



R.4341

TD 651
657

PLASMIDOS R EN ESPECIES DE *Bacteroides*

Trabajo realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, por el Licenciado D. RUFINO JIMENEZ DIAZ

Rufino Jimenez Diaz

Sevilla, Julio de 1982

EL PONENTE

Fdo.: Prof. Dr. D.
Julio Pérez Silva

EL DIRECTOR

Fdo.: Prof. Dr. D.
Evelio J. Perea

EL CODIRECTOR

Fdo.: Dr. D. José
C. Palomares Folia

Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad de Sevilla

Prof. Evelio J. Perea

Prof. Dr. D. EVELIO PEREA PEREZ, Catedrático de Microbiología y Jefe del Departamento de Microbiología y Medicina Preventiva del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla

CERTIFICA: Que D. RUFINO JIMENEZ DIAZ ha realizado en este Departamento, bajo mi dirección y la codirección del Dr. JOSE C. PALOMARES FOLIA, el trabajo titulado " PLASMIDOS R EN ESPECIES DE Bacteroides " para optar a la colación del grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, veintidos de Julio de mil novecientos ochenta y dos.



Fdo.: Prof. Dr. D. E.J. Perea

A Diego y María.

A una tercera persona, femenino singular.

AGRADECIMIENTOS

Sería una tarea ardua y difícil, si no imposible, enumerar aquí a todas las personas que con su ayuda de sínter interesada y a veces desde el anonimato, han contribuido de alguna manera a la realización del presente trabajo. Vaya para todas ellas, mi más sincera gratitud.

Sin embargo, quisiera agradecer muy especialmente al Prof. Perea Pérez el que me haya permitido la reali zación de esta Tesis en el Departamento que él dirige, así como sus consejos y orientaciones en la elaboración de la misma.

Al Prof. Pérez Silva, no solo por actuar como Poner te de esta Tesis, sino por la favorable acogida que me ha dispensado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología que él dirige y donde desarrollo actualmente mis actividades docentes e investigadoras, además de permitirme utilizar el laboratorio fotográfi-

co de dicho Departamento para completar el trabajo desarrollado.

A José Carlos y a Concha; al primero, por su ayuda inestimable en el desarrollo, elaboración y redacción de esta Tesis, y a ella, por las cenas de trabajo que ha soportado pacientemente. Mi sincero agradecimiento para los dos.

A todos mis compañeros del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario, con los cuales he convivido (y me han aguantado) durante 3 años... y seguiré(án) haciéndolo.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología, a quienes agradezco su magnífica acogida, amistad y ayuda.

A Manuel Megías, cuya IBM hizo maravillas de escritura, igual que la del Departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología y la del Departamento de Microbiología del Hospital Universitario. Agradecido.

Y finalmente, a quienes sin intención alguna, he dejado de mencionar en este apartado. Mil gracias.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION.....	1
MATERIALES.....	6
1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS.....	6
2. PRODUCTOS.....	9
2.1. Químicos.....	9
2.2. Biológicos.....	10
2.3. Antibióticos.....	10
3. TAMPONES.....	13
3.1. Tampón de electroforesis.....	13
3.2. Tampón sacarosa.....	13
3.3. Tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0.....	14
3.4. Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0.....	14
3.5. Tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0.....	15
3.6. Tampón Tris-EDTA Na ₂	15
3.7. Tampón ARNasa.....	15
3.8. Tampón Tris-Borato.....	16
3.9. Tampón enzimas de restricción.....	16
4. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.....	16
4.1. Medios de aislamiento y crecimiento.....	16

4.2. Medios de identificación (medios <u>pre</u> <u>reducidos</u>).....	17
4.2.1. Medio Indol-Nitrito.....	19
4.2.2. Cooked Meat Medium.....	19
4.3. Medios para la detekminación de la sensibilidad a antibióticos.....	20
4.4. Medios para la selección de transcon jugantes.....	21
4.5. Medios para la conservación de <u>micro</u> organismos.....	22
MÉTODOS.....	23
1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTE- RIAS ANAEROBIAS.....	23
2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A AN- TIMICROBIANOS.....	24
2.1. Método disco-placa.....	24
2.2. Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.....	25
3. DETECCION DE LA PRODUCCION DEL ENZIMA BETA-LACTAMASA.....	27
4. PREPARACION DEL ENZIMA BETA-LACTAMASA Y ENFOQUE ISOELECTRICO DEL MISMO.....	30

5. METODO RAPIDO PARA LA DETECCION DE PLASMIDOS DE ADN.....	31
6. CALCULO DEL PESO MOLECULAR DE PLAS- MIDOS MEDIANTE LA ELABORACION DE UNA RECTA DE CALIBRADO.....	33
7. EXTRACCIÓN DE PLASMIDOS POR ULTRA- CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE DEN- SIDAD.....	34
8. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA GENE- TICA.....	36
9. DIGESTION DE PLASMIDOS DE ADN MEDIAN- TE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.....	39
10. TRATAMIENTO CON AGENTES CURANTES DE PLASMIDOS.....	40
11. TRATAMIENTO COMBINADO DE <i>Bret</i> Y SDS CON TEMPERATURAS ELEVADAS.....	42
RESULTADOS.....	43
1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MI- CROORGANISMOS.....	43
2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	45
3. DETECCION DE FACTORES EXTRACROMOSOMI- COS EN ESPECIES DE BACTEROIDES. CAL-	

CULO DE SU PESO MOLECULAR.....	52
4. TRANSFERENCIA POR CONJUGACION DE LOS FACTORES EXTRACROMOSOMICOS PRE SENTES EN BACTEROIDES.....	62
5. TRATAMIENTOS CON AGENTES CURANTES DE PLASMIDOS.....	73
5.1. <i>Efecto del BrEt sobre la resistencia a antimicrobianos y la estabilidad de los plásmidos en Bacteroides.....</i>	78
5.2. <i>Efecto del SDS sobre la resistencia a antimicrobianos y la estabilidad de los plásmidos en Bacteroides.....</i>	84
5.3. <i>Efecto de la temperatura sobre la re- sistencia a antimicrobianos y la es- tabilidad de los plásmidos en Bacte- roides.....</i>	89
5.4. <i>Efecto del BrEt, SDS y temperatura, sobre la resistencia a antimicrobia- nos y estabilidad de plásmidos en Bac- teroides.....</i>	91
6. ANALISIS DE LA PRODUCCION DE BETA-LACTA MASA MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROEN- FOQUE.....	91

7. TRATAMIENTO DE LOS PLASMIDOS PRESENTES EN CEPAS DE <i>S. fragilis</i> CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....	96
DISCUSIÓN.....	105
CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143

INTRODUCCION

Entre la diversidad de especies bacterianas que coexisten como flora normal en el intestino humano y de animales, las bacterias anaerobias obligadas son los componentes predominantes de la misma, superando en número y variedad de especies a los anaerobios facultativos presentes, especialmente en el intestino grueso, donde la proporción es de 1000 a 1 (Drassar, 1974; Holdeman *et al.*, 1976).

