando al aumentar el tiempo de conjugación.

La cepa J53pIP175, sufrió poca afectación de la transferencia --- plasmídica, ya que sólo descendió ésta en 1 exponente a los 30 minutos, - igualándose al control posteriormente, ya que la F.T. aumentó con el tiem po de conjugación.

Por último las cepas J53R1 y J53RP1 apenas sufrieron afectación - con el tratamiento antibiótico, siendo sus valores de F.T. similares a -- los controles sin antibiótico.

Relacionando la afectación de la F.T. con la sensibilidad de la - cepa portadora del plásmido frente a ampicilina, obtuvimos que de las 10 cepas resistentes a Am, siete se afectaron en diferente grado y tres no - se afectaron, mientras que las cuatro cepas sensibles, se afectaron todas con diferente grado con el tratamiento con concentraciones subinhibito--- rias de Ampicilina. Siendo dos de estas cepas las únicas que no transfi-- rieron en ninguno de los cuatro tiempos estudiados.

9. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI - TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA DURANTE 2, 6, 20 Y 24 HORAS.

En este proceso se utilizaron la mitad de las cepas estudiadas estas fueron: J53R27, J53R144, J53R391, J53R387, J53R471a, J53pIP69 y J53 R6K.

El criterio de selección para escoger estas siete cepas se basó - en primer lugar en su sensibilidad frente a Am, siendo tres de estas cepas sensibles y cuatro resistentes a dicho antibiótico y en segundo lugar observando su comportamiento cuando se trataron solamente con dos horas - de concentraciones subinhibitorias de Ampicilina.

Los resultados de la F.T. en las siete cepas aparecen en la TABLA 7.

Tanto la cepa J53R27 como la J53R144, se comportaron exactamente igual que al tratarlas con sólo dos horas de Am, no habiendo transferencia plasmídica cuando ampliamos el tiempo de tratamiento a 6, 20 y 24 horas.

En las cinco cepas restantes sí hubo transferencia aunque ésta se vió muy afectada comparada con los controles sin antibiótico. Destacando una mayor afectación de la F.T. al aumentar los tiempos de tratamiento -- con concentraciones subinhibitorias de Am. De las cinco cepas, tres la -- J53R387, la J53pIP69 y la J53R6K, sufrieron un descenso mayor de la F.T. a las 20 horas, una la J53R391 a las 24 horas y la restante la J53R471a - a las 6 horas de tratamiento con concentraciones subinhibitorias de Am.

En general podemos resumir que la F.T. disminuyó al aumentar el - tiempo de tratamiento con Am, caso que ocurrió en cuatro cepas, o mante-- nerse más o menos estable con valores descendidos como ocurrió en una cepa. Por último se confirmó que las dos cepas que no transfirieron al tratarlas durante dos horas con Am tampoco lo hicieron al aumentar los tiempos de tratamiento con dicho antibiótico, siendo estas dos cepas J53R27 y J53R144 las únicas conjugadas a 25°C de temperatura y las que no transfirieron de las siete cepas estudiadas.

10. CURACION DE PLASMIDOS EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

Hemos tratado de comprobar el efecto que las concentraciones

TABLA 7. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN SIETE CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA DURANTE 2,6,20 Y 24 HORAS.

CEPA	CONTROL	2H	6 H	20 H	24 H
J53R27	9×10^{-5}	---	---	---	---
J53R144	5×10^{-4}	---	---	---	---
J53R391	1×10^{-3}	5×10^{-4}	8×10^{-6}	1×10^{-5}	5×10^{-6}
J53R387	1×10^{-3}	8×10^{-4}	6×10^{-7}	4×10^{-7}	5×10^{-6}
J53R471a	1×10^{-3}	2×10^{-4}	7×10^{-6}	2×10^{-5}	2×10^{-5}
J53pIP69	2×10^{-3}	4×10^{-4}	1×10^{-4}	4×10^{-5}	4×10^{-4}
J53R6K	5×10^{-3}	3×10^{-6}	9×10^{-7}	5×10^{-7}	2×10^{-6}

subinhibitorias de Ampicilina tienen sobre la curación de plásmidos y su permanencia dentro de la cepa de E. coli que los albergan, una vez tratada con 1/4 de su CMI de Am por ml de medio, durante dos horas. Los resultados de las 14 cepas aparecen en la TABLA 8.

Estos muestran que el tratamiento con concentraciones subinhibitorias de Am no afectó a 11 de las 14 cepas estudiadas (78'57%), mientras que en las otras tres restantes (21'42%) hubo una pequeña afectación con curación de plásmidos en alguna colonia pero que representaba una mínima afectación. Estas cepas fueron:

La J53R387, fué la única que tuvo también pérdida de plásmidos en el control sin tratamiento antibiótico. Perdiéndose una sola colonia tanto en la placa control como en la previamente tratada con concentraciones subinhibitorias de Am. En total con el número global de colonias plaqueadas 268 en la placa control y 295 en la placa con la cepa tratada con Am, representó un 0'37% de curación de la cepa control y un 0'33% en la cepa tratada con Ampicilina, y siendo esta cepa sensible a dicho antibiótico - con una CMI de 2 µg/ml.

La cepa J53R401, tuvo una pérdida de una colonia de 308 plaqueadas al tratarla con Am y ninguna en la cepa control, lo que representaba una pérdida plasmídica del 0'32% del total de colonias plaqueadas. Esta cepa era resistente a Am con una CMI de 256 µg/ml.

Por último la cepa J53R6K, fué la tercera afectada con pérdida de una colonia de 339 plaqueadas al tratarla con concentraciones subinhibitorias de Am y ninguna en la cepa usada como control, lo cual representaba una pérdida plasmídica del 0'29% del total de colonias plaqueadas. Siendo también resistente a Am con una CMI de 1024 µg/ml.

11. ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI -- TRATADAS CON DIFERENTES TIEMPOS DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

TABLA 8. CURACION DE PLASMIDOS EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA DURANTE DOS HORAS, COMPARADAS CON SUS CONTROLES SIN TRATAMIENTO ANTIBIOTICO. (EXPRESADA EN %).

CEPA	CONTROL	% CURADAS	SUBCMI-AM	% CURADAS
J53R1	0/301	0	0/293	0
J53R124	0/286	0	0/272	0
J53pIP55	0/331	0	0/353	0
J53R16a	0/362	0	0/323	0
J53R27	0/313	0	0/318	0
J53R144	0/308	0	0/306	0
J53pIP175	0/298	0	0/324	0
J53R391	0/267	0	0/263	0
J53R387	1/268	0'37	1/295	0'33
J53R471a	0/252	0	0/303	0
J53pIP69	0/341	0	0/336	0
J53RP1	0/315	0	0/301	0
J53R401	0/305	0	1/308	0'32
J53R6K	0/355	0	1/339	0'29

Las alteraciones morfológicas con alargamiento de las bacterias de E. coli y aparición de esferoplastos fué progresivo y aumentó paralela_lmente al tiempo de exposición de las cepas a la Ampicilina, desde las dos hasta las 24 horas. Los resultados aparecen reflejados en la TABLA 9.

Destacando que a las 24 horas estaban afectadas más del 50% de -- las bacterias en 11 cepas (78'57%) habiendo menor afectación en las tres restantes (21'42%). Hay que destacar sobretodo la cepa J53R471a que pre-- sentó una afectación máxima del 29% de las bacterias a las 24 horas de -- tratamiento, siendo la menos afectada morfológicamente con el antibiótico. Al contrario la cepa que más se afectó morfológicamente fué la J53R27, -- que presentó una alteración del 71% de las bacterias a las 24 horas de -- tratamiento con Ampicilina.

A las 2 horas la media de bacterias afectadas en todas las cepas fué del 19% (s= 5'55), a las 6 horas se afectaron el 32% (s= 6'84), a las 20 horas estaban afectadas el 47% (s= 9'38) y a las 24 horas el 52% ----- (s= 9'81).

Hay que hacer notar que el mayor alargamiento con tamaños superio_res a 20 veces el normal de una bacteria E. coli se logró en las cepas -- J53R27 y J53R144. (Figuras 3 y 4).

Estas cepas eran ambas sensibles a Ampicilina con valores de CMI de 4 µg/ml la primera y 2 µg/ml la segunda y fueron las unicas cepas que no transfirieron sus plásmidos al conjuarlas sin previo tratamiento con Am a 35°C de temperatura, aunque sí lo hicieron a 25°C, siendo también las unicas que no transfirieron sus plásmidos al tratarlas con concentra_lciones subinhibitorias de Ampicilina.

12. FORMACION DE AGREGADOS BACTERIANOS DURANTE LA CONJUGACION EN LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI CON Y SIN TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES - SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

TABLA 9. PORCENTAJE DE ESFEROPLASTOS EN LAS 14 CEPAS DE ESCHERICHIA COLI J53 TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA, DURANTE 2, 6, 20 Y 24 HORAS, COMPARADAS CON UN CONTROL SIN TRATAMIENTO ANTIBIOTICO.

CEPA	CONTROL	2 H	6 H	20 H	24 H
J53R1	3	18	37	52	58
J53R124	8	20	38	62	60
J53pIP55	7	23	40	52	56
J53R16a	10	25	38	41	49
J53R27	6	19	32	60	71
J53R144	4	13	31	45	50
J53pIP175	6	26	40	57	58
J53R391	4	10	18	36	37
J53R387	6	23	34	49	52
J53R471a	3	11	18	29	29
J53pIP69	10	27	37	47	51
J53RP1	5	18	33	53	61
J53R401	4	24	31	35	55
J53R6K	6	17	29	48	52



FIGURA 3 .- Cepa de Escherichia coli J53R27 tratada con una concentración de 0'25 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina (1/4 de su --- CMI) durante 24 horas. Se observan células muy alargadas sin división celular (Esferoplastos \rightarrow) y otros más pequeños junto con bacterias de tamaño normal.

[Faint, illegible handwritten text or bleed-through from the reverse side of the page]



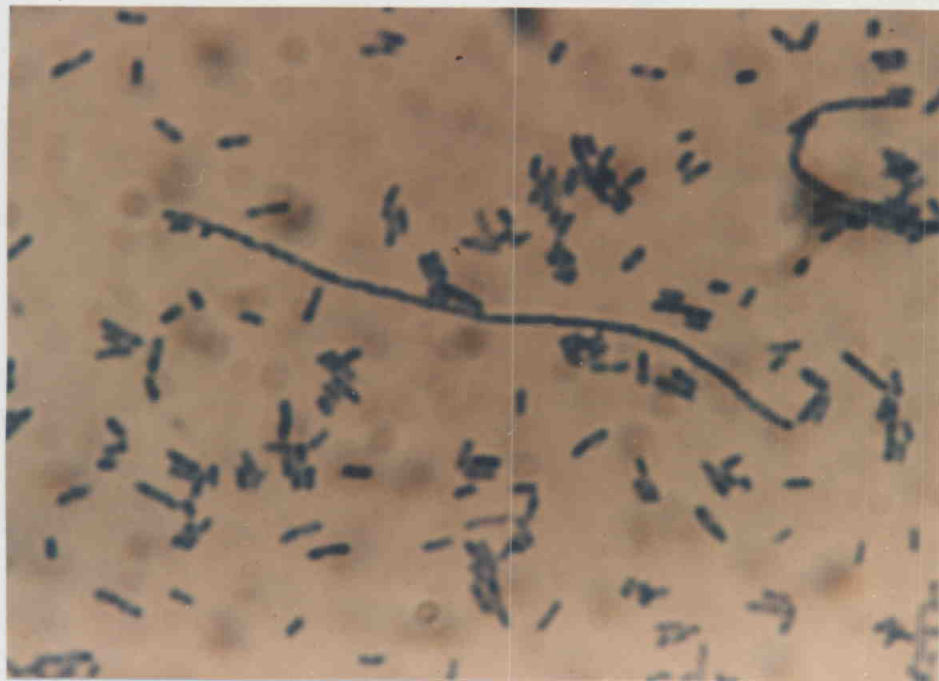


FIGURA 4 .- Cepa de Escherichia coli J53R144 tratada con una concentración de $0.12 \mu\text{g/ml}$ de Ampicilina ($1/4$ de su --- CMI) durante 20 horas. Se observa un Esferoplasto de una longitud 20 veces superior a la célula normal -- (\rightarrow) y otros de menor tamaño aislados o agrupados.

12.1. Método turbidimétrico.

Los resultados de la formación de agregados bacterianos durante la conjugación, aparecen en las Figuras 5 a 18, donde se comparan las cepas de E. coli con y sin tratamiento con concentraciones subinhibitorias de Am durante dos horas, en los cuatro tiempos de conjugación estudiados: 30, 60, 90 y 120 minutos.

Aplicando la fórmula: Índice de Adsorbancia (I.A.) = $A_2 - A_1$

En las Figuras aparecen en abscisas los distintos tiempos utilizados y en ordenadas el I.A. medido con un espectrofotómetro, usando una longitud de onda de 550 nm.

Globalmente se detectó formación de agregados (I.A. > 0.1) en las cepas: J53R1, J53R124, J53pIP55, J53R27, J53R144, J53pIP175, J53R391 y J53R387, ya a los 30 minutos y permaneciendo estos en todos los tiempos determinados tanto en los controles como en las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina.

En las cepas J53R401 y J53R6K, el I.A. fué mayor de 0.1 en todos los tiempos de las cepas tratadas y en tres tiempos de los controles, no detectándose agregados en un tiempo. En la cepa J53RP1 se detectó formación de agregados en tres de los tiempos empleados tanto en los controles como en la cepa tratada, no detectándose en el tiempo restante. En las cepas J53R471a y J53pIP69, el I.A. fué mayor de 0.1 en las cepas tratadas en los cuatro tiempos y en dos tiempos de los controles, no detectándose formación de agregados en los dos tiempos restantes.

Por último en la cepa J53R16a no se detectó formación de agregados por este método en ninguno de los tiempos probados tanto en los controles como en la cepa tratada con Ampicilina.

Destacamos que por este método la detección de agregados bacterianos fué mayor en las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina que en las no tratadas.

FIGURA 5 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R1, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 6 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R124, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 7 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53pIP55, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 8 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R16a, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

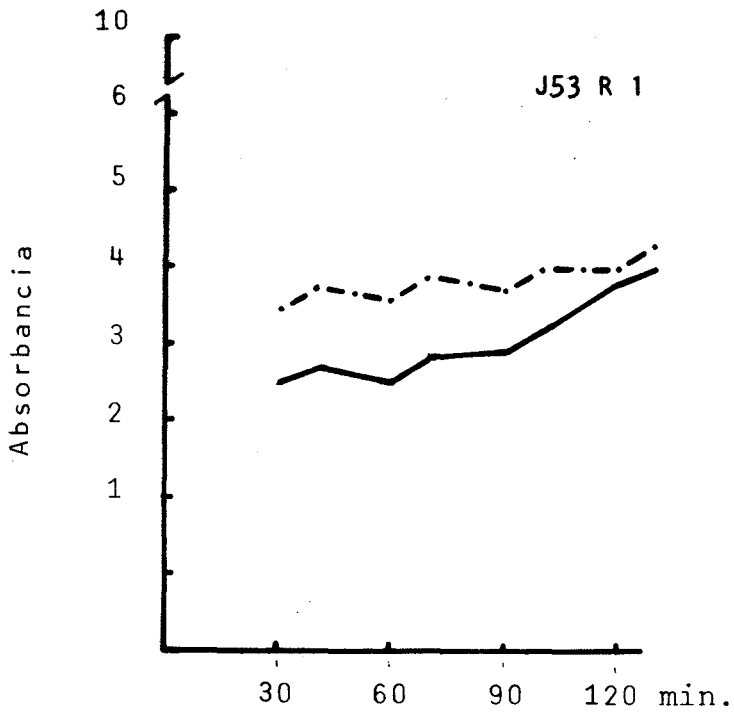


Fig. 5

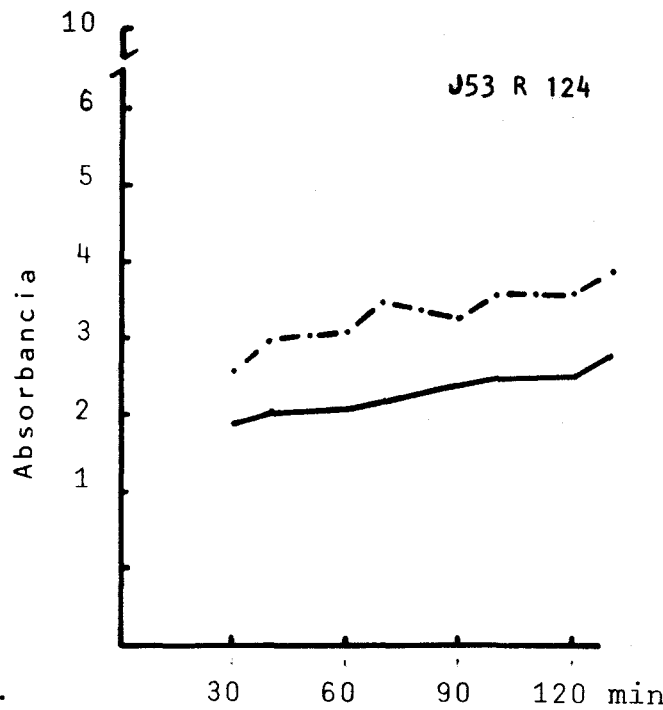


Fig. 6

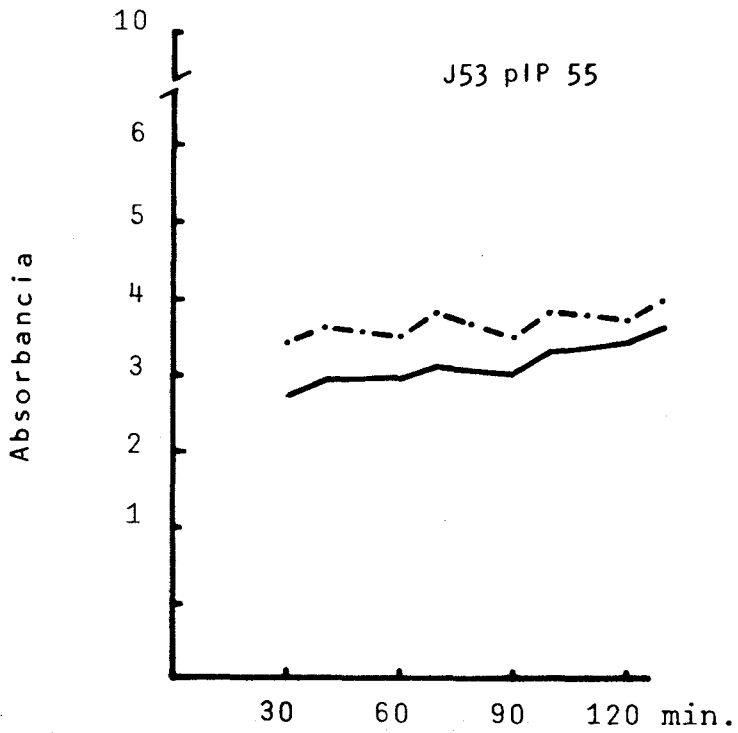


Fig. 7

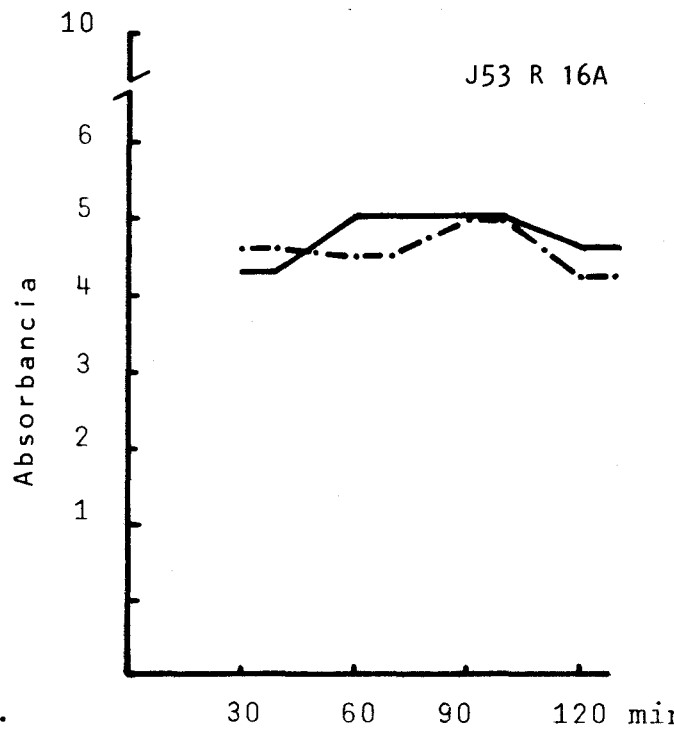


Fig. 8

Control ———
 SubCMIs - · - · -

FIGURA 9 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R27, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 10: Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R144, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 11: Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53pIP175, sin --tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 12: Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R391, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

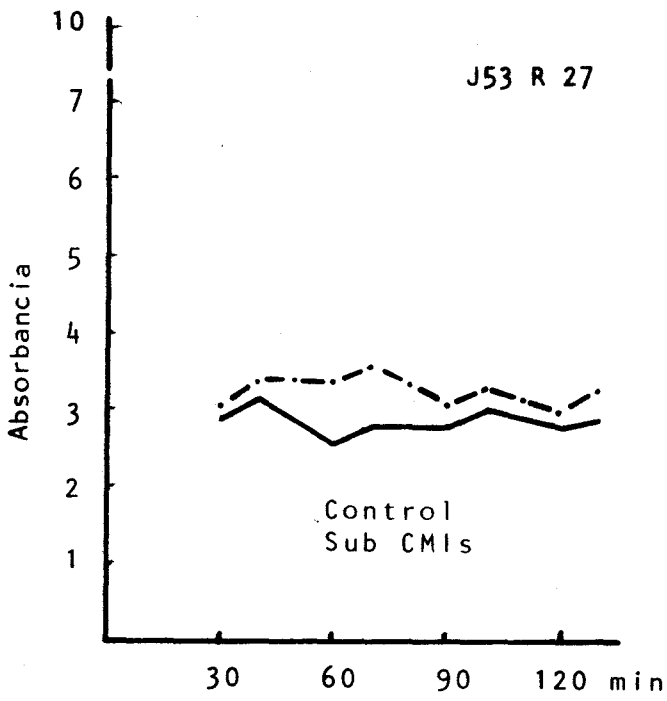


Fig. 9

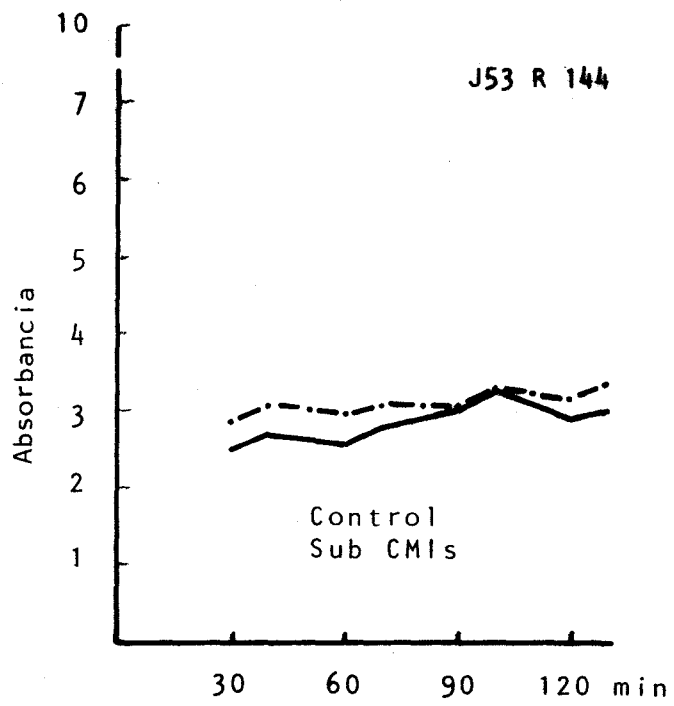


Fig. 10

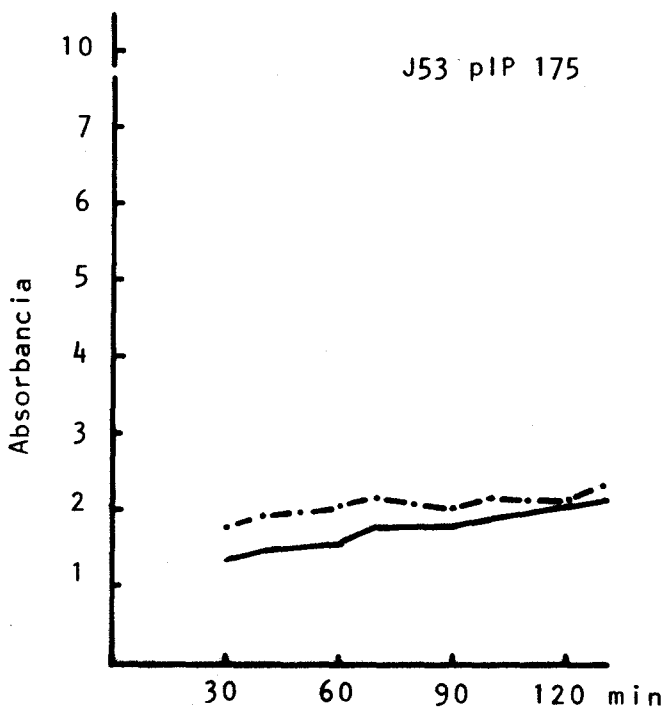


Fig. 11

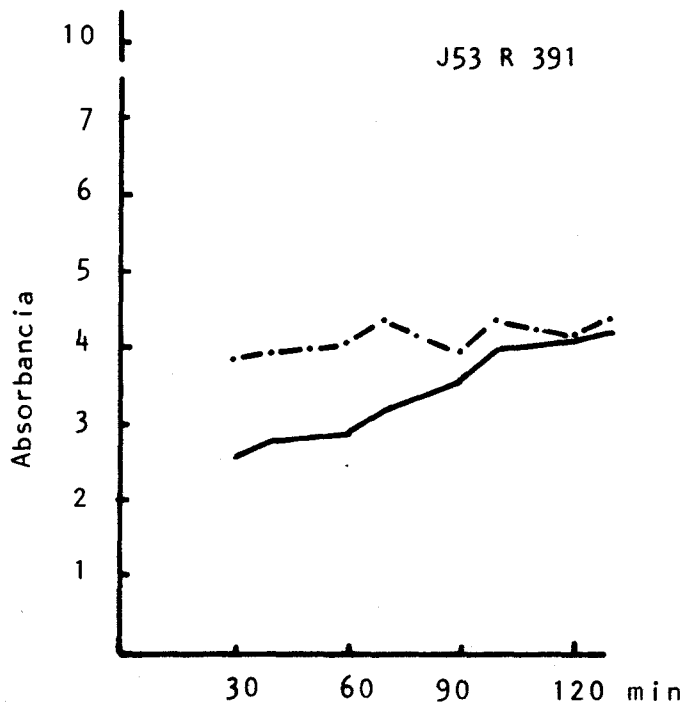


Fig. 12

Control ———
Sub CMIs - - - -

FIGURA 13 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R387, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 14 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R471a, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 15 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53pIP69, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 16 : Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53RP1, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

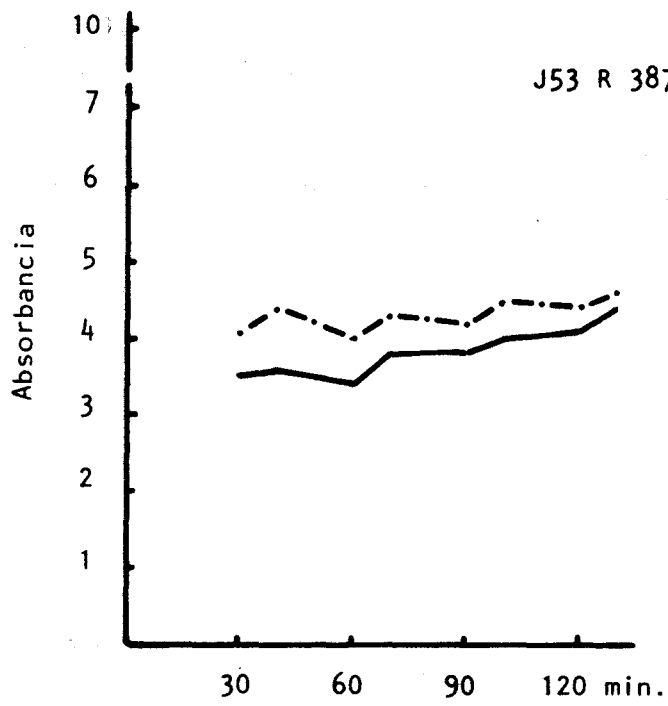


Fig. 13

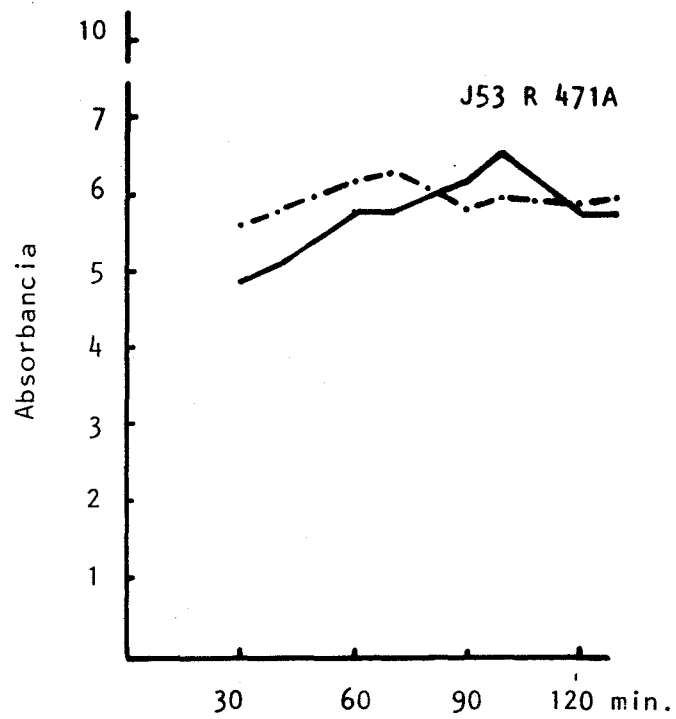


Fig. 14

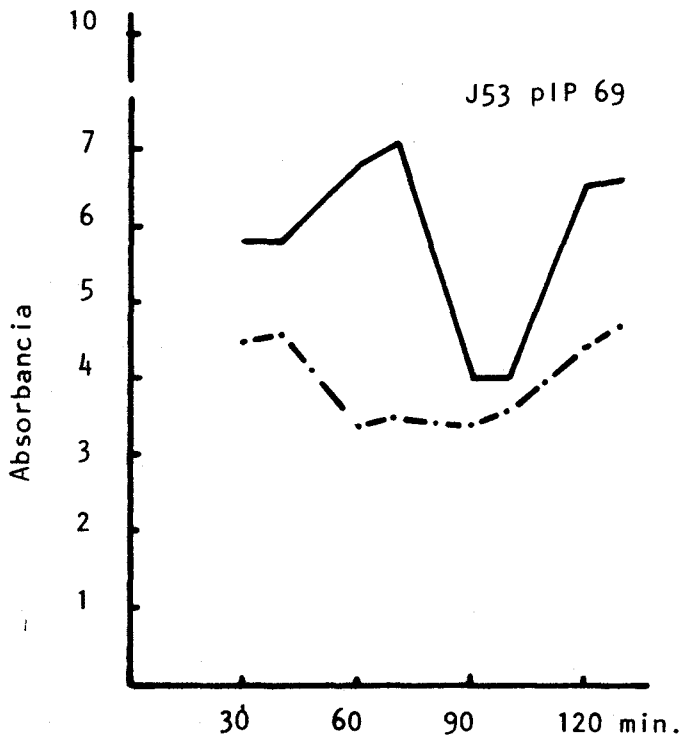


Fig. 15

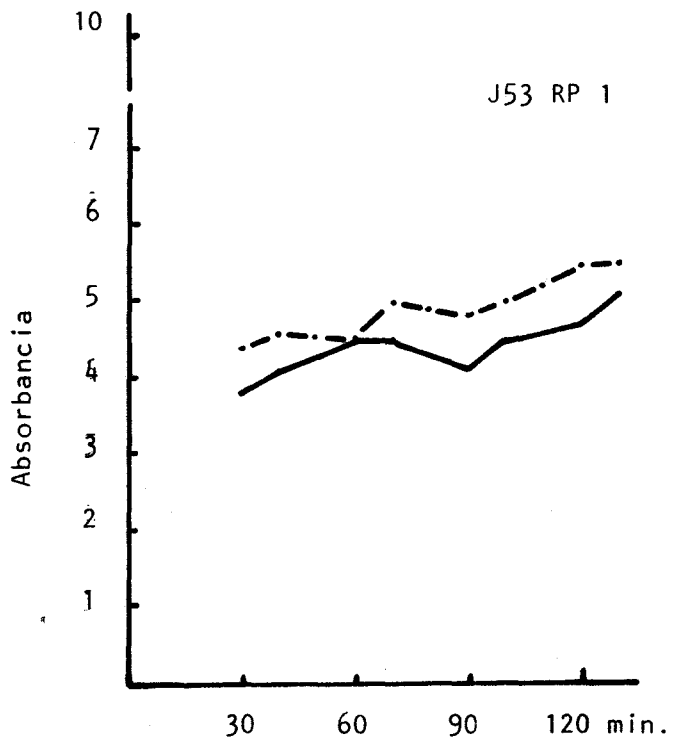


Fig. 16

Control ———
 Sub CMIs - · - · -

FIGURA 17: Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R401, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

FIGURA 18: Evolución de la Adsorbancia en función del tiempo de incubación en un cultivo mezcla de E.coli Hfr y E. coli J53R6K, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas.

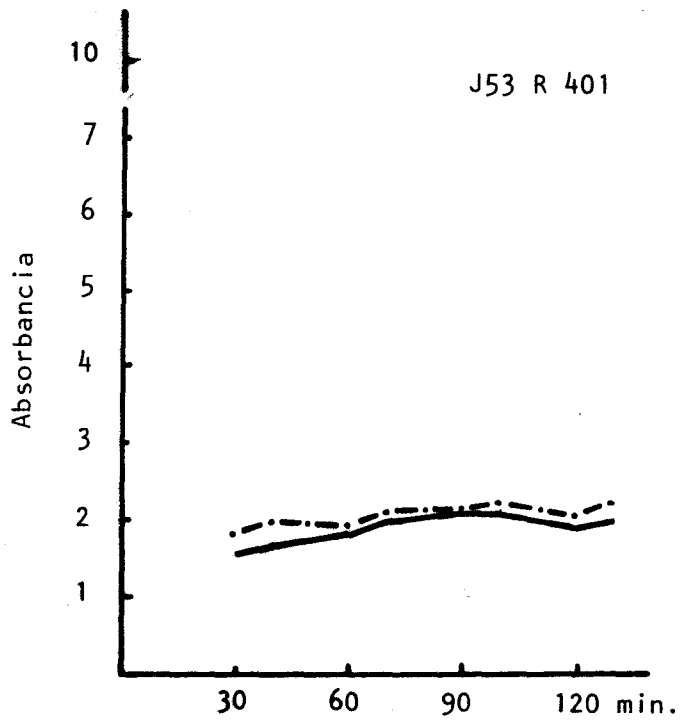


Fig. 17

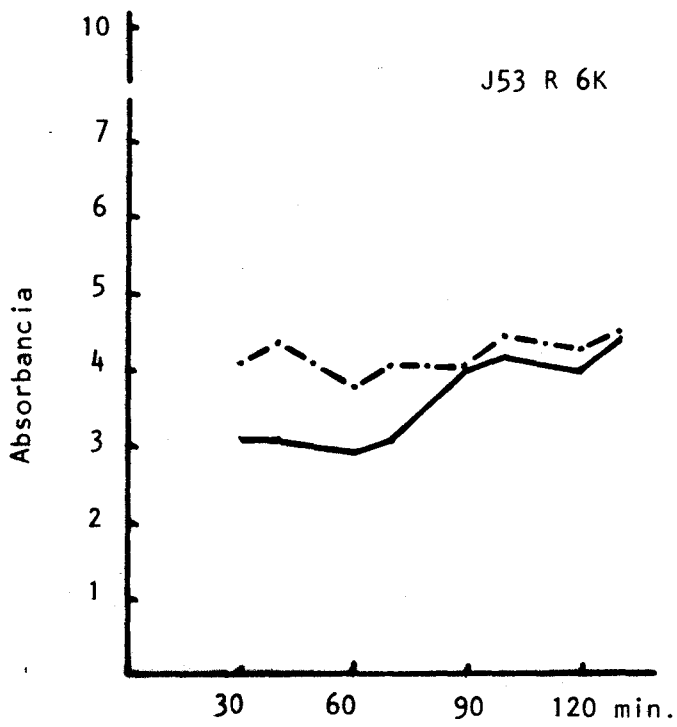


Fig. 18

Control ———
 SubCMIs - - - - -

12.2. Método microscópico.

Con este método observamos la formación de agregados bacterianos durante la conjugación, en los distintos tiempos empleados: 30, 60, 90 y 120 minutos, tal como aparecen en las Figuras 19 y 20. Además estudiamos el número de bacterias que componían dichos agregados, haciendo un recuento de bacterias/agregados en varios campos al microscopio de contraste de fases. Hemos considerado agregados de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 y más de 10 bacterias por agregado.

Los resultados aparecen reseñados en las Figuras 21 a 76. Donde consideramos en abscisas el número de bacterias de que está compuesto cada agregado y en ordenadas el porcentaje de agregados. Posteriormente se trazó una recta patrón que nos indicaba la representación gráfica del conjunto de agregados en cada uno de los cuatro tiempos estudiados de conjugación.

En general considerando las cepas no tratadas usadas como controles y observando su evolución a lo largo de los cuatro tiempos empleados vemos que los agregados son de menor número de bacterias a los 30 que a los 120 minutos. Observándose un aumento de bacterias por agregado al aumentar el tiempo de incubación. Considerando los puntos extremos de la recta trazada, observamos que el porcentaje de agregados de dos bacterias era mayor a los 30 minutos que a los 120, mientras que los agregados con más de 10 bacterias eran poco numerosos a los 30 minutos y aumentaban progresivamente hasta los 120.

Con respecto al efecto de las concentraciones subinhibitorias de Ampicilina sobre el número de bacterias que componían dichos agregados, vemos que con respecto al control sin antibiótico, el número de bacterias de cada agregado no se veía afectado significativamente al tratar la cepa con Am, siendo la recta patrón (Ver Figuras 21 a 76.) equivalente al control, con margenes de diferencia poco significativos. Es decir, en general los agregados eran de mayor número de bacterias a los 120 minutos de incubación que a los 30 minutos, habiendo un aumento progresivo de los



FIGURA 19 .- Mezcla de las cepas Escherichia coli Hfr y Escherichia coli J53R6K, tratada con 64 $\mu\text{g/ml}$ de Ampicilina (1/4 de su CMI) durante dos horas y tras 30 minutos de incubación. Se observa escaso número de agregados bacterianos de sólo dos células y destaca la aparición de un esferoplasto 5 - 6 veces más largo que la célula normal (\rightarrow). Observadas con un microscópio de contraste de fases con objetivo de 40X.

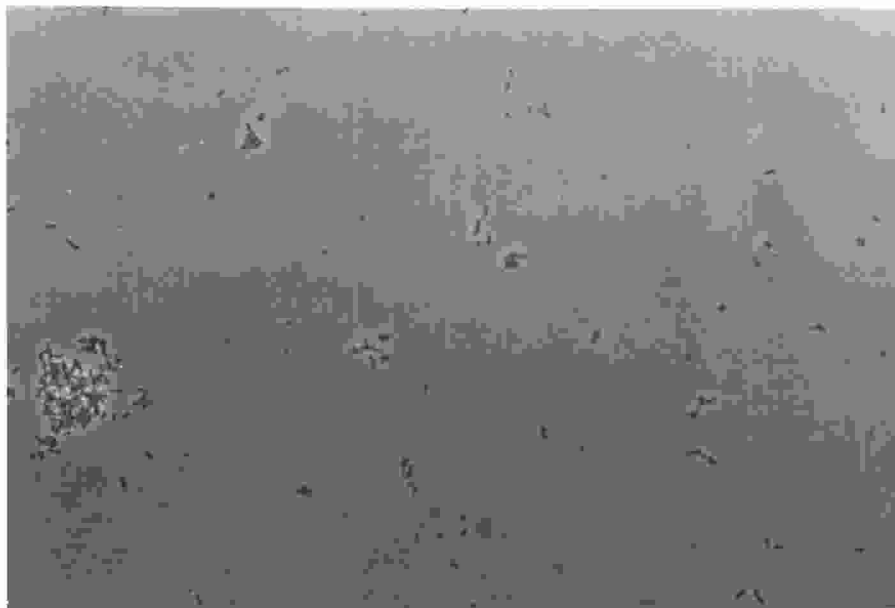


FIGURA 20 .- Mezcla de las cepas Escherichia coli Hfr y Escheri--
chia coli J53R6K, sin tratamiento antibiótico y tras
120 minutos de incubación. Se observan abundantes --
agregados bacterianos de distinto número de células,
junto con algunas bacterias aisladas. Observadas con
un microscópio de contraste de fases con objetivo de
40X.

FIGURAS 21, 22, 23 y 24: Comparación entre el número de agregados versus el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R1, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 minutos.

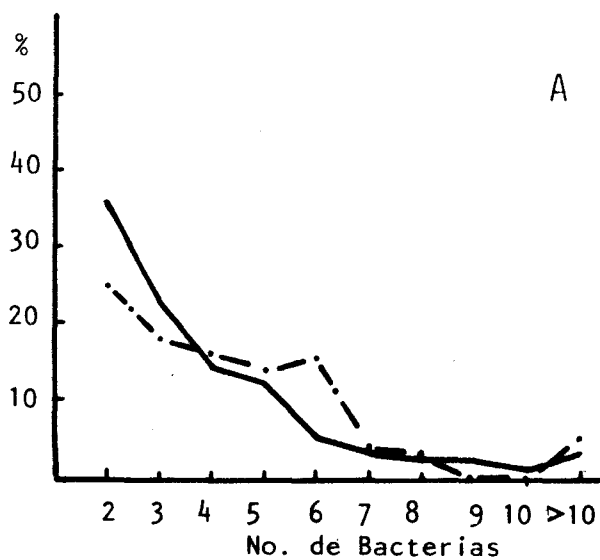


Fig. 21

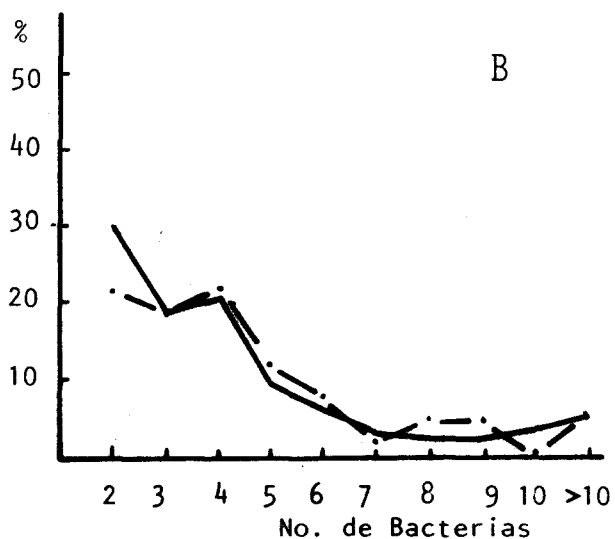


Fig. 22

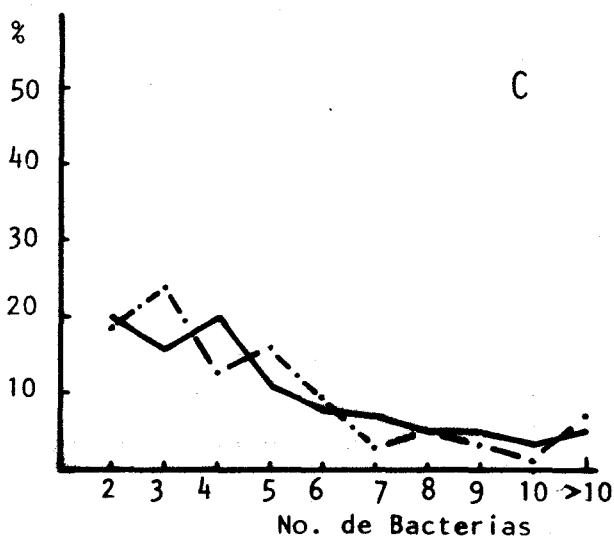


Fig. 23

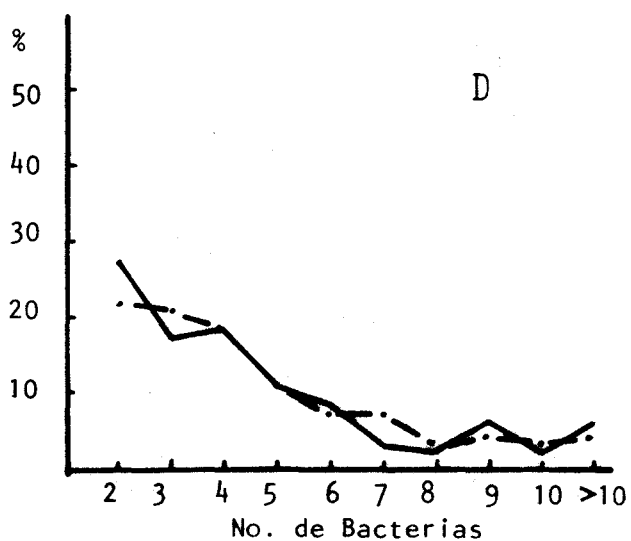


Fig. 24

Control —————
Sub CMIs - . - . - .