No obstante su calidad de comensales y debido a ciertas condiciones patogénicas predisponentes, tales como traumatismos, destrucción tisular, infecciones previas debidas a bacterias aerobias que provocaron necrosis de los tejidos, estas bacterias se alejan de los confines impuestos por las barreras mucosas intestinales y provocan infecciones en sus huéspedes, tales como abscesos, apendicitis, peritonitis, neumonía por aspiración, empiema, salpingitis y otras (Tally y Gorbach, 1979).

Bacteroides fragilis ocupa una posición privilegiada

entre los patógenos anaerobios debido a que es la bacteria aislada más frecuentemente en infecciones intraabdominales y septicemias, además de ser resistente a un número de agentes antimicrobianos de uso común en bacteriología clínica, entre los que se encuentran penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas y aminoglicósidos (Gorbach y Bartlett, 1974; Finegold, 1977). Estas características, unidas al hecho de compartir un hábitat común con otras bacterias anaerobias facultativas, tales como *E. coli*, *Klebsiella* y *Proteus* y patógenos intestinales como *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*, portadores frecuentes de plásmidos R, ha impulsado el estudio de los plásmidos presentes en *Bacteroides fragilis* y su implicación en la resistencia de estas bacterias anaerobias a agentes antimicrobianos (Mare, 1968; Smith, 1969; Datta *et al.*, 1971; Anderson *et al.*, 1973; Anderson, 1975; Anderson *et al.*, 1975; Richmond, 1975; Richmond, 1976; Palomares y Perea, 1980).

Los primeros estudios en este campo comenzaron en época reciente, cuando Stiffler *et al.*, (1974) aislaron y caracterizaron algunos plásmidos crípticos presentes en *B. fragilis* obtenidos de muestras clínicas. El peso molecular de los mismos variaba desde 4×10^6 hasta $1,6 \times 10^7$

daltons (d) y no se les pudo asignar papel alguno en la resistencia a antibióticos.

Con posterioridad a estos hallazgos, algunos autores investigaron acerca de la posibilidad de transferencia *in vitro* de factores R desde *E. coli* a *B. fragilis* y sus conclusiones fueron que, si bien era posible dicho proceso, este exigía una serie de condiciones especiales, lo que dificultaría su consecución en el tracto digestivo humano. Por estas razones se afirmó que la transferencia de resistencias a antibióticos entre estirpes de estos comensales intestinales se llevaría a cabo por procesos distintos de la conjugación, tales como transducción o transformación (Burt y Woods, 1976; Del Bene *et al.*, 1976). Los intentos llevados a cabo por los mismos autores para transferir resistencias a agentes antimicrobianos desde cepas de *B. fragilis* a otras de *E. coli* y *B. fragilis* no tuvieron éxito.

Posteriores a estos intentos fueron los llevados a cabo por Macrina y Kopecko, (1979) y Welch *et al.*, (1979) los cuales aislaron, identificaron y transfirieron por conjugación los plásmidos encontrados en cepas de *B. fragilis* aisladas de muestras clínicas y otras bacterias del

género *Bacteroides*. Dichos plásmidos presentaban un peso molecular desde 0,2 hasta 32 megadaltons (Md) y algunos de ellos se asociaron con la resistencia a clindamicina, eritromicina y tetraciclina. Sus experimentos les permitieron concluir que los plásmidos de bajo peso molecular ($0,2 - 6 \times 10^6$ d) podían transferirse por conjugación, aunque para ello era necesaria la presencia de otro plásmido de peso molecular elevado en la bacteria donadora que ayudara a su movilización (Tally *et al.*, 1979).

Otros autores han conseguido el aislamiento e identificación de plásmidos de peso molecular comprendido entre 2 y 5×10^6 d en *B. fragilis* y otras especies de *Bacteroides*, pero los experimentos de transferencia de los mismos a otras estirpes han fracasado, presumiblemente por la ausencia de plásmidos portadores de los genes necesarios para la transferencia (genes *tra'*) (Wallace *et al.*, 1981; Macrina *et al.*, 1981).

A la luz de estos trabajos recogidos en la bibliografía, nuestros esfuerzos se encaminaron hacia el estudio de la relación existente entre las estirpes de *Bacteroides fragilis* aisladas de muestras clínicas, la pre

sencia de factores extracromosómicos en ellas, su estudio genético y molecular y su conexión con la resistencia a los antibióticos más utilizados en práctica clínica, principalmente los beta-lactámicos, cuyos mecanismos moleculares de resistencia se desconocen en parte en bacterias anaerobias, así como el papel que pudieran desempeñar en relación con el resto de la microflora facultativa acompañante del tracto digestivo humano.

Estos estudios nos parecieron interesantes por varias razones fundamentales, algunas de las cuales han sido expresadas anteriormente, pero además porque la comprensión de los mecanismos moleculares que rigen algunas de las funciones expresadas por este grupo de bacterias anaerobias sería de gran utilidad práctica en Microbiología Clínica, máxime cuando los estudios a este nivel se encuentran en un esperanzador comienzo en todo el mundo científico.

MATERIALES

1. ESTIRPES BACTERIANAS Y PLASMIDOS

Se utilizaron 60 bacterias pertenecientes al género *Bacteroides* aisladas de muestras clínicas, preferentemente de abscesos y exudados de heridas, procedentes de enfermos ingresados en el Hospital Universitario de Sevilla durante el año 1979 y que no habían sido sometidos a tratamiento antibiótico previo.

La distribución en especies de estas bacterias fue la siguiente:

<i>Bacteroides fragilis</i>	38
<i>Bacteroides distasonis</i>	5
<i>Bacteroides ovatus</i>	6
<i>Bacteroides thetaotaomicron</i>	3
<i>Bacteroides vulgatus</i>	8

Las estirpes bacterianas que se enumeran a continuación, fueron utilizadas como receptoras en los experimentos.

tos de conjugación:

E. coli K-12 E 711, F⁻, lac, his, pro, trp, Nal^r
(Moorhous y McKay).

E. coli Hfr H, thy, Rif^r (Datta, 1977).

B. fragilis TM 4000, Rif^r, Clin^r (Tally et al.,
1979).

Como bacterias portadoras de plásmidos de pesos moleculares conocidos, se utilizaron las estirpes de *E. coli* que se muestran en la Tabla I.

Las siguientes bacterias se utilizaron como controles positivo y negativo respectivamente, en las técnicas de detección de las especies de *Bacteroides* productoras del enzima beta-lactamasa:

E. coli ATCC 25922

S. epidermidis ATCC 25923

Las cinco cepas siguientes, gentilmente cedidas por J.E. Rosenblatt, fueron utilizadas como patrones de resistencia conocida e invariable en la determinación de la sensibilidad a agentes antimicrobianos:

B. fragilis ATCC 25285

Tabla I. Plásmidos usados como patrones en la estimación del peso molecular de otros estudiados. Relación de estirpes de *E. coli* portadoras y procedencia de las mismas.