FIGURAS 25, 26, 27 y 28: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R124, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

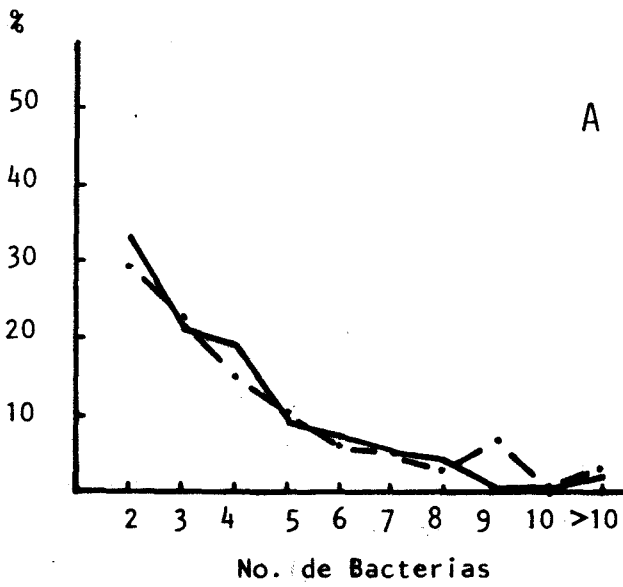


Fig. 25

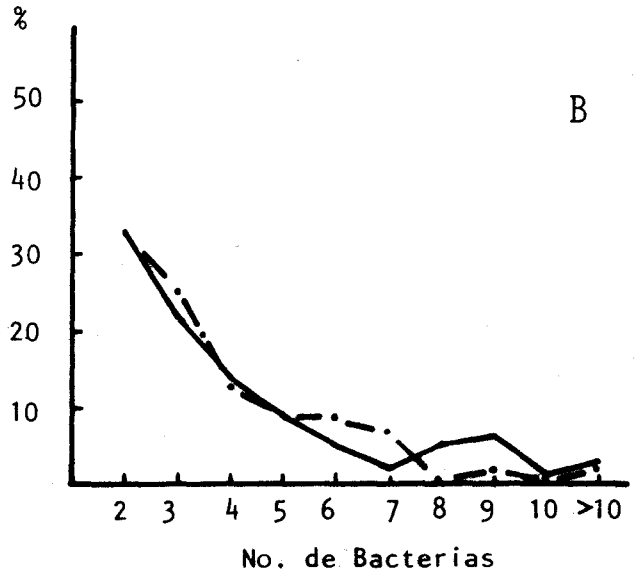


Fig. 26

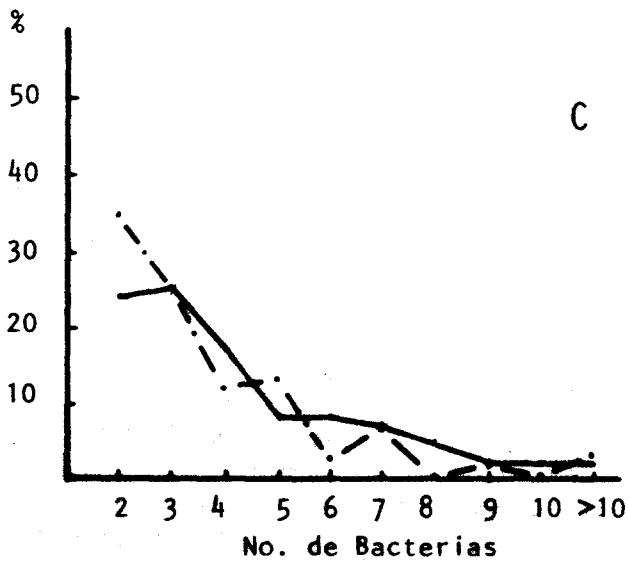


Fig. 27

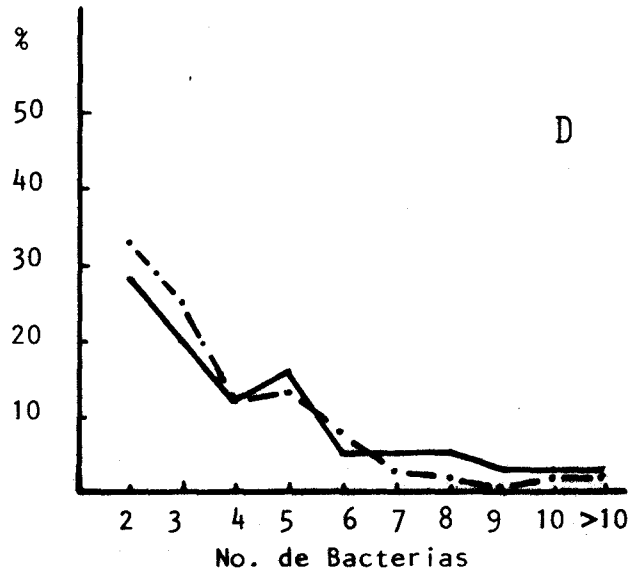


Fig. 28

Control ———
Sub CMI - - - -

FIGURAS 29, 30, 31 y 32: Comparación entre el número de agregados versus el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53pIP55, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 minutos.

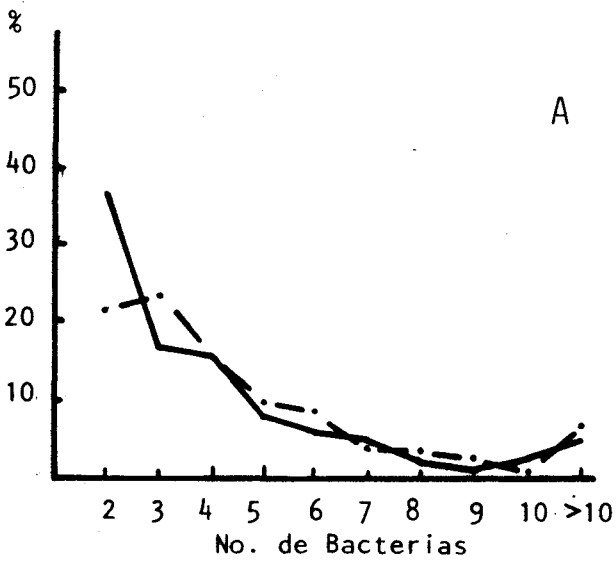


Fig. 29

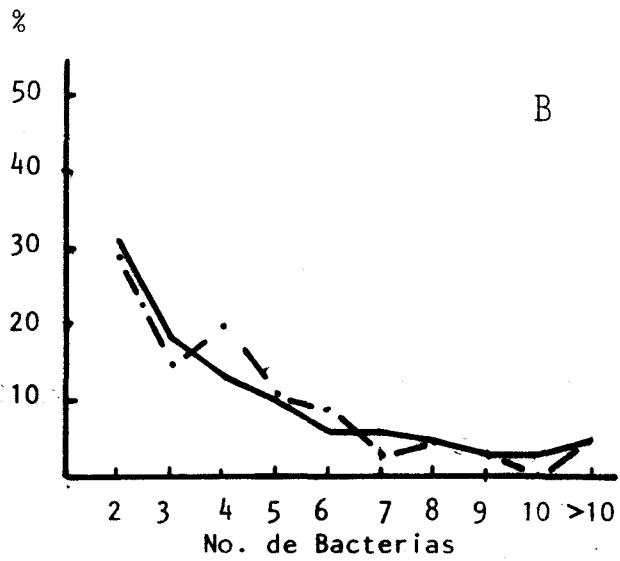


Fig. 30

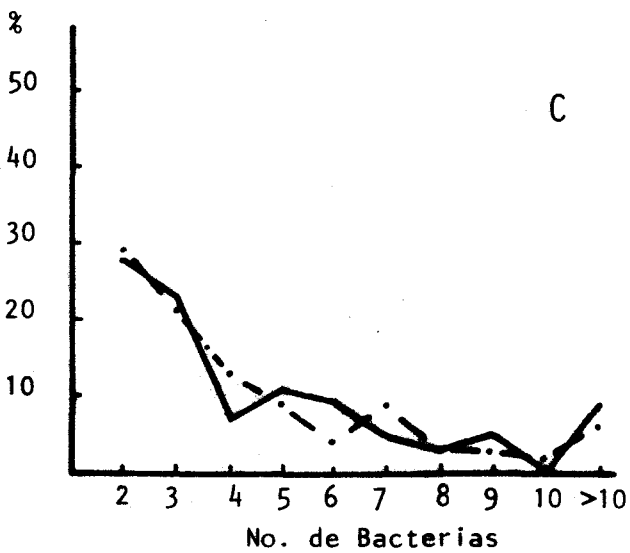


Fig. 31

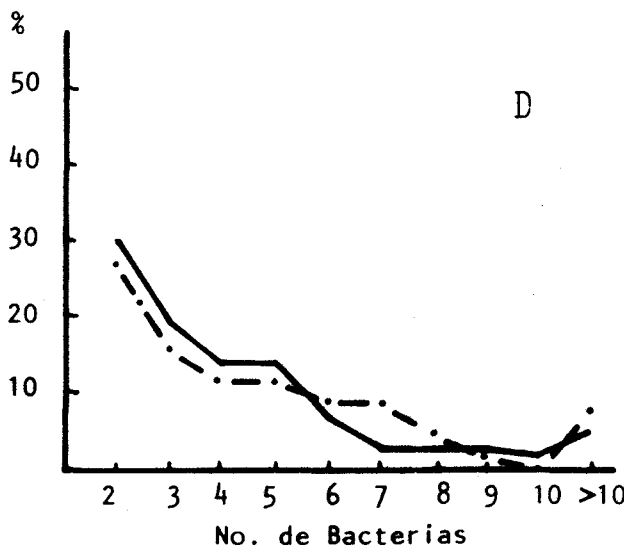


Fig. 32

Control ———
 Sub CMIs - · - · -

FIGURAS 33, 34, 35 y 36: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R16a, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

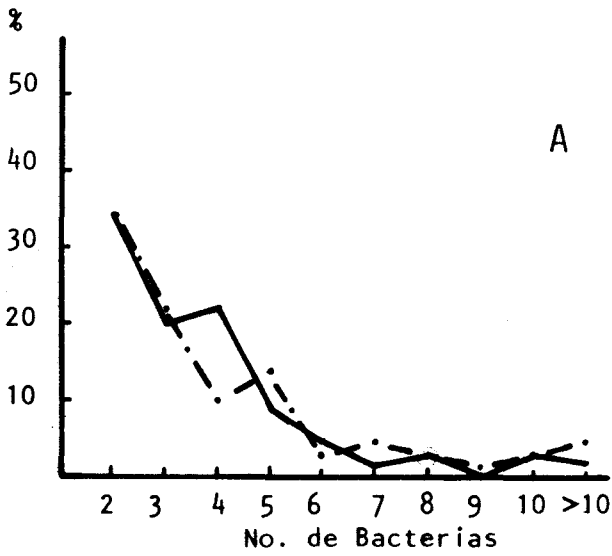


Fig. 33

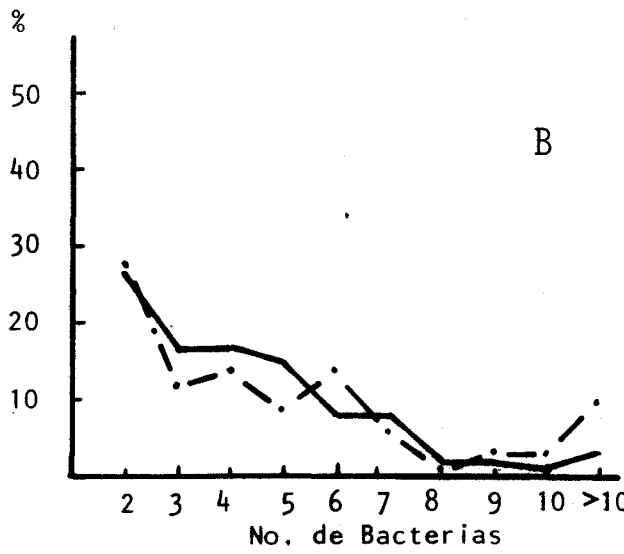


Fig. 34

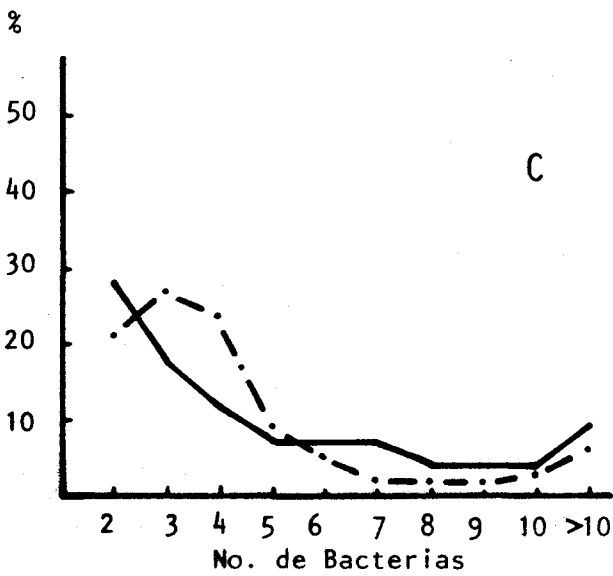


Fig. 35

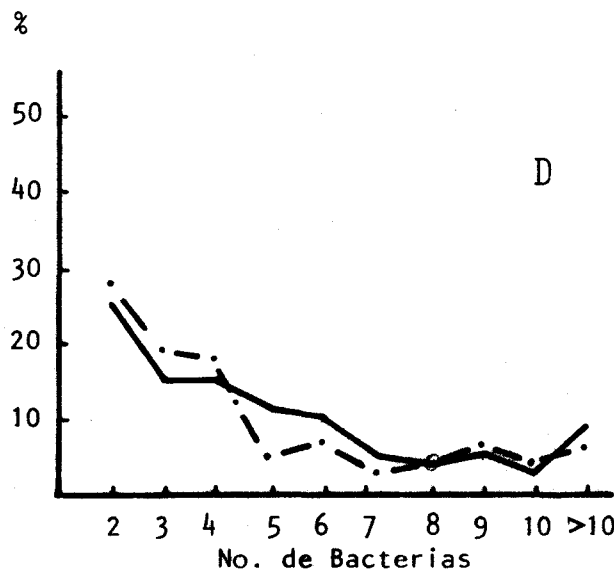


Fig. 36

Control ———
 Sub CMIs - · - · -

FIGURAS 37, 38, 39 y 40: Comparación entre el número de agregados versus el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R27, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 minutos.

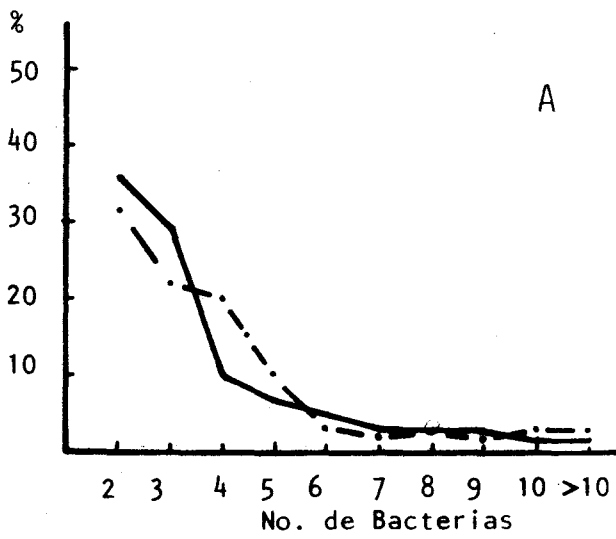


Fig. 37

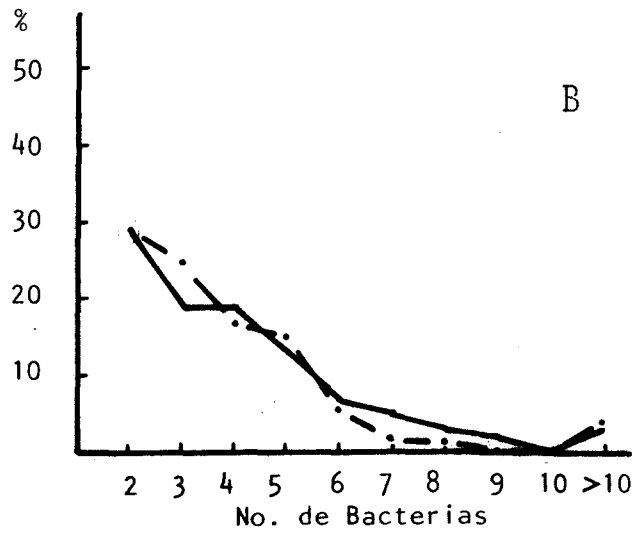


Fig. 38

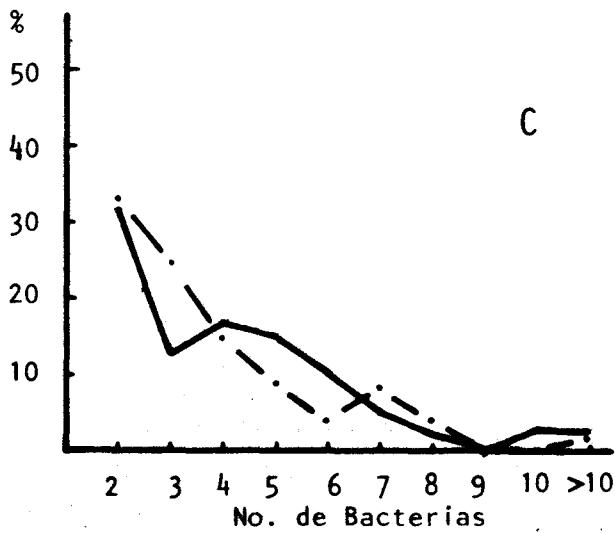


Fig. 39

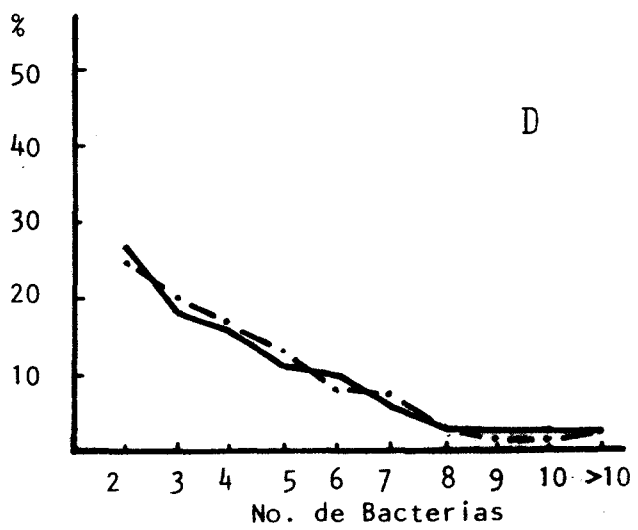


Fig. 40

Control ———
 Sub CMIs - · - · -

FIGURAS 41, 42, 43 y 44: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R144, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

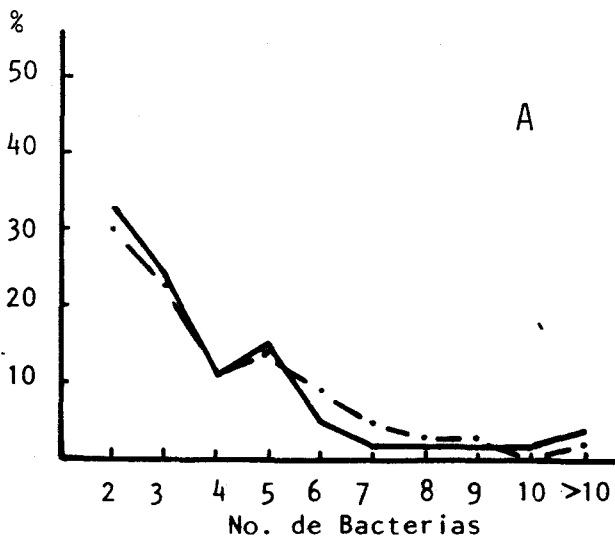


Fig. 41

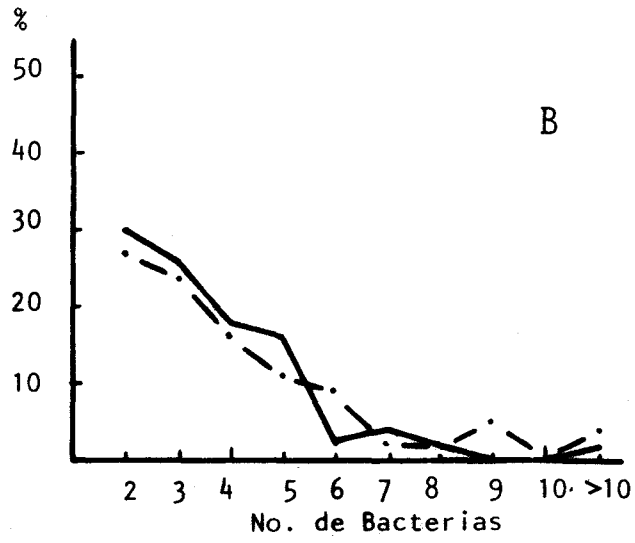


Fig. 42

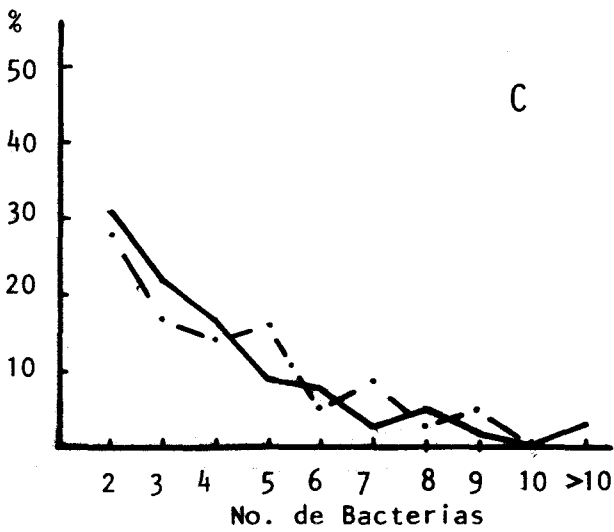


Fig. 43

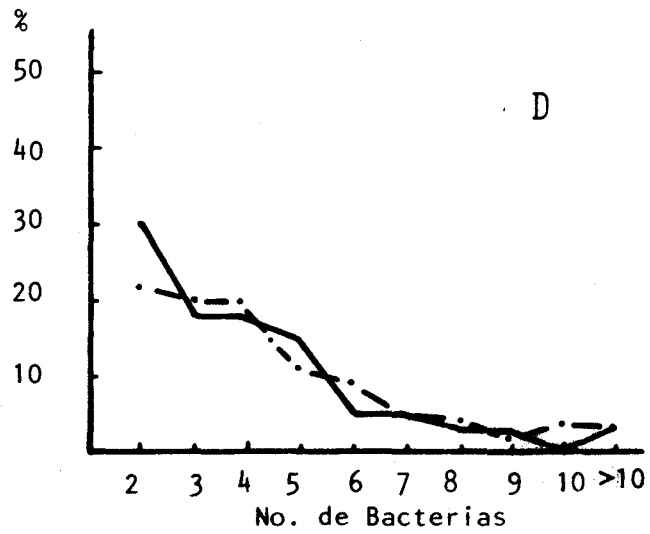


Fig. 44

Control —————
Sub CMI - . - . - .

FIGURAS 45, 46, 47 y 48: Comparación entre el número de agregados versus el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53pIP175, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 minutos.

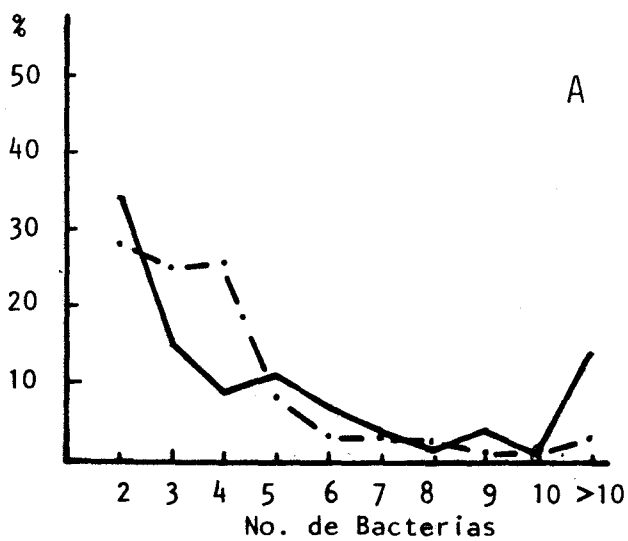


Fig. 45

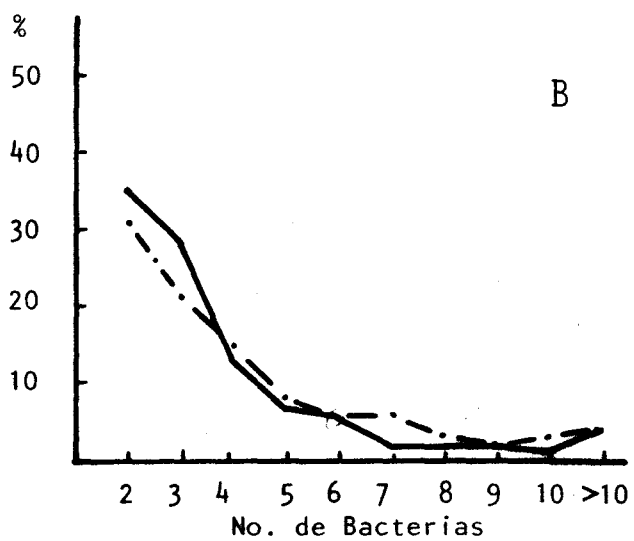


Fig. 46

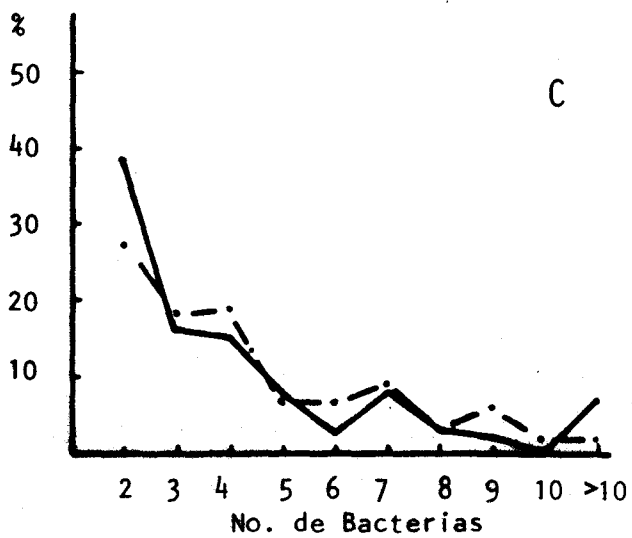


Fig. 47

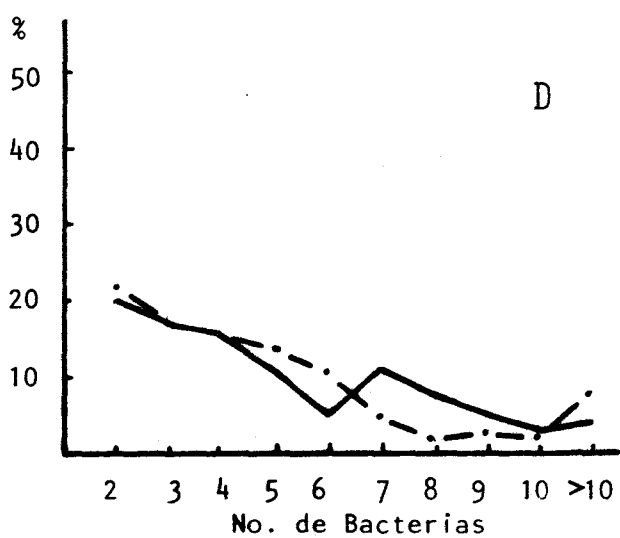


Fig. 48

Control ———
 SubCMIs - - - - -



FIGURAS 49, 50, 51 y 52: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R391, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

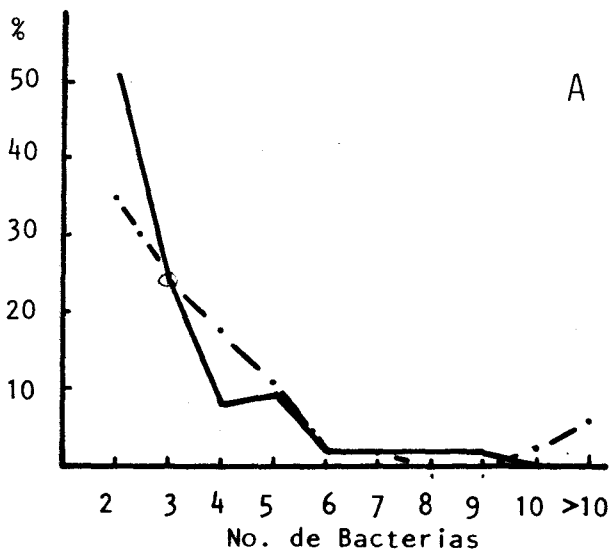


Fig. 49

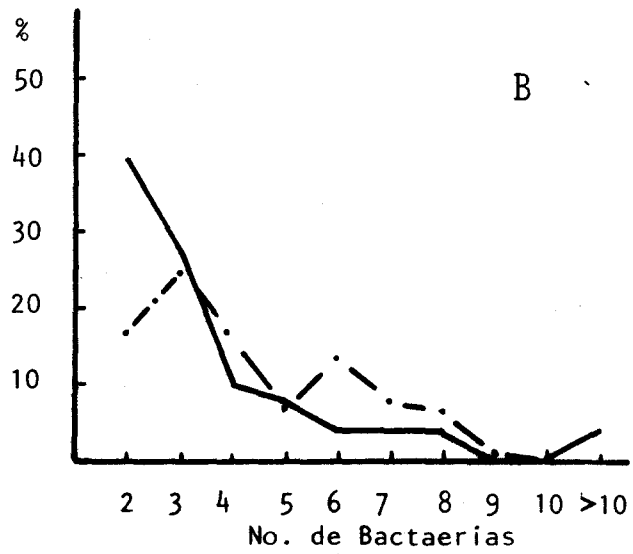


Fig. 50

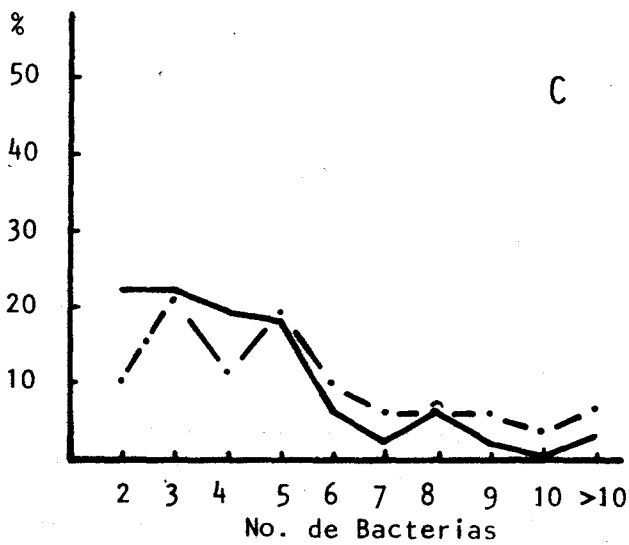


Fig. 51

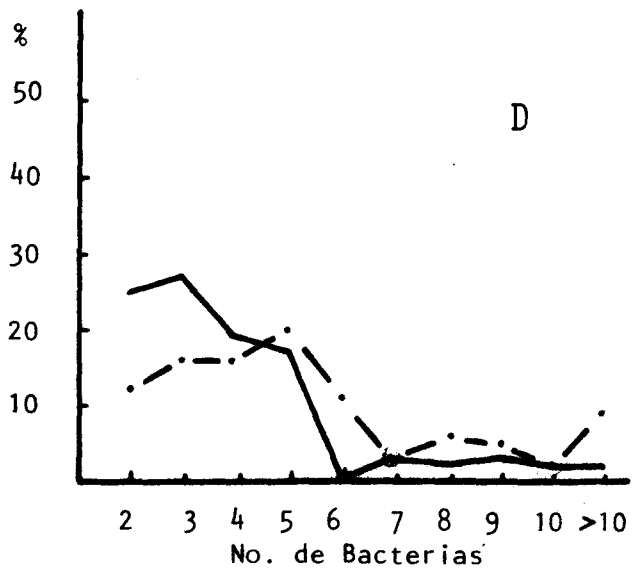


Fig. 52

Control —————
 Sub CMIs - . - . - .

FIGURAS 53, 54, 55 y 56: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R387, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

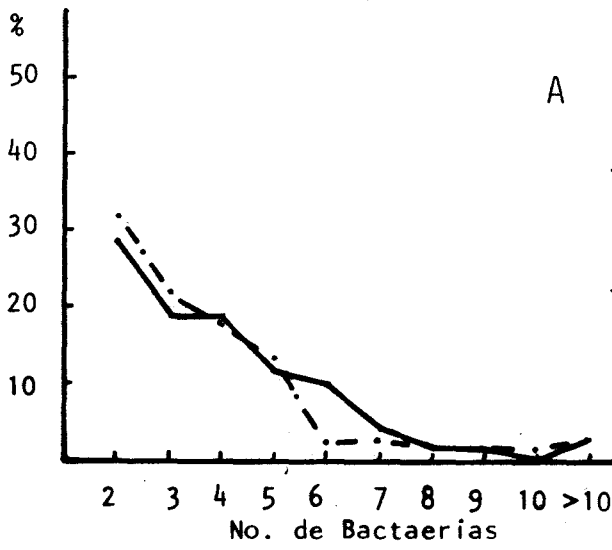


Fig. 53

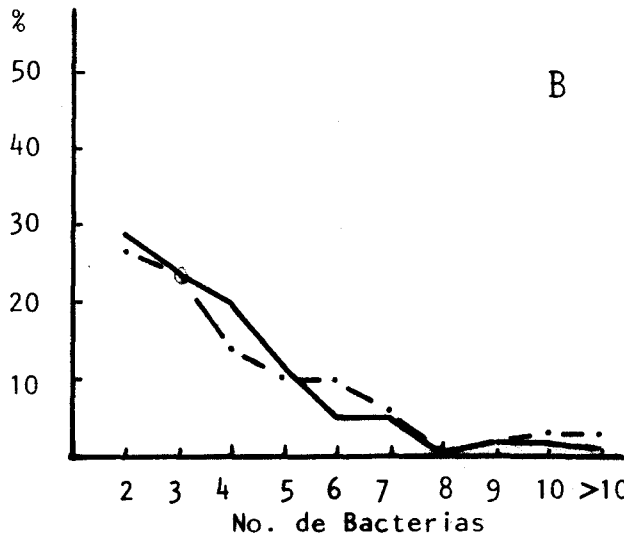


Fig. 54

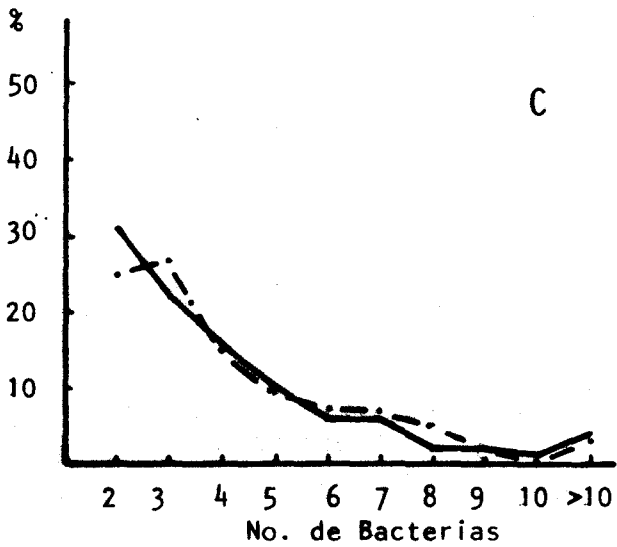


Fig. 55

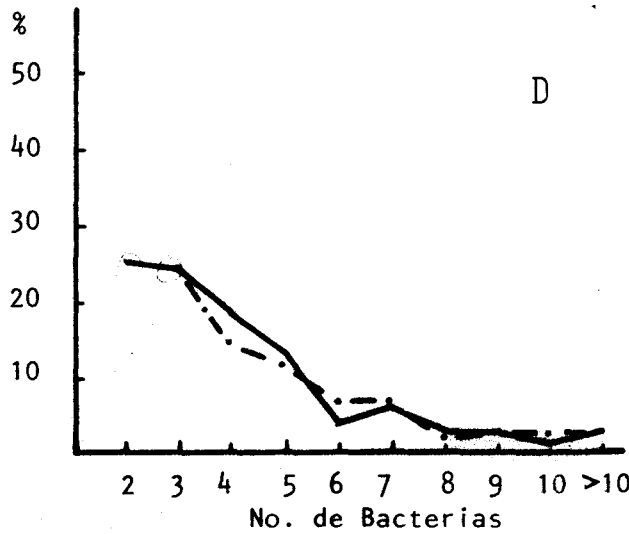


Fig. 56

Control —————
 Sub CMIs - - - - -

FIGURAS 57, 58, 59 y 60: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R471a, sin tratamiento (----) y despues de trata- da con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) duran- te dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras - 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras -- 120 minutos.

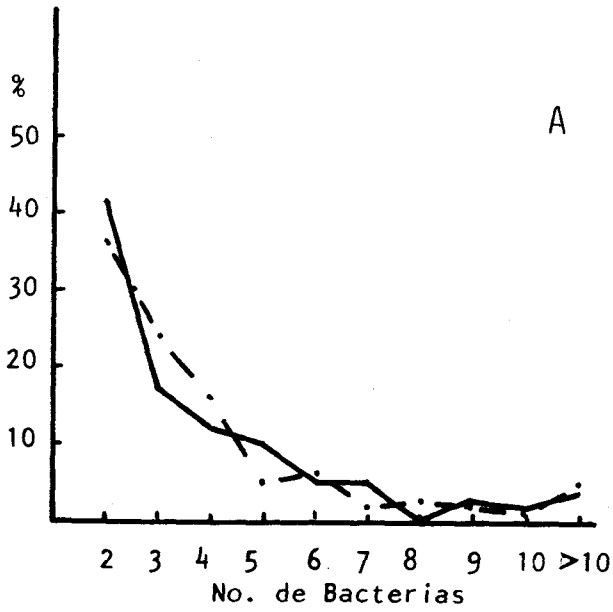


Fig. 57

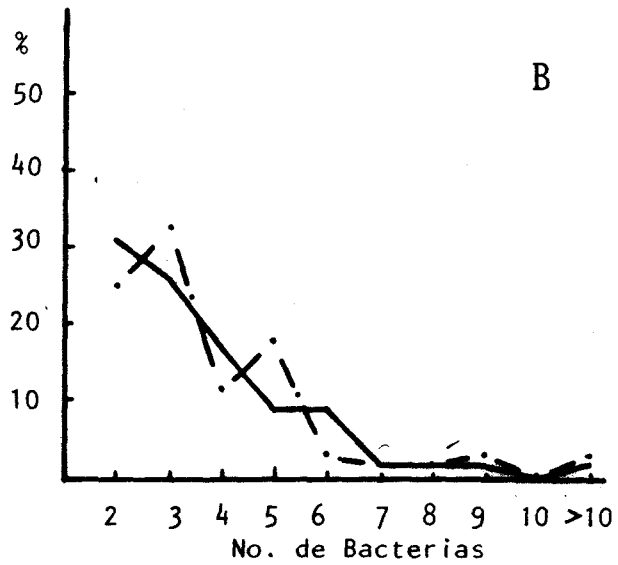


Fig. 58

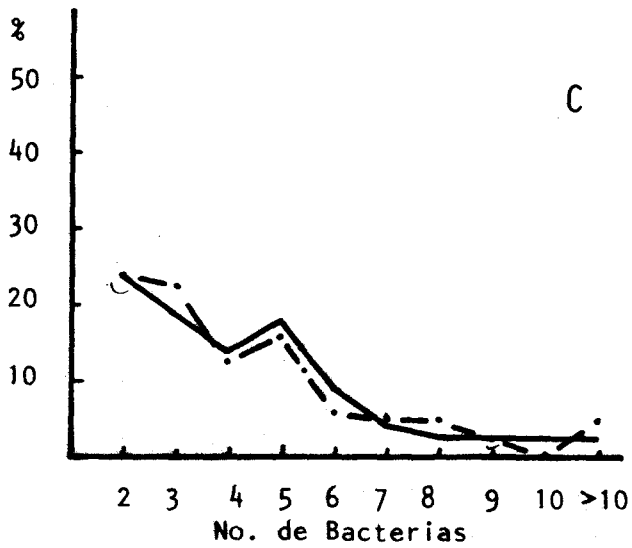


Fig 59

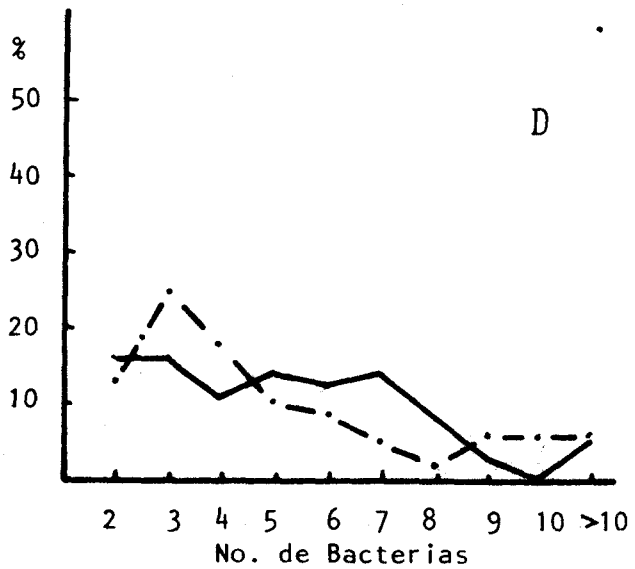


Fig. 60

Control —————
 Sub CMI - - - - -



FIGURAS 61, 62, 63 y 64: Comparación entre el número de agregados versus el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53pIP69, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (+.--) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 minutos.