Plásmido	Peso molecular (Md)	Estirpe portadora	Procedencia
R6k	26,0	<i>E. coli</i> J53 R6k	N. Datta
N3T	34,0	<i>E. coli</i> J53 N3T	"
RA-1	86,0	<i>E. coli</i> J53-1 RA-1	"
R27	112,0	<i>E. coli</i> J53 R27	"
R388	21,0	<i>E. coli</i> J53 R388	"
R1-16	25,0	<i>E. coli</i> J62 R1-16	"
R1-14	59,0	<i>E. coli</i> J62 R1-14	"
R1/1	67,0	<i>E. coli</i> J53 R1/1	"
JR66a	57,4	<i>E. coli</i> J53 JR66a	"
R1dnd19	69,0	<i>E. coli</i> J53 R1dnd19	S. Falkow
R478	166,0	<i>E. coli</i> J53 R478	N. Datta
-	35,8/4,8/3,7/3,4/2,6 2,0/1,8/1,4	<i>E. coli</i> V 517	F. Macrina

B. vulgatus ATCC 29327
C. perfringens ATCC 131224
P. magnus ATCC 29328
P. assacharolyticus MAYO P-227

2. PRODUCTOS

2.1. Químicos

Agarosa tipo II: Medium HEO (Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss., USA).

Cloruro de Cesio, Grado I, 99 +% (Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss., USA).

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

Polietilenglicol (Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss. USA).

Nitrocefín (Compuesto 87/312) (Glaxo Research Ltd., Greenford Midds, Gran Bretaña).

Tritón X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss., USA).

2.2. Biológicos

ADN del fago Lambda (Miles, Research Products, Gran Bretaña).

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

Ribonucleasa A, Tipo III (Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss., USA).

Eco RI (Miles, Research Products, Gran Bretaña).

Pst I (Miles, Research Products, Gran Bretaña).

Hinc II (Miles, Research Products, Gran Bretaña).

Bam H-I (Biolabs New England, Beverly, Madison, USA).

Hind III (Biolabs New England, Beverly, Mad., USA).

Sal I (Biolabs New England, Beverly, Madison, USA).

2.3. Antibióticos

Se utilizaron en dos formas diferentes, en disco y en polvo valorado. En disco, presentaban las siguientes concentraciones:

Acido Nalidixico (Nal)	30 µg
Ampicilina (Am)	10 µg

Carbenicilina (Car)	100 µg
Cefalotina (Cf)	30 µg
Cefamandol (Cfm)	30 µg
Cefoperazona (T-1551)	30 µg
Cefotaxime (Ctx)	30 µg
Clindamicina (Clin)	2 µg
Cloranfenicol (Cm)	15 µg
Cloxacilina (Clx)	1 µg
Eritromicina (Em)	15 µg
Metronidazol (Mtz)	4 µg
Rifampicina (Rif)	30 µg
Tetraciclina (Tc)	15 µg

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

Tabla II. Antibióticos usados en la determinación de la CMI. Solventes y diluyentes empleados en las soluciones stock de dichos antibióticos en la forma de polvo valorado.

=====

Antibiótico	Solvente	Diluyente
A. Nalidíxico	Na OH 0,1 M	Agua

Tabla II. (continuación)

Antibiótico	Solvente	Diluyente
Ampicilina	Tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0	Tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0
Carbenicilina	Agua	Agua
Cefaclor	Agua	Agua
Cefadroxil	Agua	Agua
Cefalotina	Tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0	Agua
Cefamandol	Agua	Agua
Cefoperazona	Agua	Agua
Cefotaxime	Agua	Agua
Cefoxitina	Agua	Agua
Cefsulodín	Agua	Agua
Cefuroxima	Agua	Agua
Clindamicina	Agua	Agua
Cloranfenicol	Etanol	Agua
Eritromicina	Metanol	Agua
Metronidazol	N-N-dimetil formamida	Agua

Tabla II. (continuación).

Antibiótico	Solvente	Diluyente
Moxalactam	Agua	Agua
Rifampicina	N-N-dimetil formamida	Agua
Tetraciclina	Agua	Agua

3. TAMPONES

3.1. *Tampón de electroforesis*

Preparado según Eckhardt (1978). 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 agua destilada, se añadieron 5 µg/ml de Bromuro de Etidio (Sigma) y se ajustó el pH a 8,2.

3.2. *Tampón sacarosa*

Preparado según Cornelis *et al.*, (1976). La composi

ción del mismo fué:

Tris ClH (Sigma)..... 50 mM

Sacarosa (Sigma)..... 10 %

Los componentes se diluyeron en agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

3.3. *Tampón fosfato 0,1 M, pH 6,0*

Se prepararon dos soluciones diferentes:

Solución A: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (Merck)...0,2 M

Solución B: PO_4HNa_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.

3.4. *Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,0*

Se preparó partiendo de las soluciones descritas en el apartado anterior, pero ahora se mezclaron 39 ml de la solución A con 61 ml de la solución B, completándose con agua destilada hasta 200 ml. La mezcla se esterilizó a 121 °C durante 20 minutos en autoclave.

3.5. Tampón fosfato 0,1 M, pH 8,0

Partiendo de las soluciones A y B descritas anteriormente, se mezclaron 5,3 ml de la primera con 94,7 ml de la segunda, completándose hasta 200 ml con agua destilada y esterilizando la mezcla en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

3.6. Tampón Tris-EDTA Na₂

Se preparó según Cornelis *et al.*, (1976). Su composición fué la siguiente:

Tris.....10,0 mM
EDTA Na₂..... 0,1 mM

Se completó con agua destilada y se ajustó el pH a 8,0.

3.7. Tampón ARNasa

Siguiendo el método descrito por Eckhardt (1978), la composición del mismo fué la siguiente:

Acetato sódico (Merck)....0,4 M
Na OH (Merck).....1,0 M

3.8. *Tampón Tris-Borato*

Fué preparado según Eckhardt (1978):

Tris base.....89,0 mM
 EDTA Na₂.....12,5 mM
 Acido bórico.....89,0 mM

Se añadió agua destilada y se ajustó el pH a 8,2.

3.9. *Tampón enzimas de restricción*

Todas las enzimas de restricción se incubaron en el tampón descrito por Grinsted *et al.*, (1977):

Tris.....0,9 M
 SO₄Mg (Merck).....0,1 M

La solución en agua destilada se llevó hasta un pH de 7,5 a 37 °C y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

4. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

4.1 *Medios de aislamiento y crecimiento*

Brucella Agar Sangre, cuya composición es la siguiente:

Bacto Brucella Agar deshidratado (Difco).....	43 g
Agar (Difco).....	4 g
Agua destilada.....	1000 ml

Brucella Agar Sangre kanamicina-vancomicina como medio selectivo para *Bacteroides*. Su composición es idéntica al anterior, solo que los antibióticos kanamicina y vancomicina se añadieron al mismo a una concentración final de 1000 y 5 µg/ml respectivamente, después de la esterilización del medio, a una temperatura de 50 °C.

Agar de Fenil etil, cuya composición es la siguiente:

Fenil etil Agar (Difco).....	42,5 g
Agua destilada.....	1000,0 ml

Una vez esterilizados en autoclave a 121 °C durante 20 minutos y dejados enfriar hasta 50 °C, todos los medios anteriormente descritos se suplementaron con vitamina K₁ (ICN Pharmaceuticals) a una concentración final de 5 µg/ml y 5% de sangre de carnero (BBL).