J53 PIP 69

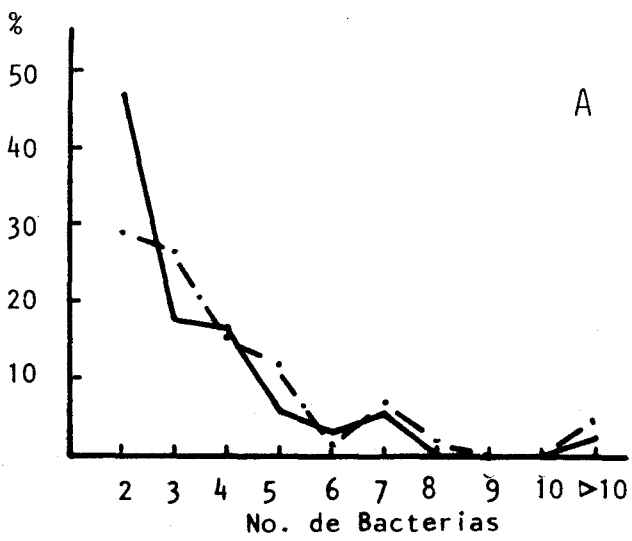


Fig. 61

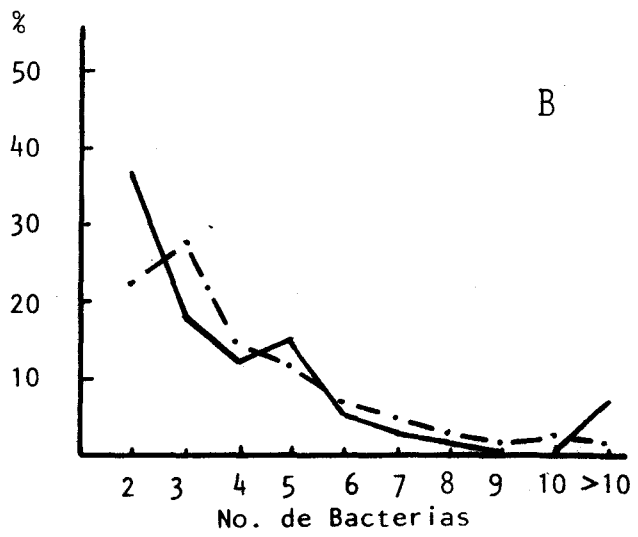


Fig. 62

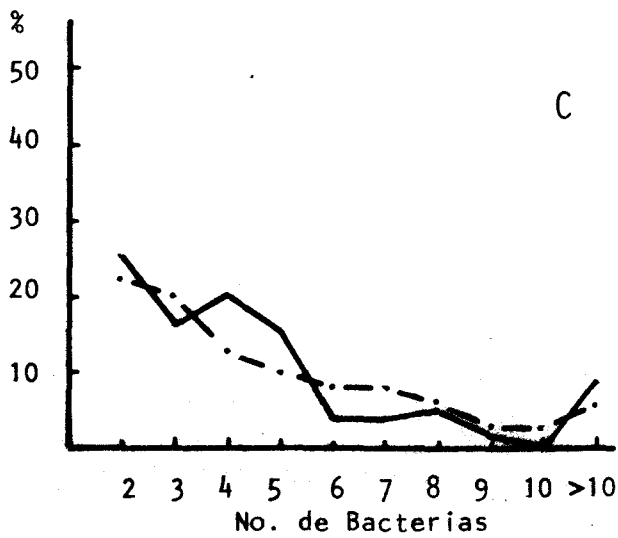


Fig. 63

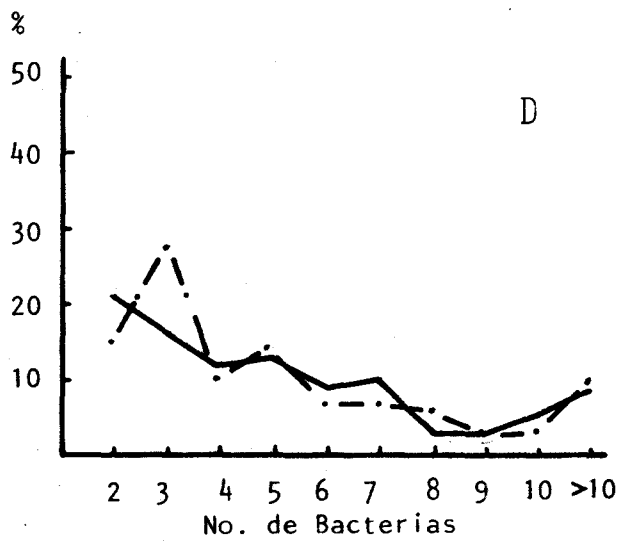


Fig. 64

Control —————
 SubCMIs - . - . - .

FIGURAS 65, 66, 67 y 68: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53RP1, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 minutos.

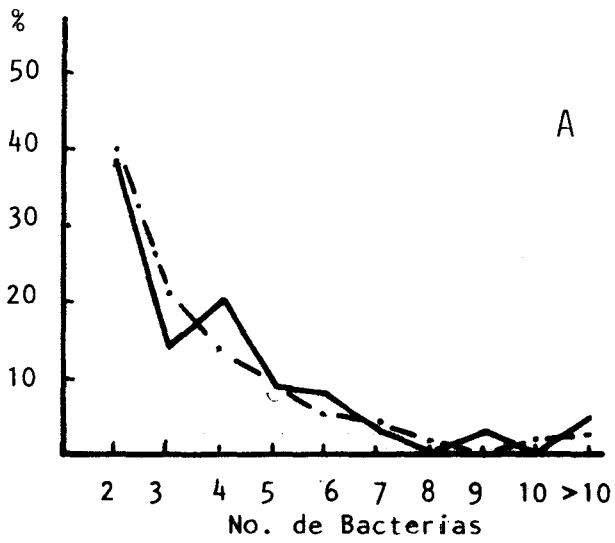


Fig. 65

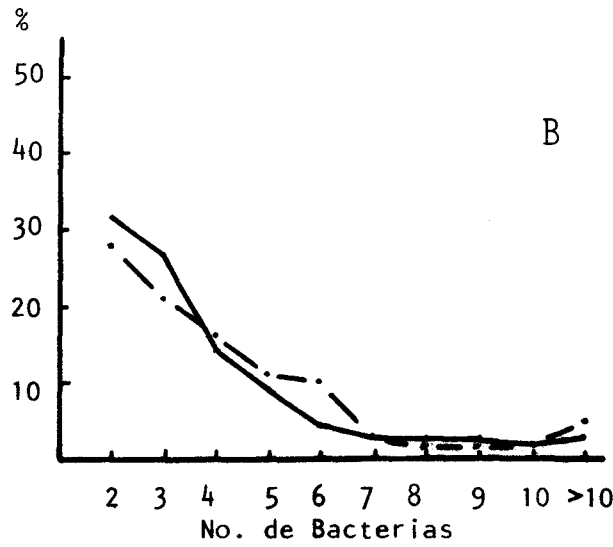


Fig. 66

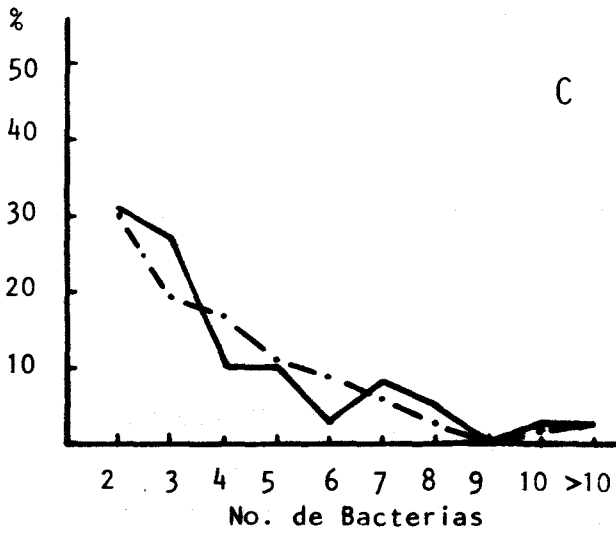


Fig. 67

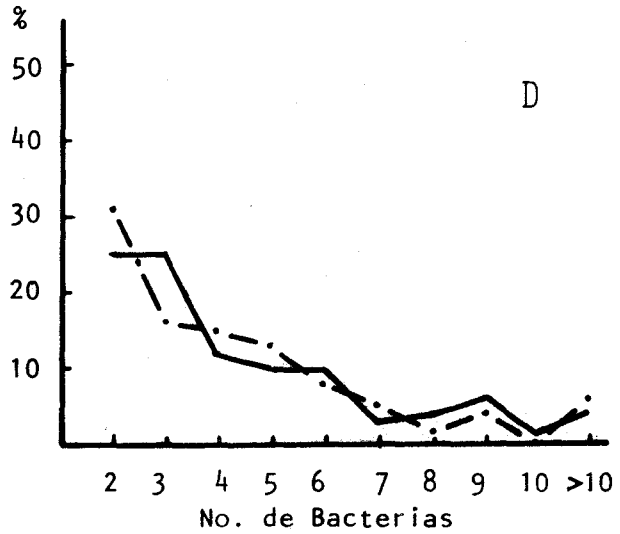


Fig. 68

Control —————
 SubCMIs - · - · - ·

FIGURAS 69, 70, 71 y 72: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R401, sin tratamiento (----) y después de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

J 53 R 401

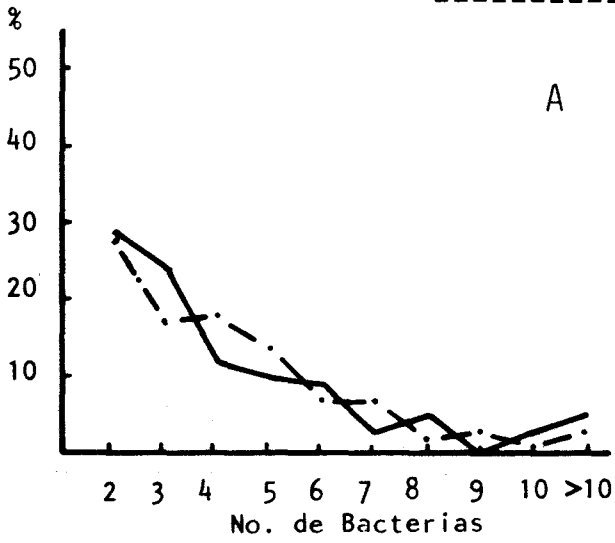


Fig. 69

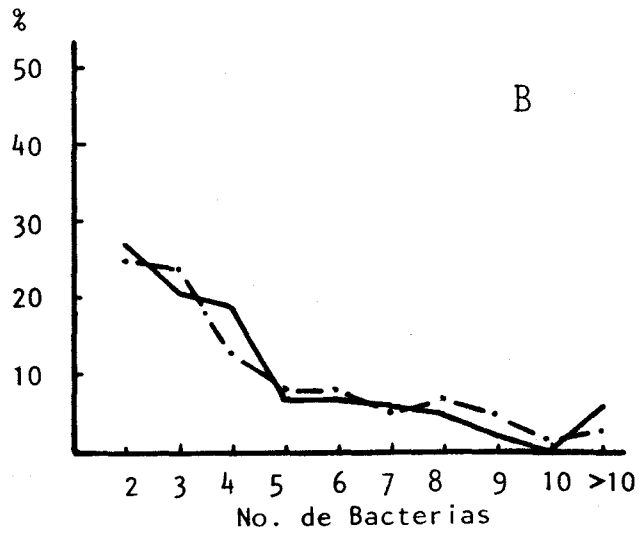


Fig. 70

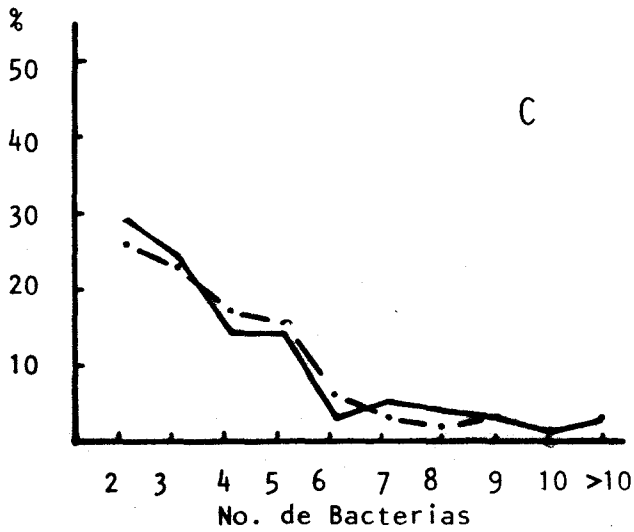


Fig. 71

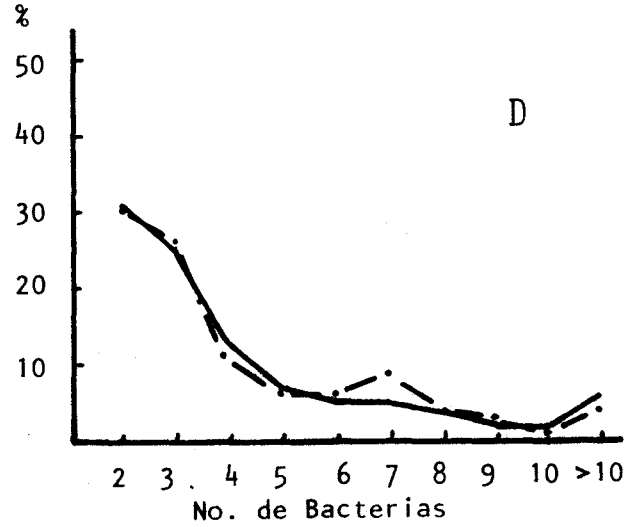


Fig. 72

Control —————
Sub CMIs - - - - -



FIGURAS 73, 74, 75 y 76: Comparación entre el número de agregados versus - el número de células por agregado en un cultivo mezcla de E. coli Hfr y E. coli J53R6K, sin tratamiento (----) y despues de tratada con concentraciones subinhibitorias de Ampicilina (-.-.-) durante dos horas. Con los siguientes tiempos de incubación: A = Tras 30 - minutos; B = Tras 60 minutos; C = Tras 90 minutos y D = Tras 120 - minutos.

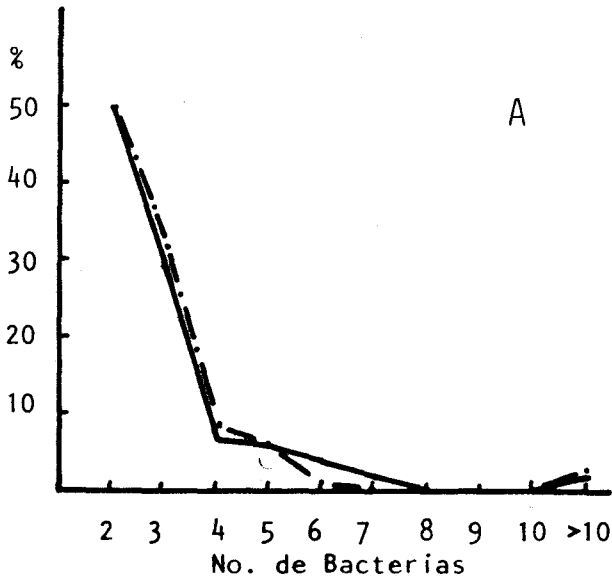


Fig. 73

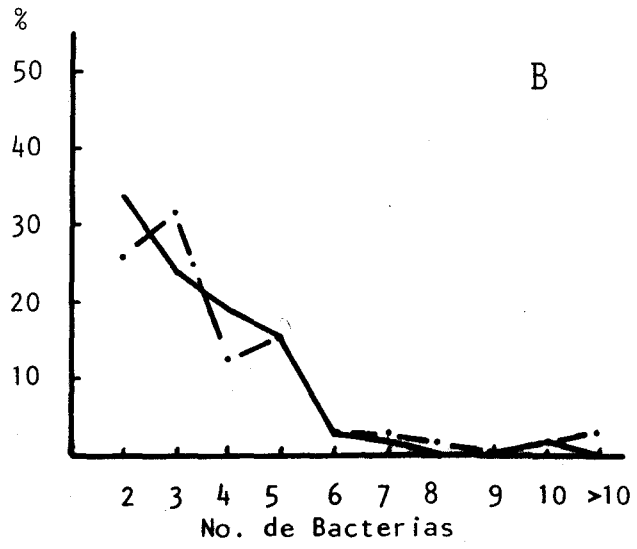


Fig. 74

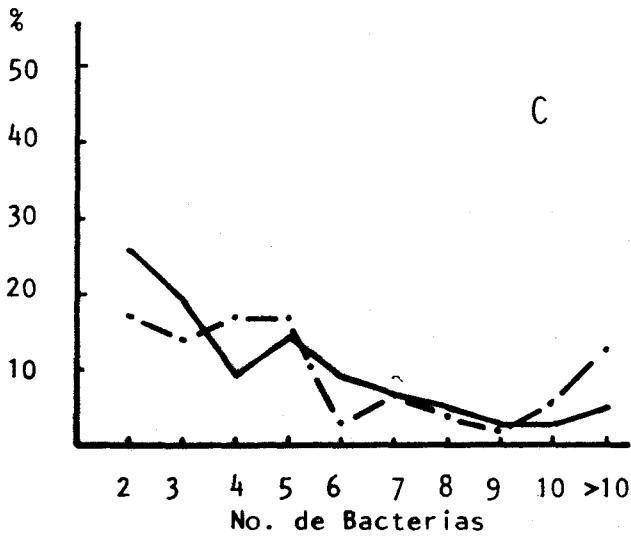


Fig. 75

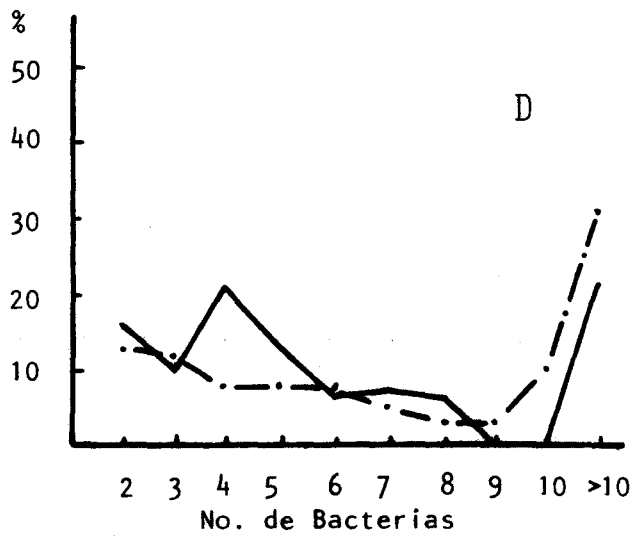


Fig. 76

Control —————
 SubCMIs - - - - -

agregados de mayor tamaño al aumentar los tiempos de conjugación tal como aparecen en las Figuras 19 y 20. Destacando el hecho de que apareciendo esferoplastos entre estos agregados, éstos no se afectaban de manera significativa, tanto en cuanto al total de ellos formados como al número de bacterias que los componían, comportándose de forma similar a los controles sin tratamiento antibiótico.

Como ejemplo más significativo de las 14 cepas estudiadas destacaremos la J53R6K (Ver Figuras 73 a 76), donde observamos una formación de agregados mayores de dos bacterias progresiva con el aumento del tiempo de conjugación.

Por último hay que destacar que no encontramos ninguna relación entre la sensibilidad de la cepa a Ampicilina y la formación de agregados bacterianos durante la conjugación, al tratar dichas cepas con concentraciones subinhibitorias de este antibiótico, comportándose de forma similar tanto las cepas sensibles como las resistentes.

DISCUSION

El estudio de los efectos de las concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre las bacterias causantes de patología en el hombre y sobre todos los mecanismos que interactúan en la relación parásito-huesped que desencadenan la infección, ocupa un papel destacado en la microbiología actual.

La prolongación lógica de estos estudios microbiológicos es el empleo en la clínica diaria de dosis menores de antibióticos en el tratamiento o prevención de las infecciones, lo cual evitaría las importantes repercusiones que se originan por el abuso de antibióticos tanto en el paciente, disminuyendo sus mecanismos de defensa, como en las bacterias, alterando la flora normal y seleccionando las más resistentes a dichos antibióticos.

Los estudios de los efectos de las concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre las bacterias han ido avanzando en los últimos años -- desde los aspectos morfológicos o estructurales (55)(56) tasa de crecimiento bacteriano (6)(57)(58), estudio de las proteínas de la pared bacteriana (59), hasta la relación de las bacterias con el huesped en aspectos como la adherencia bacteriana a las células (60)(61), alteración de la fagocitosis bacteriana (62)(63)(64), inhibición de la quimiotaxis de los neutrófilos (65), -- alteración de la actividad bactericida del suero humano (23) o de animales -- de experimentación (66) y alteración de la acción lítica del complemento --- (67).

Siguiendo los estudios sobre los efectos de las concentraciones subinhibitorias de los antibióticos, en nuestro trabajo nos planteamos el estudio de los efectos de las concentraciones subinhibitorias de ampicilina so--

bre la transferencia de plásmidos R en cepas de Escherichia coli.

El empleo de la ampicilina como antibiótico a estudiar se debió al hecho de ser uno de los antibióticos B-lactámicos más empleados en la clínica actualmente y ser también uno de los más utilizados tanto en estudios "in vitro" como en tratamientos realizados "in vivo" para ver los efectos de las concentraciones subinhibitorias sobre las bacterias causantes de patología humana (11).

En cuanto a los plásmidos estudiados se escogieron entre aquellos detectados en bacterias causantes de patología infecciosa en el hombre y correspondían a diferentes grupos de incompatibilidad, siendo los representantes más significativos de cada grupo. Sin embargo había cuatro plásmidos pertenecientes a dos grupos de incompatibilidad, el pIP55 y el R16, pertenecientes al grupo C y el R471a y el pIP69 al grupo M. El plásmido R471a era anteriormente considerado como del grupo L hasta que recientemente se ha reclasificado como perteneciente al M en el cual lo hemos incluido (34)(52)(68)(69)(70). Todos los plásmidos estudiados eran albergados en cepas de Escherichia coli J53, para que su expresión en los diversos experimentos fuese uniforme y no dependiese de la cepa portadora.

1. SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE LAS CEPAS DE ESCHERICHIA COLI.

La resistencia a los antibióticos de las 14 cepas de E. coli utilizadas como donadoras se debía al patrón de resistencia codificado por el plásmido R que cada una de ellas poseía, mientras que la cepa E. coli receptora era resistente a rifampicina, resistencia de tipo cromosómico y no transferible.

Comparando nuestros resultados sobre los patrones de resistencia de los plásmidos estudiados con los obtenidos por otros autores, coincidían con los valores descritos por Bukhari et al. (68) en 13 de los 14 plásmidos, siendo diferente en la cepa J53R391, que representaba un patrón de resistencia plasmídica Am, Km, Nm; mientras que para estos autores el plásmido albergado sólo confería resistencia a kanamicina. En el caso de otros autores

había coincidencias en los patrones de resistencia a antibióticos en las cepas que albergaban alguno de estos plásmidos como eran R1, R124, pIP55, R27, R144, pIP175, R387, R471a, pIP69, RP1, R401 y R6K (34)(52)(69)(70)(71)(72) - (73)(74)(75)(76)(77)(78)(79)(80), pero discrepando con algunos de estos mismos autores en el caso de los plásmidos R1, R16a, R391, pIP69, RP1 y R6K --- (34)(52)(69)(70)(71)(77)(78)(80).