4.2. Medios de identificación (medios pre-reducidos)

El medio base utilizado fué el de Peptona-Extracto

de levadura (PY), cuya composición por cada 100 ml de agua destilada fué la siguiente:

Bio-Tripcase (Bio-Merieux).....	0,50 g
E. de levadura (Difco).....	1,00 g
Proteosa peptona (Difco).....	0,50 g
Solución de sales.....	4,00 ml
Resazurina (BDH Chemicals).....	0,40 ml
L-Cisteina (Difco).....	0,05 g
Agua destilada.....	100,00 ml

La solución de sales para anaerobios estaba compuesta de los siguientes productos, todos ellos de la casa Difco:

Cl_2Ca	0,2 g
$MgSO_4$	0,2 g
PO_4HK_2	1,0 g
PO_4H_2K	1,0 g
CO_3HNa	10,0 g
$ClNa$	2,0 g

Se mezclaron el Cl_2Ca y el SO_4Mg en 300 ml de agua destilada hasta que se disolvieron totalmente. Se añadieron 500 ml de agua destilada y poco a poco las demás sales, agitando para su disolución. Se completó hasta 1000 ml con agua destilada y se almacenó a 4 °C.

La composición en gramos por cada 100 ml de medio base, de cada uno de los sustratos utilizados para la identificación definitiva de las bacterias anaerobias objeto del presente estudio, fué la siguiente:

Sustrato	g/100 ml de PY	pH
Glucosa (Difco)	1,0	6,9
Manitol (Difco)	1,0	6,9
Ramnosa (Difco)	1,0	6,9
Trehalosa (Difco)	0,5	6,9
Bilis ^a (Difco)	2,0	6,9

a) Por cada 100 ml de medio base (PY), se añadieron 1 g de glucosa y 2 g de Oxgall (Difco).

4.2.1. Medio Indol-Nitrito

Se disolvieron 25 g de medio sintético Indol-Nitrito (BBL) en 100 ml de agua destilada y se añadieron 2 g de agar.

4.2.2. Cooked Meat Medium

Se añadieron 12,5 g de dicho medio sintético (BBL) a 100 ml de medio base (PY). Se esterilizó en autoclave

a 121 °C durante 20 minutos.

Todos estos medios descritos, se hirvieron con un dispositivo en chimenea para permitir la extracción del aire durante la ebullición, tratándose a continuación con gases libres de oxígeno (CO₂ y N₂).

Una vez que el medio estaba a una temperatura inferior a 50 °C, se suplementaba con hemina (Sigma) a una concentración final de 0,5 µg/ml y vitamina K₁ (5 µg/ml), repartiéndose en tubos de 10 ml y esterilizándose en autoclave a 121 °C durante 20 minutos, según el Anaerobe Laboratory Manual, Virginia Polytechnique Institute (1975).

4.3. Medios para la determinación de la sensibilidad a antibióticos

Se utilizaron dos medios distintos, Brucella Agar Sangre, cuya composición y preparación se detallaron anteriormente; y el medio Wilkins-Chalgren descrito por estos autores en 1976 y en cuya composición intervienen los siguientes elementos:

Tripticasa (BBL).....	10 g
Gelysate (BBL).....	10 g

Extracto de levadura.....	5 g
Glucosa.....	1 g
ClNa.....	5 g
L-Arginina (Sigma).....	1 g
Acido pirúvico (Sigma).....	1 g
Agar (Difco).....	15 g
Agua destilada.....	1000 ml

El pH conseguido era de 7,0 a 7,2. Se añadieron vitamina K₁ y hemina a una concentración final de 0,5 µg por ml y 5,0 µg por ml respectivamente. Se hirvió el medio durante 1 minuto para disolver el agar y se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 15 minutos, enfriándose en un baño de agua a 50-55 °C y añadiendo la solución de antibiótico deseada, repartándose a continuación en placas Petri.

4.4. Medios para la selección de transconjugantes

Se utilizó el medio Brucella Agar Sangre cuando los experimentos de transferencia de material genético se efectuaba entre bacterias anaerobias y Eosin Metilen Blue (EMB), cuando la bacteria receptora era *E. coli*.

El medio EMB estaba compuesto de:

Eosin Metilen Blue Medium (Difco)....	37,4 g
Agar.....	4,0 g
Agua destilada.....	1000,0 ml

Se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

4.5. Medios para la conservación de microorganismos

Todas las bacterias utilizadas se conservaron en leche descremada (Molico) al 10% en agua destilada.

METODOS

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS ANAEROBIAS

El aislamiento de cepas del género *Bacteroides* se realizó cultivando las muestras obtenidas en medios de Brucella Agar Sangre, Brucella Agar Sangre kanamicina-vancomicina y Agar de Fenil etil alcohol. Se empleó el medio líquido prerreducido denominado Cooked Meat para permitir el crecimiento y desarrollo adecuados de estas bacterias anaerobias.

La identificación presuntiva de las cepas estudiadas se realizó siguiendo los métodos descritos por Sutter *et al.*, (1975), mientras que para la identificación definitiva se siguieron los criterios establecidos por Holdeman y Moore (1975), empleando los medios prerreducidos para la realización de las pruebas bioquímicas, así como los análisis por Cromatografía Líquido Gaseosa (CLG) de los ácidos grasos producidos por las citadas bacterias, en medios de cultivo líquido suplementados

con glucosa u otro hidrato de carbono.

Los criterios seguidos para la identificación pre-suntiva de las bacterias aisladas, fueron los siguientes:

- Aerotolerancia
- Características morfológicas:
 - macroscópicas*
 - microscópicas*
- Sensibilidad a antibióticos
- Factores de crecimiento
- Serie limitada de pruebas bioquímicas

Para la identificación definitiva de dichas bacterias, se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

- Pruebas bioquímicas
- Cromatografía Líquido Gaseosa:
 - ácidos grasos volátiles*
 - ácidos grasos metilados*

2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

2.1 Método disco-placa

La sensibilidad a diversos antimicrobianos de las ce

pas bacterianas aisladas e identificadas como pertenecientes al género *Bacteroides*, se determinó por el método de Bauer-Kirby (1966), utilizando los discos impregnados en cada uno de los antibióticos citados en el apartado de Materiales y midiendo el halo de inhibición producido por los mismos, clasificando de esta forma a las bacterias como sensibles o resistentes.

2.2. *Determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias*

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se define como la concentración de antibiótico más baja que no permite crecimiento aparente de un inóculo de 18 horas en el que se depositaron un número aproximado de 10^5 bacterias/ml. Las unidades de este parámetro vienen expresadas en $\mu\text{g/ml}$.

Siguiendo el método de dilución en agar descrito por Washington II y Barry (1974) y utilizando un aparato replicador descrito por Steer *et al.*, (1959), se determinó la CMI a las 60 cepas aisladas pertenecientes al género *Bacteroides*, grupo B. *fragilis*, frente a los antibióticos descritos en el apartado correspondiente de Materiales, en dos medios de cultivo diferentes: Wilkins-Chalgren y

Brucella Agar Sangre.