2. PESOS MOLECULARES DE LOS PLASMIDOS DETECTADOS.

En cada una de las 14 cepas estudiadas se detectó un sólo plásmido, calculándose posteriormente el peso molecular de dichos plásmidos, siendo éstos pesos moleculares los que aparecen en la TABLA 1.

Comparando estos pesos moleculares con los determinados por otros autores observamos que nuestros valores coincidían con los obtenidos por --- ellos, aunque se presentaban ligeras diferencias entre 1 - 3 Mda. Sin embargo estas diferencias no son significativas y podemos considerar que eran los mismos plásmidos. Estos pesos moleculares eran los de los plásmidos R1, R27, R144, R471a, pIP69, RP1 y R6K (68)((70)(71)(73)(75)(81)(82).

3. FRECUENCIA DE MUTACION DE RESISTENCIA ESPONTANEA A RIFAMPICINA.

Se determinó en las 14 cepas de E. coli previamente a la realización de la conjugación bacteriana, ya que era rifampicina el antibiótico elegido como marcador cromosómico de selección en la cepa receptora, para todos los estudios de conjugación bacteriana.

Tal como se describe en los resultados, no apareció ninguna bacteria mutante resistente a rifampicina. Hay que destacar que el método seguido en este proceso fué semejante al utilizado por Lederberg y Lederberg en 1952 (83), pero simplificándolo para la obtención de unos resultados más rápidos y fiables, siendo comparable con el seguido por Mendelman et al. en 1982, -- donde utilizando el mismo antibiótico seleccionador rifampicina, estudiaron la frecuencia de mutación espontánea de Haemophilus influenzae (84).

4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA CONJUGACION Y DE LA RESISTEN--

CIA ANTIBIOTICA CODIFICADA POR LOS PLASMIDOS PROCEDENTES DEL GENERO SALMONELLA.

La temperatura de incubación durante la conjugación fué de 35°C en todas las cepas excepto en dos, la J53R27 y J53R144, la primera resistente a Tc y la segunda a Tc, Km. Estas cepas no transfirieron sus plásmidos a 35°C y se repitió el proceso a 25°C, temperatura en la cual sí hubo transferencia plasmídica.

Con respecto a la temperatura de conjugación hay que decir que se ha comprobado que en algunas cepas de Salmonella typhimurium y otros serotipos la frecuencia de transferencia aumentaba al pasar de 35°C a 25°C de temperatura de incubación (50)(51)(85). Esto nos ocurrió con las cepas J53R27 y J53R144, cuyos plásmidos procedían de S. typhimurium. La explicación de este hecho podría deberse a que existen algunos plásmidos de Salmonella que serían sensibles a temperaturas ligeramente elevadas no pudiendo transferirse a 35°C de incubación y sí a 25°C, fenómeno estudiado por algunos autores como -- Nakaya et al. 1975 (51). Estos, estudiando la sensibilidad a la temperatura de incubación en cepas de Salmonella encontraron que de diez plásmidos estudiados, siete eran sensibles en cuanto a su transferencia por conjugación o permanencia estable dentro de las bacterias, sugiriendo dichos autores que -- habría plásmidos sensibles a la temperatura dentro del género Salmonella.

Esto también podría deberse a que la adquisición de resistencias a -- antibióticos en las cepas de Salmonella (a través de plásmidos) podría más -- fácilmente realizarse en las heces defecadas durante las estaciones calidas cuya temperatura oscila alrededor de los 25°C, más que incluso dentro del aparato intestinal cuya temperatura es alrededor de los 35-37°C. Esto ha sido también sugerido en el caso de la transferencia de plásmidos en cepas de Salmonella typhi por Chun et al. 1977 (86).

Sin embargo en el resto de las cepas que contenían plásmidos que procedían de Salmonella no ocurrió esto, transfiriendo éstos a 35°C al igual -- que el resto de los plásmidos estudiados.

Así mismo diversos autores han encontrado una estrecha relación entre la frecuencia de transferencia y el patrón de resistencia codificado por los plásmidos en las cepas de Salmonella. De tal forma que las cepas con --- plásmidos que codifican multirresistencia antibiótica, transfieren dichos -- plásmidos con mayor frecuencia que las cepas con plásmidos que codifican monorresistencia (Tanaka et al. 1976 (85), Chun et al. 1977 (86), Rangnekar et al. 1983 (87), R. Iñiguez, 1984 (88). Estos datos concuerdan con algunas de nuestras cepas con plásmidos procedentes de Salmonella. Así las dos cepas -- que no transfirieron sus plásmidos a 35°C la J53R27 y la J53R144, éstos codificaban resistencia sólo a Tc y Tc, Km respectivamente, mientras que la cepa J53pIP69, cuyo plásmido codificaba resistencia a Am, Km, Tc, Nm y la J53R1, cuyo plásmido codificaba resistencia a Am, Km, Su, Sm, Cm sí transfirieron - estos plásmidos a 35°C y con valores de transferencia más altos que las anteriormente citadas, incluso cuando se conjugaron a 25°C. Sin embargo en las - dos cepas restantes que portaban plásmidos procedentes de Salmonella la J53R124 y la J53pIP175 y que codificaban monorresistencia antibiótica a Tc y a Am respectivamente, transfirieron dichos plásmidos a 35°C aunque con valores de transferencia ligeramente inferiores a las cepas multirresistentes anteriormente citadas. No obstante estos valores no eran significativamente diferentes al comparar estas cuatro cepas entre sí.

En cuanto a los valores de la frecuencia de transferencia de las cepas J53R27 y J53R144, cuando se realizó la conjugación a 25°C, ambas cepas - transfirieron sus plásmidos, pero dichos valores eran los más bajos de todas las cepas estudiadas, sobretodo en la J53R27, que fué la cepa que transfirió con la frecuencia más baja. Esto podría relacionarse con lo anterior, ya que la capacidad de transferir algunas cepas determinados plásmidos procedentes del género Salmonella es más baja en aquellas cepas cuyos plásmidos albergados codifican resistencia a un sólo antibiótico.

5. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R POR CONJUGACION.

La frecuencia de transferencia (F.T.) de los plásmidos ha sido estudiada por numerosos autores. En nuestro trabajo nos planteamos en primer - lugar como evolucionaba dicha transferencia durante el tiempo de conjugación,

es decir considerando cuatro tiempos diferentes de conjugación: 30, 60, 90 y 120 minutos, observamos como se comportaban las 14 cepas estudiadas y como evolucionaba dicha frecuencia a lo largo del tiempo.

Así obtuvimos que en siete cepas (50%): J53R1, J53R124, J53R27, J53R387, J53RP1, J53R401 y J53R6K, la F.T. aumentaba a lo largo del tiempo de incubación desde los 30 a los 120 minutos, aunque estos valores no eran muy significativos y no había grandes diferencias en cuanto a los resultados obtenidos con unos u otros tiempos, no siendo siempre progresivos a lo largo del tiempo de conjugación.

En una cepa (7'14%): J53pIP55, la F.T. permaneció más o menos estable a lo largo del tiempo, no habiendo diferencia significativa en sus valores obtenidos en los distintos tiempos utilizados.

En las seis cepas restantes (42'85%): J53R16a, J53R144, J53pIP175, J53R391, J53471a y J53pIP69, la F.T. disminuyó a lo largo del tiempo de conjugación, permaneciendo los valores máximos a los 30 minutos de conjugación y fué disminuyendo hasta los 120.

Observamos que en la mitad de las cepas probadas aumentaba la F.T. - al prolongar el tiempo de conjugación, mientras que en la otra mitad el proceso fué el inverso habiendo una disminución de la F.T. con el tiempo de conjugación. La explicación de este hecho no está relacionada con la cepa originaria de donde procede cada plásmido ya que en ambos grupos existen plásmidos de muy diversa procedencia bacteriana, tal como queda reflejado en la TABLA 1, ni tampoco con la resistencia codificada por dichos plásmidos siendo mono o multirresistentes las cepas en ambos grupos indistintamente. Tampoco existió relación con el peso molecular que poseían dichos plásmidos. La explicación de éste fenómeno habría que buscarla en los comportamientos individuales de cada plásmido ya que cada uno pertenecía a un grupo de incompatibilidad diferente, o al hecho de que existiese una multiplicación más rápida de los transconjugantes en unas cepas que en otras.



En cuanto a las cuatro cepas con plásmidos que pertenecían a dos mismos grupos de incompatibilidad, vemos que tanto la cepa J53pIP55 como la J53R16a, ambas con plásmidos del grupo C, poseían distinto comportamiento en su conjugación a lo largo del tiempo, pues mientras en la primera la F.T. permanecía estable, en la segunda descendía ligeramente la F.T., sin embargo al comparar ambas cepas vemos que los valores de la F.T. eran similares no existiendo diferencias significativas. Con respecto a las dos cepas con plásmi--dos del grupo M, observamos que mientras en la cepa J53R471a la F.T. descen--día a lo largo del tiempo de conjugación, en la cepa J53pIP69 ocurría el proceso inverso. No obstante al comparar los valores de la F.T. de las dos ce--pas entre sí estas ligeras diferencias eran poco significativas.

Podemos considerar por lo tanto que los comportamientos de los plás--midos de idéntico grupo de incompatibilidad podría ser semejante en cuanto a sus valores de transferencia no existiendo diferencias significativas en és--tos a lo largo del tiempo de conjugación.

No obstante observando los valores de frecuencia de transferencia a lo largo de los distintos tiempos de conjugación empleados, podemos deducir que la transferencia de plásmidos se mantiene más o menos estable desde los 30 minutos de incubación, periodo de tiempo en el cual las cepas donadoras - de E. coli habían transferido sus plásmidos. No siendo los valores de F.T. - significativamente diferentes habiendo en todas las cepas un máximo de un exponente de diferencia entre algunos de sus tiempos, por lo que podemos con--cluir que el tiempo de incubación no afecta de manera directa e importante - la mayor o menor capacidad de las cepas de E. coli para transferir sus plás--midos permaneciendo esta capacidad estable.

Comparando nuestros resultados con los de otros autores observamos - distintos comportamientos y valores con los mismos plásmidos. Así vemos que Y.A. Chabbert et al. 1972 (89) utilizando cepas de E. coli K-12, que alberga ban los plásmidos pIP55 y pIP69, obtenían valores de transferencia ligeramente inferiores (en un exponente) a los nuestros, utilizando un tiempo de con--jugación de hasta 24 horas. Por lo tanto podemos considerar que sus resulta--

dos serían equiparables a los obtenidos por nosotros y confirmaría el hecho de que el tiempo de conjugación no afectaría a la transferencia de los plásmidos. Otros autores como Danbara y Yoshikawa, 1977 (69), utilizando cepas de E. coli K-12 J53, que albergaban los plásmidos R1, R124, R144, R387 y --- R471a, conjugadas en la misma proporción donadora-receptora (1 - 10) e incubándolas a 37°C durante 60 minutos, obtenían unos valores de F.T. ligeramente superiores a los nuestros en las cepas portadoras de los plásmidos R1 y R144, semejantes en la portadora del R124, ligeramente inferiores en la que albergaba el R387 y bastante inferiores en la portadora del R471a, comparados con nuestros resultados en las mismas condiciones.

Podemos resumir que en general en los cinco plásmidos estudiados no había diferencias significativas en cuanto a los valores de transferencia en las cepas empleadas, excepto en la portadora del plásmido R471a, siendo la metodología similar a la nuestra con la única diferencia del tipo de cepa de E. coli utilizada como receptora en la conjugación.

Bradley et al. 1980 (35), utilizando como cepas donadoras y receptoras E. coli K-12, las primeras portadoras de los plásmidos R27, R391, R6K y RP1 y realizando la conjugación en medio líquido y en medio sólido simultáneamente durante una hora a 37°C, obtuvieron unos resultados equiparables a los nuestros en las cepas portadoras de los plásmidos R6K y RP1, considerando la conjugación en medio líquido, mientras que la transferencia era inferior a la obtenida por nosotros en el caso de las cepas portadoras de los plásmidos R27 y R391. Hay que destacar que tanto en el trabajo de Bradley et al. como en el nuestro, el plásmido R27 era el que presentaba una menor capacidad de transferencia y tal vez debido al hecho de que la cepa que albergaba dicho plásmido fué incubada a 30°C presentaba un valor inferior de F.T. al hallado por nosotros, incubada a 25°C, posiblemente influenciada por la temperatura de incubación.

Por último Campos et al. 1983 (78), usando cepas de E. coli K-12 --- J62-2, portadoras de los plásmidos R1, R124, R27, R391, R387 y R6K, conjugadas durante una hora, obtuvieron valores inferiores a los nuestros en las --

cepas que portaban los plásmidos R27, R391, R387 y R6K, mientras que en las dos restantes con R1 y R124 eran semejantes a los nuestros en los diferentes tiempos de conjugación. Estas diferencias podrían ser explicadas en base a las diferentes cepas de E. coli portadoras usadas, proporción donadoras-receptoras 1 - 5, mientras nosotros utilizamos 1 - 10 y diferentes medios de cultivo empleados en ambos trabajos, dando nuestros resultados unos valores de transferencia globales más altos que los obtenidos por estos autores.

6. TRANSFERENCIA DE PLASMIDOS R EN LAS CEPAS DE E. COLI TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA DURANTE DOS HORAS.

Al tratar las cepas de E. coli con concentraciones subinhibitorias de ampicilina sus transferencias de plásmidos se vieron afectadas en mayor o menor grado en cada una de las cepas incluso dos cepas la J53R27 y J53R144, tras su tratamiento con ampicilina, no transfirieron sus plásmidos en ninguno de los tiempos de conjugación probados.

Considerando las cepas en dos apartados según fueran resistentes (10 cepas) o sensibles (4 cepas) a ampicilina, dependiendo de sus valores de CMI y analizando como se afectaría la F.T. a lo largo del tiempo, observamos que:

Las seis cepas resistentes (CMI = 1024 $\mu\text{g/ml}$) J53R16a, J53R391, J53R471a, J53pIP69, J53RP1 y J53R6K, tratadas con una concentración de 64 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina, transfirieron todas sus plásmidos R. Analizando su comportamiento a lo largo del tiempo de incubación y comparando sus valores en los cuatro tiempos estudiados, no encontramos diferencias significativas de aumento o descenso en sus valores de F.T. al aumentar el tiempo de conjugación, por lo cual consideramos que al igual que les ocurría a las cepas sin tratamiento antibiótico, la transferencia de plásmidos tampoco se altera en relación con el tiempo de conjugación, al tratar las cepas portadoras con concentraciones subinhibitorias de ampicilina.

Lo mismo ocurrió en las dos cepas con CMI de 512 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina la J53R1 y la J53pIP175 y que fueron tratadas con 32 $\mu\text{g/ml}$ y en las dos restantes J53pIP55 y J53R401, también resistentes con CMI de 256 $\mu\text{g/ml}$ y trata-

das con 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

No obstante en estas diez cepas resistentes a ampicilina había pequeñas oscilaciones en sus valores de F.T., así en cinco cepas aumentaban éstos desde los 30 a los 120 minutos de conjugación, en cuatro disminuían y en la restante permanecían estables, siendo las diferencias en todos ellos poco -- significativas. Hay que destacar que todas las cepas resistentes transfirieron sus plásmidos en los cuatro tiempos estudiados excepto la J53pIP55, que pasó de no transferir a los 30 y 60 minutos a hacerlo a los 90 y 120, siendo la cepa que más se afectó en su transferencia de las diez resistentes.

En cuanto a las cuatro cepas sensibles, la J53R27 con CMI de 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que fué tratada con 0'25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y las J53R124, J53R144 y J53R387 con CMI de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y tratadas con 0'12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tuvieron dos comportamientos diferentes, así la J53R124 y J53R387 transfirieron sus plásmidos y su comportamiento en cuanto a los valores de F.T. en función del tiempo de conjugación fué similar a las cepas resistentes, presentando en ambas un ligero aumento desde -- los 30 a los 120 minutos pero muy poco significativo, mientras que en las -- dos restantes la J53R27 y J53R144, se afectaron en su transferencia plasmídica profundamente y fueron las únicas de las 14 cepas estudiadas que no transfirieron en ningún tiempo sus plásmidos, al tratarlas con concentraciones -- subinhibitorias de ampicilina.

No podemos deducir un comportamiento de las cepas según su sensibilidad frente a ampicilina, en la transferencia plasmídica, al tratarlas con concentraciones subinhibitorias de este antibiótico, aunque es destacable decir que de las diez cepas resistentes todas transfirieron en los cuatro tiempos de conjugación, excepto una que no lo hizo en los dos primeros (30 y 60 minutos), afectándose en general menos la transferencia plasmídica que las -- cuatro cepas sensibles, ya que dos de ellas no transfirieron en ninguno de -- los cuatro tiempos estudiados, siendo las cepas más afectadas.

7. COMPARACION EN LA FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA DE LAS CEPAS -- TRATADAS Y NO TRATADAS CON AMPICILINA.

En el estudio comparativo sobre la evolución de la F.T. a lo largo del tiempo de conjugación con las cepas de E. coli tratadas con ampicilina, comparándolas con las mismas cepas pero sin tratamiento antibiótico previo, observamos que las cepas J53R27 y J53R144 fueron las más afectadas pasando a no transferir en ninguno de los tiempos empleados. La cepa J53pIP55, sufrió un brusco descenso no transfiriendo a los 30 y 60 minutos y hacerlo a los 90 y 120, aunque con valores de F.T. más bajos que la no tratada. Estas tres cepas fueron las más afectadas de las 14 estudiadas.

En el resto de las once cepas hubo menor afectación de los valores de F.T. estando ocho de ellas alteradas en su transferencia en mayor o menor medida comparadas con sus respectivas no tratadas, mientras que en las tres restantes la J53R1, la J53pIP175 y la J53RP1 no había afectación en la frecuencia de transferencia plasmídica significativa al tratarlas con ampicilina comparadas con las no tratadas.

Relacionando la afectación en la transferencia plasmídica en los diferentes tiempos de las cepas estudiadas con la sensibilidad de las mismas a ampicilina, observamos que las cepas resistentes se afectaron en menor medida que las sensibles, poseyendo las primeras los plásmidos que codificaban resistencia para dicho antibiótico, mientras que los cuatro plásmidos albergados en las cepas sensibles no codificaban para dicha resistencia. Podemos considerar que los plásmidos, según su capacidad de conferir o no resistencia a una cepa determinada, ocupan un papel destacado en su transferencia entre cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de un antibiótico al cual codifican o no resistencia antibiótica.

8. FACTORES QUE PODRIAN RELACIONARSE CON LA CAPACIDAD DE TRANSFERIRSE LOS PLASMIDOS EN CEPAS TRATADAS CON AMPICILINA COMO PESO MOLECULAR O RESISTENCIA ANTIBIOTICA QUE CODIFICAN.

No existía ninguna relación entre la afectación de la transferencia de los plásmidos en las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina y el peso molecular de los plásmidos albergados en dichas cepas, aunque es de destacar que las tres cepas que sufrieron menor afectación

de su transferencia J53R1, J53pIP175 y J53RP1 eran de las que poseían plásmidos con peso molecular igual o más bajo de 62 Mda y las cuatro que poseían plásmidos con peso molecular mayor de 100 Mda J53pIP55, J53R16a, J53R27 y J53R401 fueron de las que tuvieron una mayor alteración de la transferencia plasmídica, codificando los cuatro plásmidos resistencia para ampicilina. Sin embargo hubo una cepa la J53R6K portadora de un plásmido de bajo peso molecular que sufrió una importante afectación de su transferencia. Estos datos podrían ser indicativos de que las alteraciones estructurales de las bacterias tratadas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, dificultarían la capacidad de transferencia plasmídica, especialmente cuando los plásmidos fueran de elevado peso molecular.

Tampoco existió relación entre la mono o multirresistencia antibiótica codificada por los plásmidos y la capacidad de afectación de su transferencia al tratar sus cepas portadoras con ampicilina.

Igualmente la bacteria originaria de éstos plásmidos no poseía conexión con la posible afectación de su transferencia comportándose indistintamente plásmidos procedentes de igual o distinto género bacteriano.

Tenemos que concluir que siendo la cepa portadora E. coli J53 idéntica, todas las posibles diferencias existentes en los 14 plásmidos estudiados en cuanto a su transferencia al tratar dicha cepa con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, radican en los caracteres propios de cada uno de ellos como grupo de incompatibilidad, peso molecular, resistencia antibiótica que codifican y demás propiedades que poseen como ADN autónomo.

9. FRECUENCIA DE TRANSFERENCIA EN LAS CEPAS TRATADAS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA A DIFERENTES TIEMPOS.

Posteriormente realizamos el estudio de la frecuencia de transferencia en siete cepas J53R27, J53R144, J53R391, J53R387, J53R471a, J53pIP69 y J53R6K.

En este apartado se mantuvo fijo el tiempo de conjugación de las ---

cepas, que fué de dos horas y se amplió el tiempo de tratamiento con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, utilizando tiempos de 2, 6, 20 y 24 horas, previamente a la realización de la mezcla para la conjugación.

Inicialmente se escogieron las cepas J53R27 y J53R144, por ser las únicas que se incubaron a diferente temperatura de conjugación 25°C. Ninguno de los dos plásmidos albergados en ellas codificaba resistencia frente a ampicilina, siendo ambas cepas sensibles con una CMI de 4 y 2 µg/ml respectivamente. La otra cepa sensible utilizada fué la J53R387 con una CMI de 2 µg/ml siendo su comportamiento bastante más uniforme en la transferencia plasmídica, cuando se trató con dos horas de antibiótico que la J53R124, que presentaba la misma CMI.

Las cuatro cepas resistentes J53R391, J53R471a, J53pIP69 y J53R6K, albergaban plásmidos que codificaban resistencia frente a ampicilina, presentando dichas cepas la mayor CMI frente a éste antibiótico 1024 µg/ml. Descartándose las cepas J53R16a y J53RP1, con iguales valores de CMI, porque la primera presentando un comportamiento de transferencia similar a la J53pIP69 sus resultados eran menos uniformes y la J53RP1 porque presentaba escasa afectación de la transferencia con el tratamiento de dos horas.