De un cultivo de 18 horas en medio Brucella Agar Sangre incubado a 37 °C y en anaerobiosis, se resuspendieron de 3 a 4 colonias en caldo nutritivo y se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y ambiente anaerobio, hasta alcanzar 10^8 células/ml aproximadamente. Las placas de los medios descritos conteniendo las diluciones de los antibióticos a probar, se inocularon con 0,001 ml (aproximadamente 3×10^5 bacterias) mediante el replicador de Steer, comenzando por la placa que contenía la concentración de antibiótico menor. Las placas inoculadas se incubaron en una cámara de anaerobiosis COY, Laboratory Products Inc. (Ann Arbor, Michigan, USA) a 37 °C durante 24-48 horas y al cabo de ellas, se les determinó la CMI a las bacterias probadas.

Como controles de una buena inoculación y viabilidad de las cepas estudiadas, se utilizaron placas de medio sin antibiótico al principio y final de cada serie de antimicrobianos. Para el control de posibles errores en las diluciones de los antibióticos probados, se inocularon las cinco estirpes bacterianas descritas en el apartado de Materiales, cuya sensibilidad frente a algu

nos de ellos es conocida e invariable.

3. DETECCION DE LA PRODUCCION DEL ENZIMA BETA-LACTAMASA

Siguiendo el método descrito por O'Callaghan *et al.*, (1972), se utilizó la Cefalosporina Cromogénica o Nitrocefín (Compuesto 87/312) para la detección de las bacterias anaerobias productoras del enzima beta-lactamasa, compuesto que presenta un color amarillo pajizo cuando el anillo beta-lactámico permanece intacto y rojo cobrizo al destruirse este mediante la acción del enzima mencionado (Figura 1).

La solución de Nitrocefín a emplear estaba compuesta por 5 mg del producto cromogénico, disueltos en 0,5 ml de dimetil sulfóxido (Merck) y 9,5 ml de tampón fosfato 0,1 M a pH 7,0.

Si las bacterias crecían en medio sólido, se vertían unas gotas de la solución mencionada sobre las colonias formadas, incubándolas en oscuridad (ya que el Nitrocefín se descompone en presencia de la luz y eso daría lugar a la aparición de falsos positivos) durante 2 ó 3 horas a fin de poder detectar las bacterias que produjeran peque

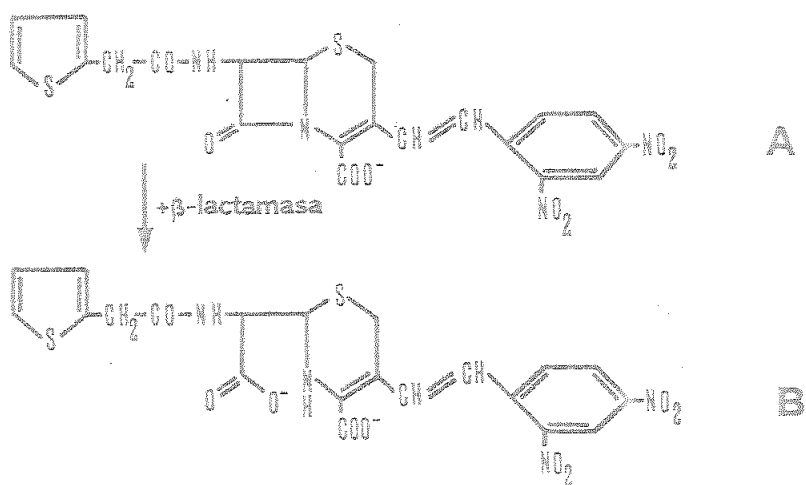


FIGURA 1. Estructura química de la Cefalosporina Cromogénica [Compuesto 87/312] en estado oxidado, de color amarillo pajizo (A) y reducido, de color rojo cobrizo (B).

ñas cantidades del enzima. Si por el contrario, las bacterias estaban creciendo en medio líquido, se añadían unas gotas de la solución de Cefalosporina Cromogénica y los cultivos se incubaban en oscuridad durante 30 minutos. Otra posibilidad consistía en agregar unas colonias del cultivo bacteriano a testar, a 1 ml de solución salina estéril, añadiendo unas gotas de la solución cromogénica y esperando 30 minutos para que se produjera el cambio de color de la mezcla, todo ello realizado en oscuridad. Atendiendo al cambio o no de color de la solución de Nitrocefin y dependiendo del tiempo empleado por los microorganismos para descomponerla, estos se clasificaron arbitrariamente en cuatro grupos:

<i>Superproductores</i>	+++++
<i>Medioproductores</i>	++++/+++
<i>Bajoproductores</i>	++/+
<i>No productores</i>	-

Se consideraron bacterias superproductoras del enzima beta-lactamasa, aquellas que producían un cambio de color de la solución en escasos minutos y este era de gran intensidad en comparación con el desarrollado en las mismas condiciones por las bacterias control. Los tres grupos restantes se organizaron atendiendo a estas caracte

terísticas anteriormente descritas.

Como controles para estimar la preparación adecuada de la solución cromogénica, se utilizaron las bacterias descritas en el apartado correspondiente de Materiales.

La clasificación de las bacterias en los cuatro grupos mencionados anteriormente, si bien está sometida a la variación propia de toda apreciación subjetiva, puede proporcionar una información estimable para los objetivos planteados con la misma.

4. PREPARACION DEL ENZIMA BETA-LACTAMASA Y ENFOQUE ISO ELECTRICO DEL MISMO

Siguiendo el método descrito por *Mattew et al.*, (1975), los microorganismos crecieron en 50 ml de PYG hasta fase exponencial y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las células se resuspendieron en agua hasta una concentración de 10^9 bacterias por mililitro. Por tratamiento con ultrasonido se liberaron los enzimas intracelulares (Ross y Boulton, 1973). Las muestras (50 μ l o más) se colocaron cerca del ánodo,

en la superficie de un gel de poliacrilamida de dimensiones 21,5 x 16,5 x 0,15 cm y compuesto por 70 mg de acrilamida (Sigma), 2 mg/ml de N,N'-metilenbisocrilamida (Sigma), N,N,N',N'-tetrametilendiamina (0,25 ug/ml) (Sigma), 0,002 mg/ml de riboflavina (Sigma) y 20 miligramos por mililitro de anfolina (Merck), pH 3,5 a 10. El electroenfoque se llevó a cabo a 100-400 V durante 40 horas y la detección del enzima se realizó colocando sobre el gel, papel Watman No. 54 empapado con una solución de Nitrocefín, fotografiando a continuación las placas de gel con filtro de luz verde.

5: METODO RAPIDO PARA LA DETECCION DE PLASMIDOS DE ADN

El método seguido fué el descrito por Eckhardt en 1978, basado en la propiedad física de los ADNs cromosómico y plasmídico de emigrar a distinta velocidad a través de un gel de agarosa sometido a un campo eléctrico. Para ello, se utilizó una cubeta de electroforesis del tipo 613 x 52, Vertical Slab Unit (Shandon Southern) de placas de gel cuyas dimensiones eran de 17,4 x 0,5 x 13,7 cm y cada una de ellas constaba de 12 pocillos para la colocación de muestras.

Partiendo de un cultivo bacteriano de 24 a 72 horas creciendo en medio sólido, se tomaron una o dos colonias (10^7 - 10^8 células) con la parte plana de un palillo y se resuspendieron en 50 μ l de una mezcla de lisozima (lisozima, 7500 U/ml; ribonucleasa A, Tipo III, 0,3 U/ml; 0,05% de azul de bromofenol y 20% de sacarosa, todo ello disuelto en tampón Tris-Borato a pH de 8,2) que se habían colocado previamente en los pocillos de la parte superior del gel, dejando incubar durante 2 a 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 100 μ l de una mezcla de sodio dodecil sulfato (0,2% de SDS y 10% de sacarosa disueltos en tampón de electroforesis) y se mezclaron cuidadosamente con el homogeneizado bacterias-lisozima, permaneciendo las dos capas perfectamente diferenciadas.

De una mezcla sobrecapa compuesta por 0,2% de SDS y 5% de sacarosa, disueltos en tampón de electroforesis, se añadieron 200 μ l, cubriendo posteriormente los pocillos con agarosa caliente (50 °C).

Una vez que los compartimentos superior e inferior de la cubeta de electroforesis se llenaron de tampón, se sometió la placa de gel a una corriente eléctrica de

50 mA y 150 V durante 2,30 horas.

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

Interesaba conocer el peso molecular de los plásmidos hallados en las especies de *Bacteroides* aisladas de muestras clínicas, mediante la aplicación de un método sencillo y se procedió a la elaboración de una recta de calibrado, utilizando para ello plásmidos de peso molecular conocido.

Aplicando el método de detección rápida descrito en el apartado anterior, se procedió a variar las concentraciones de agarosa y el tiempo de electroforesis, manteniendo fijas las condiciones de amperaje y voltaje (50 mA y 150 V respectivamente), para tratar de obtener una buena correlación entre plásmidos de alto y bajo peso molecular y poder calcular con poco margen de error, el peso de los plásmidos detectados en las bacterias anaerobias estudiadas. Para ello se utilizaron las cepas de *E. coli* portadoras de plásmidos que se describen en el apartado de Materiales.

Las concentraciones de agarosa utilizadas en estos experimentos, variaron desde 0,70% hasta 1,5%, con intervalos de diferencia del 0,05% en cada uno de ellos y manteniendo un tiempo de electroforesis de 2,30 y 3,30 horas para cada concentración de agarosa.

7. EXTRACCION DE PLASMIDOS POR ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE DENSIDAD

Siguiendo el método descrito por Cornelis *et al.*, (1976), se incubaron a 37 °C, 500 ml de medio líquido PY conteniendo la bacteria a estudiar. Cuando el cultivo había alcanzado una D.O. de 0,5 a 430 nm (aproximadamente 2×10^8 bacterias/ml), se recolectaron las células mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga Beckman J-21 B y el precipitado se resuspendió en 10 ml de tampón sacarosa, congelándolo a -20 °C para permitir una lisis adecuada de las células. Una vez descongeladas, se procedió a la lisis bacteriana por adición de 2 ml de lisozima (5 mg/ml en Tris 0,25 M), manteniéndolas durante 15 minutos en hielo (0 °C). Posteriormente, se añadieron 6 ml de EDTA Na₂ 0,2 M y pH 8,0, conservando la mezcla durante 5 minutos

a 0 °C y transcurridos los cuales se añadieron 10 ml de Tritón X-100 (2% v/v en Tris 0,05 M y EDTA Na₂ 0,05 M), centrifugando posteriormente a 12.000-18.000 rpm durante 1 hora a 4 °C. Se recogió el sobrenadante y se añadieron 3,5 ml de ClNa y 8 ml de polietilenglicol (50% v/v), dejando el preparado en frío durante 1 hora o toda la noche, al cabo de la(s) cual(es) se centrifugó a 18.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. El precipitado resultante se resuspendió en 6 ml de tampón Tris-EDTA Na₂ y se añadieron 3 volúmenes de cloroformo (Merck) para precipitar las proteínas que se encontraran en solución, centrifugando a 18.000 rpm durante 1 minuto a 4 °C y extrayendo la capa superior para tratar dos veces más con dicho producto, después de lo cual se añadieron 6 g de ClCs, mezclándolo y esperando a que desapareciera el olor a cloroformo. A continuación se agregaron 0,3 ml de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y se ajustó la densidad del ClCs hasta 34,5-35,5% en un refractómetro de azúcares (Bauch & Lomb), utilizando para ello una solución saturada de ClCs (1 g/ml al 35,5%) en tampón Tris-EDTA Na₂. La solución resultante se sometió a 42.000 rpm durante 40 horas a una temperatura de 4-15 °C en una centrifuga Beckman L5-65, utilizando para ello un rotor de la clase 50 Ti.

Bajo iluminación con luz ultravioleta, se extrajo la banda correspondiente al ADN plasmídico mediante aguja y jeringa y se trató aquella con iso-butanol (Merck) hasta que la solución quedó libre de color producido por las moléculas de Bromuro de Etidio. Se completó el volúmen hasta 5 ml con tampón Tris-EDTA Na₂ y se añadió acetato sódico (Merck) 4 M hasta una concentración final de 0,4 M. La solución resultante se llevó hasta un volúmen de 11 ml con etanol al 95% y se mantuvo a -20 °C durante 1 hora, centrifugandose a 12.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y disolviendo el precipitado resultante en 0,5 ml de tampón Tris-EDTA Na₂, conservándolo a -20 °C hasta su utilización.

Si el ADN obtenido por este procedimiento iba a ser sometido posteriormente a restricción por diferentes endonucleasas, el tampón utilizado para disolver el precipitado era Tris 10 mM.

8. EXPERIMENTOS DE TRANSFERENCIA GENETICA

Se utilizó la técnica descrita por Brefort *et al.*, (1977) modificada para nuestras condiciones, en la for-

ma que a continuación se describe.

Dos cultivos en 10 ml de PYG, uno de células donadoras y otro de células receptoras que habían alcanzado la fase exponencial (aproximadamente 2×10^8 bacterias por ml), se diluyeron en la proporción 1:20 en medio fresco PYG, mezclándose a continuación 0,5 ml de cada uno de los cultivos y filtrándose a través de una membrana Millipore de 0,45 μm de diámetro de poro. El filtro se incubó sobre una placa de Brucella Agar Sangre suplementada con vitamina K_1 y hemina durante 48 horas, al cabo de las cuales se resuspendió aquél en 10 ml de solución salina (0,9 g/ml de ClNa), haciendo diluciones y sembrando alícuotas de 0,1 ml en placas conteniendo el medio selectivo para los transconjugantes.

Si la bacteria receptora era *E. coli* K-12 E 711, la selección de los transconjugantes se realizaba en medio EMB suplementado con *Nal* (30 $\mu\text{g/ml}$) más *Am* (10 $\mu\text{g/ml}$) ó *C6* (30 $\mu\text{g/ml}$) y la incubación se efectuaba a 37 °C y en aerobiosis. Cuando se utilizaba *E. coli* H6r H como bacteria receptora, la selección se llevaba a cabo en las mismas condiciones que en el caso anterior, pero sustituyendo el *Nal* por *R6* (30 $\mu\text{g/ml}$). Si la célula recep

tora empleada era *B. fragilis* TM 4000, la selección de los transconjugantes se realizaba en medio Brucella Agar Sangre suplementado con vitamina K₁, Rif (30 µg/ml) y Tc (15 µg/ml), realizándose la incubación en anaerobiosis a 37 °C.