Las siete cepas escogidas poseían plásmidos de bajo peso molecular, excepto la J53R27, teniendo esta característica común entre ellas, desechándose las otras tres cepas con plásmidos de semejante peso molecular, ya que apenas sufrieron alteración con las dos horas de tratamiento antibiótico. Estas cepas escogidas poseían además diferente patrón de resistencia antibiótica desde uno hasta cuatro antibióticos.

Analizando los resultados de los valores de F.T. al aumentar los tiempos de exposición de las bacterias donadoras a ampicilina, observamos una alteración mayor con descenso en la frecuencia de transferencia plasmídica, aunque el efecto principal se ejerció con sólo dos horas de tratamiento. Así de las siete cepas, dos la J53R27 y J53R144 no transfirieron sus plásmidos en ninguno de los tiempos de tratamiento, confirmando el hecho de que no

transfiriendo a las dos horas, al aumentar el tiempo de exposición a ampicilina el efecto sería mayor y la transferencia se vería más afectada. Esto -- mismo ocurrió con las cinco cepas que transfirieron sus plásmidos, ya que -- cuatro de ellas sufrieron una afectación brusca y progresiva de la transfe-- rencia al aumentar el tiempo de sometimiento de las cepas portadoras a ampi-- cilina, obteniéndose los valores más bajos de F.T. a las 6 y 20 horas de tra-- tamiento antibiótico y habiendo cierta recuperación hacia los valores de las cepas controles a las 24 horas, tiempo ya en el cual el antibiótico habría - dejado de actuar y muchas bacterias empezarian a comportarse sin los efectos modificantes de la ampicilina, mientras que la restante J53pIP69 sólo se a--fectó ligeramente.

Según la sensibilidad de las cepas frente a ampicilina podemos decir que las concentraciones subinhibitorias de éste antibiótico afectaron más la transferencia de plásmidos en las cepas sensibles a este antibiótico, cosa - que ocurría ya al tratarlas con sólo dos horas, ya que de las tres cepas sen-- sibles, dos no transfirieron en ningún tiempo y la restante la J53R387, aun-- que transfirió su plásmido fué una de las más afectadas con descenso hasta - de cuatro exponentes comparada con el control sin antibiótico. Sin embargo - las cuatro resistentes se afectaron en mayor la J53R6K o menor grado ja J53- R391 y la J53R471a, habiendo una la J53pIP69 que apenas se afectó siendo la cepa que menos se alteró de todas las estudiadas.

Podemos concluir que los plásmidos que codificaban resistencia a am-- picilina se afectaron menos en su transfe~~encia~~ que los que no lo hacian, in-- cluso cuando el tiempo de exposición al antibiótico de la cepa portadora lle-- gó a las 24 horas.

Podríamos añadir que extrapolando los datos realizados "in vitro" y siendo las concentraciones de ampicilina en suero y en orina de los enfermos tratados prolongadamente con este antibiótico similares y comprendidas den-- tro de los rangos desde 0'12 hasta 64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por nosotros estudiados y en ge-- neral habiendose comprobado la transferencia de plásmidos entre bacterias -- patógenas o habituales dentro del organismo humano (71)(77) podemos concluir

que las concentraciones subinhibitorias de ampicilina podrían dificultar la transferencia de plásmidos entre bacterias, en pacientes sometidos a tratamiento con éste antibiótico, pero no hasta el punto de impedir ésta, ya que -- hemos visto como algunos plásmidos se afectan escasamente con las concentraciones subinhibitorias de ampicilina.

10. CURACION DE PLASMIDOS CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

Existe una gran cantidad de agentes químicos y antibióticos, tales como Naranja de Acridina, Bromuro de Etidio, SDS, Novobiocina, Cloroquina, Rifampicina y Kasugamicina, así como el crecimiento a temperaturas elevadas y la luz ultravioleta, que son capaces de liberar o curar de plásmidos - ADN a las bacterias portadoras de ellos (Novick, 1969 (90), Riva et al. 1973 (91), Falkow, 1975 (71), Nakamura et al. 1975 (92), Hank y Ciak, 1976 (93), Danbara y Yoshikawa, 1977 (69), McHugh y Swartz, 1977 (72), Hill y Carlisle, 1981 (94), Breeze y Obaseiki-Ebor, 1983 (95).

Estos plásmidos que pueden existir como moléculas de ADN que se replican autónomamente pueden ser eliminados en algunos casos interfiriendo en su replicación (Naranja de Acridina, Bromuro de Etidio, Novobiocina) o por alteración de los lugares de unión en la membrana de la célula huésped necesario para su replicación (SDS y temperaturas elevadas)(Novick, 1969 (90).

Nosotros hemos estudiado en las 14 cepas si las concentraciones subinhibitorias de ampicilina, actuando durante dos horas, tendrían algún efecto curativo de plásmidos. Para ello sometimos las 14 cepas a concentraciones de ampicilina inferiores a las CMIs de cada cepa, durante dos horas.

Analizando los resultados obtenidos vemos que las concentraciones -- subinhibitorias de ampicilina no hicieron desaparecer los plásmidos de 11 de las cepas (78'6 %), presentando ligera afectación en las tres restantes ---- (21'4 %). De ellas, la cepa J53R387, sensible a ampicilina, sufrió pérdida - plasmídica tanto sin tratamiento como al tratarla con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, en un porcentaje de curación similar 0'37 % y ----

y 0'33 % respectivamente. Por lo tanto no podemos deducir que la ligera pérdida plasmídica sufrida por ésta cepa fuera debido al afecto de las concentraciones subinhibitorias de ampicilina, ya que existía la misma pérdida en la cepa control sin antibiótico, sino que fuera debido posiblemente a cualquier otro factor que actuara durante el proceso de la multiplicación bacteriana.

Las cepas J53R401 y J53R6K, ambas resistentes a ampicilina, sufrieron una ligera pérdida plasmídica al tratarlas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, comparadas con sus controles respectivos sin tratamiento, donde no hubo ninguna afectación. Sin embargo esta pérdida plasmídica -- fué muy pequeña con respecto al total de bacterias procesadas y no llegó al 1 % de dichas bacterias. Los dos plásmidos albergados en estas cepas tenían en común su procedencia de la misma especie bacteriana Proteus rettgeri y -- poseían el mismo patrón de resistencia antibiótica Am, Sm. Siendo las dos cepas portadoras de estos plásmidos tratadas con concentraciones de 16 y 64 -- $\mu\text{g/ml}$ respectivamente de ampicilina.

Podemos sin embargo concluir que las concentraciones subinhibitorias de ampicilina no poseen actividad curativa o de eliminación de plásmidos en las cepas de E. coli aunque podrían afectar ligeramente a determinadas cepas, aunque sin significación en cuanto al volumen total de bacterias que participan en el proceso de la conjugación bacteriana, ya que las tres cepas transfirieron en todos los tiempos de tratamiento probados aunque en el caso de las dos curadas al tratarlas con ampicilina y no sus controles, J53R401 y J53R6K, hubo una gran afectación de la transferencia sobretodo en la J53R6K, que podría deberse a la ligera pérdida plasmídica sufrida por estas cepas, -- mientras que la J53R387, sólo sufrió una ligera afectación de su transferencia.

También es importante considerar que tal vez el tiempo de dos horas de tratamiento con ampicilina, no sería suficiente para la curación plasmídica de las cepas, así como las bajas concentraciones de 0'12 hasta 64 $\mu\text{g/ml}$ -- del antibiótico empleadas, pero que son las que se encuentran en el cuerpo --

humano, por lo que podemos considerar que las bacterias portadoras de plásmidos R, que están produciendo patología en el hombre no pierden sus plásmidos cuando el paciente está tratado con ampicilina, pudiendo estos seguir codificando resistencia a dicho antibiótico en las bacterias que poseen dichos --- plásmidos.

Comparando nuestros resultados con los obtenidos por otros autores - con otros antibióticos estos no son muy distintos, así McHugh y Swartz (72) utilizaron concentraciones de novobiocina comprendidas entre 50 y 175 $\mu\text{g/ml}$ con un tiempo de tratamiento de 18 horas para obtener una curación plasmídica significativa en cepas de E. coli J53 en determinados plásmidos, sin embargo estos autores no obtenían curación de los plásmidos R124, R27 y RP1 al igual que ocurría en nuestro trabajo. No obstante es importante reseñar de - que estos datos son solamente ilustrativos de la curación plasmídica por antibióticos y no equiparables ya que el mecanismo de acción sobre las bacterias de ampicilina (B-lactámico, que actúa sobre la pared) y novobiocina (inhibidor de la actividad de la ADN-girasa) son completamente diferentes.

11. ALTERACIONES MORFOLOGICAS EN LAS CEPAS DE E. COLI TRATADAS CON - CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE AMPICILINA.

La aparición de alteraciones morfológicas inducidas por las concentraciones subinhibitorias de antibióticos ha sido ampliamente estudiada probando diferentes antibióticos frente a diversos géneros bacterianos tanto -- "in vitro" (7)(8)(11)(96)(97)(98)(99)(100)(101), como "in vivo" en pacientes tratados con antibióticos y observando la morfología bacteriana en las muestras clínicas (102)(103); aunque estas formas anormales de bacterias también se han observado en muestras clínicas de pacientes sin tratamiento antibiótico (104)(105).

En nuestro trabajo hemos estudiado las alteraciones morfológicas que presentaban las 14 cepas de E. coli sometidas a tratamiento con concentraciones subinhibitorias de ampicilina durante tiempos de 2, 6, 20 y 24 horas.

Comprobamos un alargamiento progresivo de las células de E. coli con

el tratamiento con concentraciones subinhibitorias de ampicilina en todas -- las cepas, alterándose la morfología bacteriana con el tiempo de exposición al antibiótico y aumentando el número de esferoplastos. Sin embargo considerando que el antibiótico se va inactivando con el tiempo, por lo que tendría menos efecto sobre las bacterias, esto no se corresponde con el aumento progresivo del número de esferoplastos al aumentar los tiempos de tratamiento. Este hecho tal vez fuera debido a que una vez dañada la pared de la bacteria por efecto del antibiótico, ésta continuaría deformandose con el tiempo sin tabicarse apareciendo mayores los esferoplastos a lo largo del tiempo, no -- descartándose tampoco el efecto producido por productos tóxicos o envejeci-- miento progresivo del cultivo.

Hay que destacar que la cepa que más se alteró fué la J53R27, sensible a ampicilina (CMI = 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$), con una alteración del 71 % de las células a las 24 horas. Esta cepa junto con la J53R144, también sensible a ampicilina (CMI = 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), fueron las que presentaban un mayor alargamiento de los esferoplastos con tamaños incluso veinte veces superiores al normal de una célula de E. coli, desconociéndose el significado de este dato. Sin embargo estas dos cepas fueron las que sufrieron una mayor alteración de la transferencia plasmídica, al tratar dichas cepas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, siendo las dos únicas que no transfirieron sus plásmidos -- en ninguno de los tiempos de conjugación estudiados.

Al contrario las cepas menos afectadas fueron la J53R471a y J53R391, ambas resistentes a ampicilina con la misma CMI = 1024 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que presentaron una alteración del 29 % y del 37 % de las células respectivamente a las 24 horas de tratamiento antibiótico. En las 11 cepas restantes la alteración morfológica sufrida superaba al 50 % de las bacterias a las 24 horas de tratamiento con ampicilina.

Podemos establecer una relación entre mayor afectación morfológica -- de las bacterias y alteración de la transferencia plasmídica. Al ser la ampicilina un antibiótico B-lactámico que actúa alterando la pared bacteriana -- podría implicarse una alteración en dicha pared que dificultaría la replica-

ción y posterior paso de ADN plasmídico de una bacteria a otra, añadido al hecho de que los esferoplastos se formen por bacterias cuya pared afectada por la acción del antibiótico les impide separarse en dos bacterias hijas in dependientes.

Para establecer esta relación entre frecuencia de transferencia plasmídica y aumento del número de esferoplastos, dividiremos las 14 cepas estudiadas en dos grupos.

En el primero consideramos las siete cepas J53R1, J53R124, J53pIP55, J53R16a, J53pIP175, J53RP1 y J53R401, las cuales se trataron solamente con dos horas de concentraciones subinhibitorias de ampicilina, para estudiar su efecto sobre la transferencia plasmídica, mientras que se utilizaron 2, 6, 20 y 24 horas de tratamiento antibiótico para observar sus alteraciones morfológicas.

En este grupo no observamos una relación directa entre el aumento -- del número de esferoplastos que osciló entre 5 veces (cepa J53R16a) y 19 veces (cepa J53R1) a las 24 horas de tratamiento, comparadas con las cepas con troles, y la alteración de la transferencia plasmídica sufrida por estas cepas , con dos horas de tratamiento con ampicilina.

Así en seis cepas afectadas morfológicamente en mayor o menor grado, de ellas en cuatro J53R124, J53pIP55, J53pIP175 y J53R401 se afectaron su -- transferencia más o menos profundamente pero transfiriendo todas sus plásmidos en los cuatro tiempos de conjugación estudiados, excepto la J53pIP55, -- que no transfirió a los 30 y 60 minutos, aunque sí lo hizo a los 90 y 120, -- siendo la cepa más afectada en su transferencia. Sin embargo en las dos restantes J53R1 y J53RP1, sufrieron una gran afectación en su morfología al tra tarlas con ampicilina pero sin embargo su transferencia plasmídica apenas se vió afectada, con valores de frecuencia de transferencia semejantes a los -- controles sin antibiótico. En la cepa restante de este grupo la J53R16a, fué una de las cepas menos afectadas ~~morfológicamente~~ y también sufrió una ligera disminución de la transferencia plasmídica, estando relacionadas ambas.

El segundo grupo estaba formado por las cepas J53R27, J53R144, J53R391, J53R387, J53R471a, J53pIP69 y J53R6K, las cuales se trataron con concentraciones subinhibitorias de ampicilina durante 2, 6, 20 y 24 horas tanto para observar sus alteraciones morfológicas como para ver como se alteraba su transferencia plasmídica a lo largo del tiempo.

En estas cepas observamos una mayor relación entre ambas, estableciéndose una relación directa entre el aumento del número de esferoplastos a lo largo del tiempo y disminución de la frecuencia de transferencia en las mismas cepas.

Así las dos cepas que no transfirieron sus plásmidos J53R27 y J53R144, fueron las más afectadas morfológicamente con un aumento del número de esferoplastos de 12 veces comparadas con las controles sin tratamiento, a las 24 horas de someterlas a la acción de la ampicilina. En las cinco restantes en las cuales sí hubo transferencia plasmídica en todos los tiempos de conjugación estudiados, la afectación de la morfología bacteriana fué menor, siendo entre 9 y 10 veces mayor el número de esferoplastos, comparados con sus controles respectivos, en las cuatro cepas que se afectaron más profundamente en su transferencia plasmídica J53R391, J53R387, J53R471a y J53R6K, mientras que la cepa J53pIP69 que sólo aumentó en 5 veces el número de esferoplastos, comparada con la control sin antibiótico, apenas sufrió alteración de su transferencia plasmídica, con valores de frecuencia de transferencia ligeramente inferiores al control, siendo la cepa menos afectada de este grupo.

Comparando la alteración morfológica de las cepas tratadas con ampicilina y sus CMI's frente a dicho antibiótico, podemos destacar que las cuatro cepas sensibles se afectaron con aumento entre 8 y 12 veces en el número de esferoplastos a las 24 horas comparadas con sus controles respectivos, en cambio las dos cepas menos afectadas con aumento del número de esferoplastos de sólo 5 veces, comparadas con sus controles, presentaban la mayor resistencia frente a dicho antibiótico con una CMI = 1024 $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo en el resto de las ocho cepas resistentes no hubo relación entre sus valores de --

CMI y el número de esferoplastos aparecidos a las 24 horas de tratamiento -- con aumento de éstos entre 8 y 19 veces comparadas con sus controles sin tratamiento con ampicilina.

12. FORMACION DE AGREGADOS BACTERIANOS DURANTE LA CONJUGACION EN LAS CEPAS DE E. COLI CON Y SIN TRATAMIENTO CON CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS - DE AMPICILINA.

La formación de parejas o agregados celulares durante la conjugación bacteriana para la transferencia plasmídica ha sido estudiada por diversos - autores (53)(54)(106)(107).

En nuestro trabajo hemos estudiado los efectos de las concentraciones subinhibitorias de ampicilina sobre la formación de dichos agregados bacterianos, tratados durante dos horas, y con tiempos de conjugación de 30, 60 y 120 minutos.

Hemos utilizado dos métodos diferentes:

1) Método turbidimétrico (Calleja, 1984 (53), que determina el volumen total de agregados formados.

Hay que reseñar que por este método la detección de agregados bacterianos fué mayor en las cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias - de ampicilina que en las no tratadas. Sin embargo estos datos pueden ser poco significativos ya que la escasa diferencia a veces existente en el índice de absorvancia con formación de agregados, puede ser debido a la tasa de -- crecimiento bacteriano como han señalado algunos autores (Achtman, 1975 (54) y además cuando sometemos las bacterias a tratamiento con ampicilina, la formación de esferoplastos de gran tamaño, podrían alterar el volumen total de las bacterias que es lo que se determina por espectrofotometría, teniendo en cuenta también que se vería afectada la tasa de crecimiento al someter las - bacterias al tratamiento antibiótico sobretodo con B-lactámicos como la ampicilina (11).

2) Método microscópico (Achtman, 1975 (54), que permite observar di-

rectamente como están formados los agregados bacterianos y de cuantas células están compuestos cada uno de ellos.

Podemos generalizar, a la vista de los resultados obtenidos, que considerando la formación de agregados a lo largo del tiempo de conjugación, observamos que éstos son de menor número de bacterias a los 30 que a los 120 minutos, observándose un aumento de agregados de mayor tamaño al aumentar el tiempo de conjugación.

Al tratar las cepas de E. coli con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, éstas no afectan de manera significativa al número de bacterias que forman cada agregado, comportándose de forma similar a las controles sin tratamiento antibiótico.

Sin embargo por éste método observamos la aparición de esferoplastos bacterianos, aunque el número de bacterias en los agregados no se veía alterado por la aparición de dichas bacterias deformadas. Este método puede ayudar a considerar por qué empleando el método turbidimétrico había un aumento del volumen que podría indicar formación de agregados y no solamente ser debido a la formación de bacterias de gran tamaño, ya que al microscopio hemos podido confirmar la formación de agregados en todas las cepas incluso en la cepa J53R16a, que no se detectaron con el método turbidimétrico.

Podemos resumir que las concentraciones subinhibitorias de ampicilina, no afectaban significativamente la formación de agregados durante la conjugación bacteriana, aunque la aparición de formas grandes, esferoplastos, podría indicar una mayor aglomeración celular al lado de éstas bacterias, pero no es fácil de probar su papel a la hora de la transferencia plasmídica, hecho este que como se ha visto anteriormente, influye en general de forma negativa disminuyendo la transferencia de plásmidos al tratar las cepas portadoras con ampicilina.

Por último debemos mencionar el importante papel que desarrollan los pilis en la transferencia plasmídica, conectando entre sí las células que --



constituyen los agregados bacterianos y permitiendo el paso de ADN plasmídico a través de ellos, siendo también muy importante el contacto célula a célula en dicha transferencia (106). Por otro lado debemos señalar como cada plásmido según sus caracteres propios y de grupo de incompatibilidad origina diferentes tipos de pilis conjugativos, hecho estudiado por diversos autores (34)(35)(108), que pueden ser gruesos o delgados, flexibles o rígidos, que les confieren características propias en su papel de la transferencia de plásmidos de una bacteria a otra.

El estudio de los efectos de las concentraciones subinhibitorias de ampicilina sobre los pilis conjugativos que originan los diversos plásmidos, sería una línea a seguir en el estudio y profundización del papel que desarrollan las concentraciones subinhibitorias de antibióticos sobre la transferencia de plásmidos R que confieren resistencia a dichos antibióticos y su importante aplicación en la clínica para un mejor empleo y conocimiento de la antibioterapia.

CONCLUSIONES

1. Se calculó el peso molecular de los 14 plásmidos estudiados, oscilando -- este entre 26 Mda (plásmido R6K) y 112 Mda (plásmido R27).
2. No se obtuvieron mutantes espontáneos para resistencia a rifampicina en-- tre las cepas donantes. Esto significa que todas las colonias crecidas en los medios selectivos, eran bacterias receptoras que habían adquirido el plásmido de resistencia correspondiente, es decir, transconjugantes.
3. La temperatura sólo afectó la conjugación de las cepas portadoras de los plásmidos R27 y R144, transfiriendo ambas estos plásmidos a 25°C pero no a 35°C. Estos plásmidos se aislaron por primera vez en Salmonella typhimurium, cuyo reservorio son los animales de granja.
4. En todos los experimentos control de conjugación, sin tratamiento antibi o tico, todas las cepas transfirieron sus plásmidos tras 30 minutos de con-- jugación.
5. Tras el tratamiento durante dos horas de las 14 cepas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, once de ellas se vieron afectadas, en su -- capacidad de conjugación, con disminución en su transferencia plasmídica en mayor o menor grado, mientras que las tres restantes, portadoras de -- los plásmidos R1, pIP175 y RP1, no se vieron alteradas en sus valores de transferencia.
6. De las once cepas que disminuyeron sus valores de transferencia plasmídi-- ca al tratarlas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina: ocho -

transfirieron sus plásmidos ya a los 30 minutos; una, la portadora del -- plásmido pIP55, no transfirió éste ni a los 30 ni a los 60 minutos, aun-- que sí lo hizo a partir de los 90 y las dos restantes, portadoras de los plásmidos R27 y R144, no transfirieron.

7. No encontramos ninguna relación directa entre el peso molecular de los -- plásmidos y su capacidad para transferirse después del tratamiento de las cepas portadoras con concentraciones subinhibitorias de ampicilina.
8. El tratamiento de siete cepas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina durante 2, 6, 20 y 24 horas, demostró de nuevo que las cepas portadoras de los plásmidos R27 y R144 perdían su capacidad de transferencia, sufriendo las otras cinco un descenso de la frecuencia de transferencia -- especialmente a partir de las 6 horas de tratamiento.
9. La transferencia de los plásmidos que codificaban resistencia a ampicilina se afecta menos que la de aquellos que no poseían esta propiedad, incluso cuando el tiempo de exposición al antibiótico de las cepas portadoras llegó a las 24 horas.
10. No se obtuvo curación apreciable de los plásmidos al tratar las cepas portadoras con concentraciones subinhibitorias de ampicilina.
11. Todas las cepas sufrieron alteraciones morfológicas al someterlas a tratamiento con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, incluidas las -- cepas resistentes a dicho antimicrobiano. A mayor tiempo de exposición -- también se ve incrementada la proporción de esferoplastos (bacterias con pared defectuosa y gran tamaño) presentes en el cultivo.
12. Las cepas portadoras de los plásmidos R27 y R144, fueron las más afectadas morfológicamente, siendo ambas las únicas que no transfirieron dichos plásmidos al tratarlas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina. Estableciéndose una relación directa entre afectación morfológica bacteriana y disminución de la capacidad de transferir sus plásmidos.