Como control del número de células donadoras viables, empleado posteriormente en la estimación de la frecuencia de transferencia de las resistencias a antibióticos estudiadas, se sembraron alícuotas de 0,1 ml del donador en medios selectivos para el mismo, antes de proceder a la mezcla con el cultivo de células receptoras. Así mismo, se efectuaron controles de la frecuencia de resistencia espontánea de las células receptoras para los antibióticos utilizados en la selección de las bacterias transconjugantes.

Utilizando filtrados libres de células donadoras, se hicieron pasar estos a través de una membrana Millipore de 0,45 µm de diámetro de poro, donde se habían depositado previamente 0,5 ml de un cultivo en fase exponencial tardía de la bacteria receptora empleada. Las condiciones de incubación y selección de posibles bacterias transformantes fueron idénticas a las utilizadas en los experimentos de conjugación.

De la misma forma, se tomaron filtrados libres de células donadoras y se sometieron a tratamiento con cloroformo (1 volúmen de filtrado/2 volúmenes de cloroformo) con objeto de eliminar los posibles factores transductores que hubiera en el medio, centrifugando y extrayendo la fase superior, la cual después de varios tratamientos análogos al anterior, se filtró a través de una membrana Millipore de 0,45 μ m de diámetro de poro por la cual se habían hecho pasar anteriormente 0,5 ml de la bacteria receptora correspondiente. La selección de posibles bacterias transductantes se realizó en condiciones idénticas a las descritas anteriormente.

9. DIGESTION DE PLASMIDOS DE ADN MEDIANTE ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Según la técnica descrita por Grinsted *et al.*, (1977), se mezclaron 50 μ l del ADN plasmídico correspondiente, purificado mediante centrifugación en gradiente de ClCs, 20 μ l del tampón de enzimas de restricción descrito en Materiales y 10 μ l de cada una de las endonucleasas de restricción o combinación de las mismas. La mezcla se incubó durante 16 horas a 37 °C y a ese tiem-

po se detuvo la reacción por adición de 10 μ l de sacarosa al 40%, 0,15 mg/ml de azul de bromofenol en EDTA Na₂ 0,1 M a pH 8,0 y analizándose dicha mezcla en gel de agarosa a distintas concentraciones, utilizando como marcadores de peso molecular y digestión apropiada de los plasmidos probados, ADN del fago Lambda tratado con cada una de las enzimas de restricción mencionadas en el apartado de Materiales.

10. TRATAMIENTO CON AGENTES CURANTES DE PLASMIDOS

Siguiendo los métodos descritos por Novick (1969), las bacterias portadoras de plásmidos se sometieron a tratamiento con agentes descritos anteriormente como *curantes* de factores extracromosómicos, tales como Bromuro de Etidio, SDS y temperaturas elevadas. Para ello, de un cultivo en crecimiento exponencial se inocularon de 10^3 a 10^4 células en 10 ml de PYG conteniendo Bromuro de Etidio a las concentraciones de 0, 5, 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200 y 300 μ g/ml, dejando incubarse durante 24 horas y midiendo a dicho tiempo la absorbancia de los cultivos a 630 nm, longitud de onda a la cual no absorbe el Bromuro de Etidio.

Una vez determinadas por este método las concentraciones mínimas del producto que no afectaron ostensiblemente el crecimiento de las células, se procedió a la elaboración de la curva de crecimiento de las bacterias probadas para determinar con exactitud la concentración idónea del agente curante, a utilizar en experimentos posteriores.

El tratamiento de los cultivos con SDS siguió una pauta idéntica a la expuesta para el BrEt, solo que ahora se midió la densidad óptica a 430 nm.

Los cultivos líquidos de células sometidas a tratamiento con las concentraciones elegidas de dichos agentes, se incubaron a 37 °C y se tomaron alícuotas de 0,1 ml que se sembraron en medio rico (Agar Sangre suplementado con vitamina K₁) a tiempos 12, 24, 36, 48 y 60 horas de incubación. Posteriormente, un número adecuado de estas colonias aisladas se sembraron en medios selectivos con antibióticos y se determinó la producción del enzima beta-lactamasa, así como la presencia o ausencia de plásmidos en ellas.

Para el tratamiento con temperaturas elevadas, se

inocularon de 10^3 a 10^4 células de un cultivo en fase exponencial, en 10 ml de PYG y se incubaron durante 12 horas a 44,5 °C, diluyendo el cultivo en proporción 1:20 en medio nuevo PYG e incubando durante 12 horas a la misma temperatura. A tiempos 12 y 24 horas, se tomaron muestras de los cultivos que se sembraron en medio Agar Sangre suplementado con vitamina K_1 y posteriormente se probaron en medios con y sin antibióticos, determinándose la producción de beta-lactamasa a un número adecuado de muestras y efectuando un test de presencia o ausencia de plásmidos en las bacterias tratadas.

11. TRATAMIENTO COMBINADO DE BrEt Y SDS CON TEMPERATURAS ELEVADAS

Todas las especies de *Bacteroides* estudiadas se incubaron durante 24 horas en medio líquido PYG suplementado con BrEt o SDS, a la concentración elegida en los experimentos anteriores y posteriormente se trasladaron los cultivos a 44,5 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se realizaron controles de resistencia a antibióticos, presencia o ausencia de plásmidos y producción de beta-lactamasa, utilizando para ello un número adecuado de colonias aisladas previamente en medio rico.

RESULTADOS

1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS

En la Figura 2 se muestra la distribución en especies de las bacterias anaerobias procedentes de muestras clínicas y aisladas en los medios adecuados que se describen en el apartado correspondiente de Métodos, en base a su capacidad para la fermentación de azúcares, producción de indol, reducción de nitratos, crecimiento en bilis y CLG de los ácidos grasos volátiles y metilados producidos por *B. fragilis*. Actualmente se ha considerado a este grupo de bacterias intestinales, integrado por cinco especies distintas: *B. distasonis*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. tethalotaomicon* y *B. vulgatus* (Tally y Gorbach, 1979). Como se puede apreciar en dicha Figura 2, el microorganismo aislado más frecuentemente fué *B. fragilis* (62%), siguiéndole en porcentaje *B. vulgatus* con un 14% de aislamientos, *B. distasonis* y *B. ovatus* con 10 y 9% respectivamente y por último *B. tethalotaomicon*,