13. En las siete cepas tratadas con concentraciones subinhibitorias de ampicilina durante 2, 6, 20 y 24 horas para estudiar su transferencia plasmídica, encontramos una relación directa entre el aumento del número de esféroplastos a lo largo del tiempo y una disminución progresiva de la capacidad de transferir sus plásmidos.

14. Los agregados bacterianos formados en el proceso de conjugación bacteriana eran de mayor número de células al aumentar el tiempo de conjugación, encontrándose los agregados de mayor tamaño a los 120 minutos. Al someter las cepas al tratamiento con concentraciones subinhibitorias de ampicilina, no se alteró el número de agregados formados ni el tamaño de los mismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. LORIAN, V.; KOIKE, M.; ZAK, O. et al.: Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. pp: 72-78 en: Current Chemotherapy. Ed. ASM. Washington D.C., 1978.
2. LORIAN, V.; POPOOLA, B.: The effect of nitrofurantoin on the morphology of gram-negative bacilli. J. Infect. Dis. 125:187, 1972.
3. LORIAN, V.: Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. Bull. N.Y. Acad. Med. (2nd Ser.). 51:1046-1055, 1975.
4. ZANON, U.: Subinhibitory levels of antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 3:106-107, 1977.
5. LORIAN, V.: Antibiotiques a concentrations subinhibitrices: Effect sur la morphologie et la croissance. Pathol. Biol. 25:291-298, 1977.
6. LORIAN, V.; FREITAS, C. de: The minimum antibiotic concentrations (MACs) of aminoglycosides and B-lactam antibiotics from some gram-negative bacilli and gram-positive cocci. J. Infect. Dis. 139:599-603, 1979.
7. GARDNER, A.D.: Morphological effects of penicillin on bacteria. Nature. 149:837-838, 1940.
8. FLEMING, A.; VONREKA, A.; KRAMER, J.R.H.; HUGUES, W.H.: The morphology and motility of Proteus vulgaris and other organisms cultured in presence of penicillin. J. Gen. Microbiol. 4:257-269, 1950.

9. LEDERBERG, J.: Mechanism of action of penicillin. *J. Bacteriol.* 73:144, 1957.
10. CIAK, J.; HAHN, F.E.: Mechanisms of action of antibiotics. I. Additive - action of chloramphenicol and tetracyclines on the growth of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 75:125-129, 1958.
11. LORIAN, V.: Effects of subminimum inhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. pp: 342-408 en: *Antibiotics in laboratory medicine*. -- Baltimore. Ed. Williams & Wilkins, 1980.
12. STROMINGER, J.L.: Penicillin sensitive enzymatic reactions in bacterial cell wall synthesis. *Harvey Lect.* 64:179-213, 1969.
13. KLAINER, A.S.; PERKINS, R.: Surface manifestations of antibiotic-induced alterations in protein synthesis in bacterial cell. *Antimicrob. Agents - Chemother.* 1:164-170, 1972.
14. RICHMOND, M.H.: The action of B-lactam antibiotics. pp: 88-93 en: *B-lactam antibiotics: The background to their use as therapeutic agents*. ---- Frankfurt/Main. Hoechst Aktiengesellschaft, 1981.
15. MYCHAJLONKA, M; SCHOCKMAN, G.D.: Inhibition of RNA, protein and peptidoglycan synthesis by penicillin G in Streptococcus mutans. Annual Meeting of the American Society for Microbiology. New Orleans. Abstract p. 216 K 179, 1977.
16. LORIAN, V.; SABATH, L.D.; SIMIONESCU, M.: Decrease in ribosomal density of Proteus mirabilis exposed to inhibitory concentrations of ampicillin or cephalothin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149:731-735, 1975.
17. VIANO, I.; MARTINETTO, P.; VALTZ, A.; SANTIANO, M.; BARBARO, S.: Variability of immune response induced bacteria treated with subminimal inhibitory concentrations of fosfomycin. *Rev. Infect. Dis.* 1:858-869, 1979.

18. KYOTO, K.; KOIKE, M.: Cell wall alterations of gram-negative bacteria by aminoglycoside antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5:95-97, 1974.
19. OFEK, T.; BEACHEY, E.H.; EISENSTEIN, B.L.; ALKAN, M.L.; SHARON, N.: Suppression of bacterial adherence by subminimal inhibitory concentrations of B-lactam and aminoglycoside antibiotics. *Rev. Infect. Dis.* 1:832-838, 1979.
20. EISENSTEIN, B.L.; BEACHEY, E.H.; OFEK, T.: Influence of sublethal concentrations of antibiotics on the expression of the manose-specific ligand of Escherichia coli. *Infect. Immun.* 28:154-159, 1980.
21. VOSBECK, K.; METT, M.; HUBER, U.; BOHN, J.; PETIGNAT, M.: Effects of low concentrations of antibiotics on Escherichia coli adhesion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:864-869, 1982.
22. BEN REDJEB, S.; SLIM, A.; HOSCHANI, A.; ZMERILLI, S.; BONJUAH, A.; LORIAN, V.: Effects of ten milligrams of ampicillin per day on urinary tract infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:1084-1086, 1982.
23. DUTCHER, B.S.; REYNARD, A.M.; BECK, M.E.; CUNNINGHAM, R.K.: Potentiation of antibiotic bactericidal activity by normal human serum. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:820-826, 1978.
24. LORIAN, V.; ATKINSON, B.: Effect of serum on gram-positive cocci grown in the presence of penicillin. *J. Infect. Dis.* 138:865-871, 1978.
25. REYMANN, T.M.; BRADAC, J.A.; COBBS, C.G.; DISMUKER, W.E.: Correlation of aminoglycoside dosage with serum concentrations during therapy of serious gram-negative bacillary diseases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16:353-361, 1979.
26. LORIAN, V.; ATKINSON, B.: Effect of serum and blood on enterobacteriaceae grown in the presence of subminimal inhibitory concentrations of --

- ampicillin and mecillinam. Rev. Infect. Dis. 1:797-806, 1979.
27. ATKINSON, B.: Phagocytosis and serum complement activity on bacteria exposed to antibiotics. p. 15 en: Current Chemotherapy. Ed. ASM. Washington D.C., 1982.
 28. TURCK, M.L.; GUTMAN, T.; WEDGWOOD, R.J. et al.: Significance of bacterial variants in urinary tract infections. pp: 415-421 en: Microbial Protoplast, Spheroplasts and L-forms. Baltimore. Ed. Williams & Wilkins, 1968.
 29. LORIAN, V.; VALUSCHKA, A.: Blood cultures showing aberrant forms of bacteria. Am. J. Clin. Pathol. 57:406-409, 1972.
 30. LORIAN, V.: Abnormal forms of bacteria. Mt. Sinai J. Med. 43:762-775, -- 1976.
 31. WILLETTS, N.: Conjugation. pp: 33-59 en: Methods in Microbiology. Vol. - 17. Londres. Ed. Academic Press, 1984.
 32. WILLETTS, N.; WILKINS, B.: Processing of plasmid DNA during bacterial -- conjugation. Microbiol. Rev. 48:24-41, 1984.
 33. DATTA, N.: Plasmid classification: incompatibility grouping. pp: 3-12 -- en: Plasmids of medical, environmental and commercial importance. Amsterdam. Ed. Biomedical Press, 1979.
 34. BRADLEY, D.E.: Morphological and serological relationships of conjugative pili. Plasmid. 4:155-169, 1980.
 35. BRADLEY, D.E.; TAYLOR, D.E.; COHEN, D.R.: Specification of surface mating systems among conjugative drug resistance plasmids in Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. 143:1466-1470, 1980.
 36. DATTA, N.: Classification of plasmids as an aid to understanding their --

- epidemiology and evolution. *J. Antimicrob. Chemother.* 3:19, 1977.
37. ECKHARDT, T.: A rapid method for the identification of plasmid DNA in -- bacteria. *Plasmid.* 1:584, 1978.
 38. LEMINOR, S.: Le diagnostic de laboratoire des bacilles gram negativ. *Enterobacteries (I)*. Paris. Ed. De le Tourelle, 1972.
 39. EDWARD, P.R.; EWING, W.H.: Identification of the Enterobacteriaceae. Minneapolis. Ed. Burgess Publishing Co., 1972.
 40. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M.: Antibiotic susceptibility testing by a standarized single dish method. *Ann. J. Clin. Path.* 45:493, 1966.
 41. WASHINGTON II, J.A.; BARRY, A.L.: Dilution test procedures. *Manual of -- Clinical Microbiology*. Washington D.C. Ed. ASM. , 1974.
 42. STEERS, E.; FOLTZ, E.L.; CRAVES, B.S.; RIDEN, J.: An inocula-repplica---ting apparatus for routine testing of bacterial susceptibility of anti--biotics. *Antibiot. Chemother.* 9:307, 1959.
 43. LORIAN, V.; ATKINSON, B.; AMARAL, L.: Effects of subminimum inhibitory - concentrations of antibiotics on Pseudomonas aeruginosa: The MIC/MAC ratio. pp: 193-205 en: Pseudomonas aeruginosa, the organism, diseases it - cause and their treatment. Berna. Ed. Hans Huber, 1980.
 44. MEYERS, J.A.; SANCHEZ, D.; ELWELL, L.P.; FALKOW, S.: Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of -- plasmid DNA. *J. Bacteriol.* 127(3):1529, 1976.
 45. MACRINA, F.L.; KOPECKO, D.J.; JONES, K.R.; AYERS, D.I.; MACLOWEN, S.M.: A multiple plasmid-containing E. coli strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid.* 1:417, 1978.

46. WILLSHOW, G.A.; SMITH, H.R.; ANDERSON, E.S.: Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmids DNA in drug resistant Enterobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 114:15-23, 1979.
47. CLOWES, R.C.; HAYES, W.: Experiments in Microbial Genetics. Oxford. Ed. Backwell Sci. Pu., 1968.
48. DATTA, N.; HEDGES, R.W.: Host ranges of R factors. *J. Gen. Microbiol.* -- 70:453-460, 1972.
49. MEYNELL, G.G.; MEYNELL, E.: Theory and practice in experimental bacteriology. Londres. Ed. Cambridge University Press (2 Ed.), 1970.
50. YOSHIDA, Y.; TERAWAKI, Y.; NAKAYA, R.: Temperature sensible R plasmid -- originated from Salmonella typhimurium. *Biochem. Res. Commun.* 59:361-369 1974.
51. NAKAYA, R.; YOSHIDA, Y.; TERAWAKI, Y.: Antibiotic resistance and R plasmids in Salmonella isolated from humans in Japan (1966-1972). pp : 237-- 252 en : Microbial drug resistance. Tokyo. Ed. University Park Press, -- 1975.
52. AOKI, T.; ARAI, T.; EGUSA, S.: Detection of R plasmids in naturally occurring fish pathogenic bacteria Edwardsiella tarda. *Microbiol. Immun.* 21 - (2):77-83, 1977.
53. CALLEJA, G.B.: Mating-aggregate formation during conjugation in E. coli. pp : 93-101 en: Microbial Aggregation. Boca Raton, Florida. Ed. C.R.C. - Press Inc., 1984.
54. ACHTMAN, M.: Mating aggregates in Escherichia coli conjugation. *J. Bacteriol.* 123:505-515, 1975.
55. LORIAN, V.; SABATH, L.D.: Penicillins and cephalosporins: differences in



- morphologic effects on Proteus mirabilis. J. Infect. Dis. 125:560-564, - 1972.
56. LORIAN, V.; ATKINSON, B.: Comparison of the effects of mecillinam and 6-aminopenicillanic acid on Proteus mirabilis, Escherichia coli and Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 11:541-552, 1977.
57. SHAH, P.M.; HEEDERKS, G.; STILLE, W.: Activity of amikacin at subinhibitory levels. J. Antimicrob. Chemother. 2:97-100, 1976.
58. ZANON, U.: Determination of minimal antibacterial concentrations of aminoglycosides on E. coli and S. aureus. pp 74-76 en: Current Chemotherapy. Ed. ASM. Washington D.C., 1978.
59. SPRATT, B.G.: Distint penicillin binding protein involved in the division, elongation and shape of Escherichia coli K-12. Proc. Natl. Acad. Sci. 72:2999-3003, 1975.
60. VOSBECK, H.; HANDSCHIN, H.; MENGE, E.B.; ZAK, O.: Effects of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on adhesiveness of E. coli in vitro. Rev. Infect. Dis. 1:845-851, 1979.
61. VAISANEN, V.; LOUNATMAA, K.; KORHONEN, T.K.: Effects of sublethal concentrations of antimicrobial agents on the hemagglutination, adhesion and ultrastructure of pyelonephritogenic Escherichia coli strains. Antimicrob. Agents Chemother. 22:120-127, 1982.
62. NISHIDA, M.; MINE, Y.; NONOYAMA, S.; YOKOTA, Y.: Effect of antibiotics on the phagocytosis and killing of Pseudomonas aeruginosa by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Chemother. 22:203-210, 1976.
63. LORIAN, V.; ATKINSON, B.; KIM, Y.: Phagocytosis of filaments of Escherichia coli produced with mezlocillin. J. Antimicrob. Chemother. 11 s(c): 71-78, 1983.

64. ANDREANA, A.; PERUA, P.; UTILI, R.; DILILLO, M.; RUGGIERO, G.: Increased phagocytosis and killing of Escherichia coli treated with subinhibitory concentrations of cefamandole and gentamicin in isolated rat livers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 25:182-186, 1984.
65. MAJESKI, J.A.; McCLELLAN, M.A.; ALEXANDER, J.W.: Effect of antibiotics on the in vitro neutrophil chemotactic response. *Am. Surg.* 42:785-788, 1976.
66. PUSZTAI-MARKOS, Z.; PRANADA, F.: Effect of treatment with subinhibitory concentrations of antibiotics on the fate of bacteria in the mouse. pp 199-201 in: *Current Chemotherapy*. Ed. ASM. Washington D.C., 1982.
67. ALEXANDER, J.W.: Antibiotic agents and the immune mechanisms of defense. *Bull. N. Y. Acad. Sci.* 51:1039-1045, 1975.
68. BUKHARI, A.I.; SHAPIRO, J.A.; ADHYA, S.L. (Eds.): DNA: Insertion, Elements, Plasmids and Episomes. U.S.A. Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
69. DANBARA, H.; YOSHIKAWA, M.: Susceptibility to kasugamycin of Escherichia coli carrying conjugative and nonconjugative R plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12:131-134, 1977.
70. RICHARDS, H.; DATTA, N.: Reclassification of incompatibility group L (Inc L) plasmids. *Plasmid.* 2:293-295, 1979.
71. FALKOW, S.: *Infections multiple drug resistance*. Londres. Ed. Pion Limited, 1975.
72. McHUGH, G.H.; SWATZ, M.N.: Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12:423-426, 1977.
73. SHEEHY, R.J.; CLARK, C.W.; ARCHIBALD, E.R.: Isolation of nonintegrated -

- plasmid DNA in E. coli free from host folded chromosomes. pp : 112-114 - en : Microbiology. Washington D.C. Ed. Schlessinger, 1978.
74. CROWLESMITH, I.; HOWE, T.G.B.: Characterization of B-lactamase-deficient (bla) mutants of the R plasmid R1 in Escherichia coli K-12. Antimicrob. Agents Chemother. 18:667-674, 1980.
 75. TREECK, U.; SCHMIDT, F.; WIEDEMANN, B.: Molecular nature of a streptomycin and sulfonamide resistance plasmid (pBP 1) prevalent in clinical Escherichia coli strains and integration of an ampicillin resistance transposon (TnA). Antimicrob. Agents Chemother. 19:371-380, 1981.
 76. HUGHES, C.; BAUER, E.; ROBERTS, A.P.: Spread of R plasmids among Escherichia coli causing urinary tract infections. Antimicrob. Agents Chemother. 20:496-502, 1981.
 77. PALOMARES, J.C.; PEREA, E.J.: Comparison between plasmids of Salmonella and other enterobacter isolated from the same patients. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133A:301-310, 1982.
 78. CAMPOS, P.; VERA, A.; MARTIN-LUENGO, F.: Efecto del ácido nalidíxico sobre la transferencia de plasmidos de diversos grupos de incompatibilidad. Infectologika. IV/236:25-31, 1983.
 79. KULPA, C.F.; ROSKEY, M.T.; TRAVIS, M.T.: Transfer of plasmid RP1 into -- chemolithotrophic Thiobacillus neapolitanus. J. Bacteriol. 156:434-436, 1983.
 80. TARDIF, G.; GRANT, R.B.: Transfer of plasmids from Escherichia coli to Pseudomonas aeruginosa: characterization of a Pseudomonas aeruginosa mutant with enhanced recipient ability for enterobacterial plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 24:201-208, 1983.
 81. TIMONEY, J.F.; TAYLOR, D.E.; SHIN, S.; McDONOUGH, P.: pJT2: Unusual H1 -

- plasmid in a highly virulent lactose-positive and chloramphenicol-resistant Salmonella typhimurium strain from calves. *Antimicrob. Agents Chemother.* 18:480-482, 1980.
82. TAYLOR, D.E.; DE GRANDIS, S.A.; KARMALI, M.A.; FLEMING, P.C.: Transmissible plasmids from Campylobacter jejuni. *Antimicrob. Agents Chemother.* -- 19:831-835, 1981.
83. LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E.M.: Replica plating indirect selection of -- bacterial mutants. *J. Bacteriol.* 63:399, 1952.
84. MENDELMAN, P.H.; ROBERTS, M.C.; SMITH, A.L.: Mutation frequency of Haemophilus influenzae to rifampin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 22:531-533, 1982.
85. TANAKA, T.; IKEMURA, K.; TSUNODA, M.: Drug resistance and distribution of R-factors in Salmonella strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9:61--64, 1976.
86. CHUN, D.; SEOL, S.Y.; CHO, D.T.; TAK, R.: Drug resistance and R plasmids in Salmonella typhi isolated in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11: 209-213, 1977.
87. RANGNEKAR, V.M.; BANKER, D.D.; JHALA, H.I.: Antimicrobial resistance and incompatibility groups of R plasmid in Salmonella typhimurium isolated from human source in Bombay from 1978-1980. *Antimicrob. Agents Chemother.* 23:54-58, 1983.
88. IÑIGUEZ, R.: Plasmidos R en el género Salmonella. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 1984.
89. CHABBERT, Y.A.; SCAVIZZI, M.R.; WITCHITZ, J.L.; GERBAUD, G.P.; BONAN----CHAND, D.H.: Incompatibility groups and the classification of F_i^- resistance factors. *J. Bacteriol.* 112:666-675, 1972.

90. NOVICK, R.P.: Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.* 33(2), 1969.
91. RIVA, S.; FIETTA, A.; BERTI, M.; SILVESTRI, L.G.; ROMERO, E.: Relationships between curing of the F episome by rifampin and by acridine orange in Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3:453-462, 1973.
92. NAKAMURA, H.; SUGANUMA, A.; GREENBERG, J.: Effect of inorganic phosphate on acridine inhibition and plasmid curing in E. coli. *J. Gen. Microbiol.* 91:45, 1975.
93. HAHN, F.E.; CIAK, J.: Elimination of resistance determinants from R factor R1 by intercalative compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 9(1):77 1976.
94. HILL, W.E.; CARLISLE, C.L.: Lost of plasmids during enrichment for E. coli. *Appl. Envir. Microbiol.* 41(4):1046, 1981.
95. BREEZE, A.S.; OBASEIKI-EBOR, E.E.: Transferable nitrofurantoin resistance -- conferred by R-plasmids in clinical isolates of Escherichia coli. *J. Antimicrob. Chemother.* 12:459-467, 1983.
96. DUGUID, J.P.: The sensitivity of bacteria to the action of penicillin. - *Edimb. Med. J.* 53:401-412, 1946.
97. FLOREY, H.W.; CHAIN, E.; HEATLEY, N.G., et al.: Effects on morphology . pp : 1144-1151 en: *Antibiotics*. Londres. Ed. Oxford University Press, -- 1949.
98. LEDERBERG, J.: Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 41:575-577, 1956.
99. LEDERBERG, J.; ST. CLAIR, J.: Protoplasts and L-type growth of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 75:140-160, 1958.

100. LONG, W.W.; SLAYMAN, C.L.; LOW, K.B.: Production of giant cells of Escherichia coli. J. Bacteriol. 133:995-1007, 1978.
101. LORIAN, V.; ATKINSON, B.: Abnormal forms of bacteria produced by antibiotics. Am. J. Clin. Pathol. 64:678-688, 1975.
102. BRAUDE, A.L.; SIEMIENSKI, J.; LEE, K.: Spheroplasts in human urine. pp: 396-495 en : Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms. Baltimore, Ed. Williams & Wilkins, 1968.
103. CHARADE, P.: Atypical bacterial forms in human disease. pp: 484 en : Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms. Baltimore. Ed. Williams & Wilkins, 1968.
104. GODZESKI, C.W.: In vitro persistence of L phase bacteria. pp: 379-390 - en: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms. Baltimore. Ed. Williams & Wilkins, 1968.
105. KALMANSON, G.H.; GUZE, L.B.: Pyelonephritis: isolation of protoplasts - from human kidney tissue. pp: 406-414 en: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms. Baltimore. Ed. Williams & Wilkins, 1968.
106. ACHTMAN, M.; MORELLI, G.; SCHWUCHOW, S.: Cell-cell interaction in conjugating Escherichia coli: Role of F pili and Fate of mating aggregates. J. Bacteriol. 135:1053-1061, 1978.
107. MANNING, P.A.; ACHTMAN, M.: Cell to cell interactions in conjugating Escherichia coli: The involvement of the cell envelope. pp: 409-447 en: - Bacterial outer membranes: biogenesis and functions. New York. Ed. John Wiley & Sons Inc., 1979.
108. DATTA, N.: Epidemiology and classification of plasmids. pp: 9-15 en: Microbiology. Washington D.C. Ed. Schlessinger, 1975.