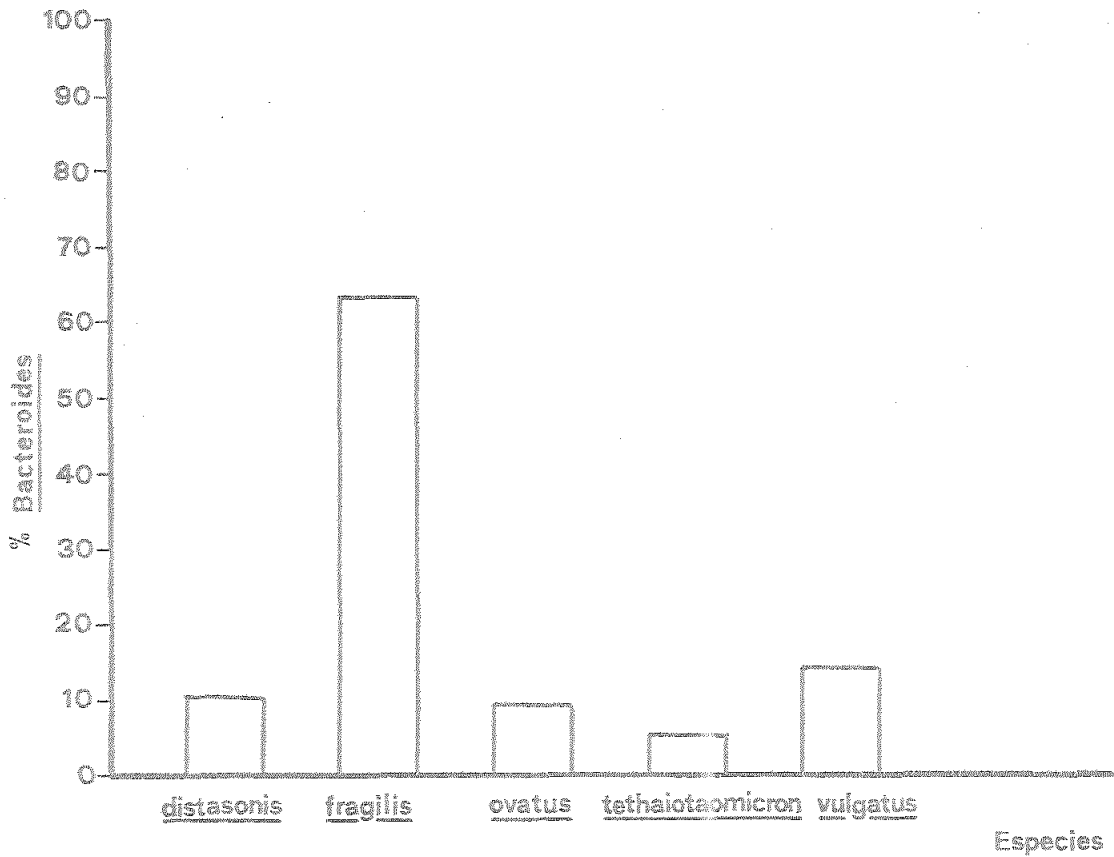


FIGURA 2. Distribución en especies de 60 Bacteroides pertenecientes al grupo fragilis, aislados de muestras clínicas.

con solo un 5%.

En las Figuras 3 y 4 aparecen representadas las cromatografías líquido-gas pertenecientes a muestras patrones de ácidos grasos volátiles y metilados, respectivamente. Las Figuras 5 y 6 muestran las cromatografías líquido-gas de los ácidos grasos volátiles y metilados característicos de este grupo de bacterias anaerobias; presencia de ácidos acético, propiónico y succínico y a veces ácidos fórmico, isobutírico, isovalérico y láctico.

2. DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Los resultados obtenidos en la determinación de la sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos de las bacterias anaerobias estudiadas, están representados en la Tabla III.

Frente a las especies de *Bacteroides* aisladas, clindamicina aparece como el antibiótico más activo, inhibiendo al 90% de las cepas estudiadas a una concentración de 0,25 µg/ml. Moxalactam muestra una actividad

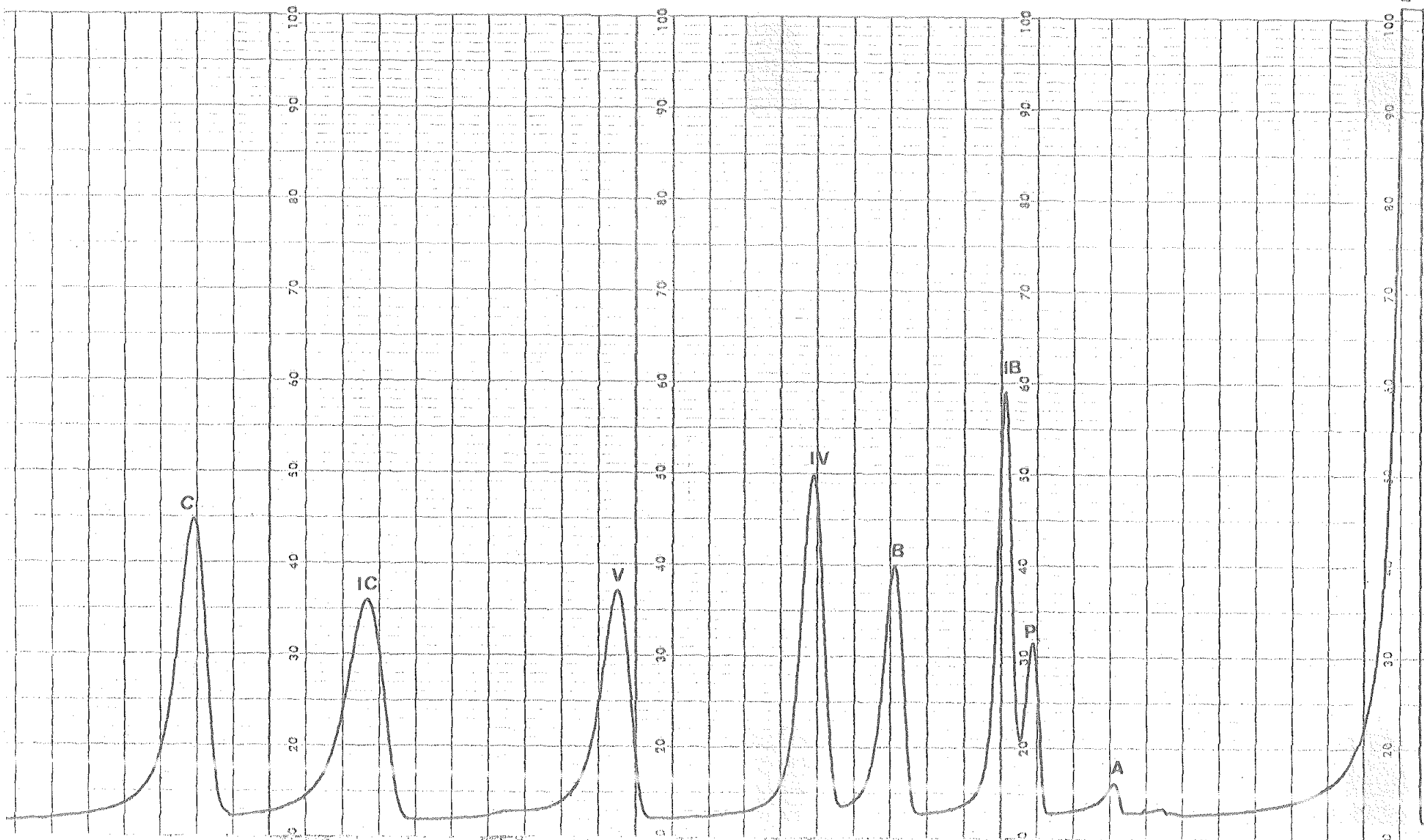


FIGURA 3. Cromatografía líquido-gas de los ácidos grasos volátiles presentes en una muestra patrón de los mismos. Ácidos acético (A), propiónico (P), isobutírico (IB), butírico (B), isovalérico (IV), valérico (V), isocaproico (IC) y caproico (C).

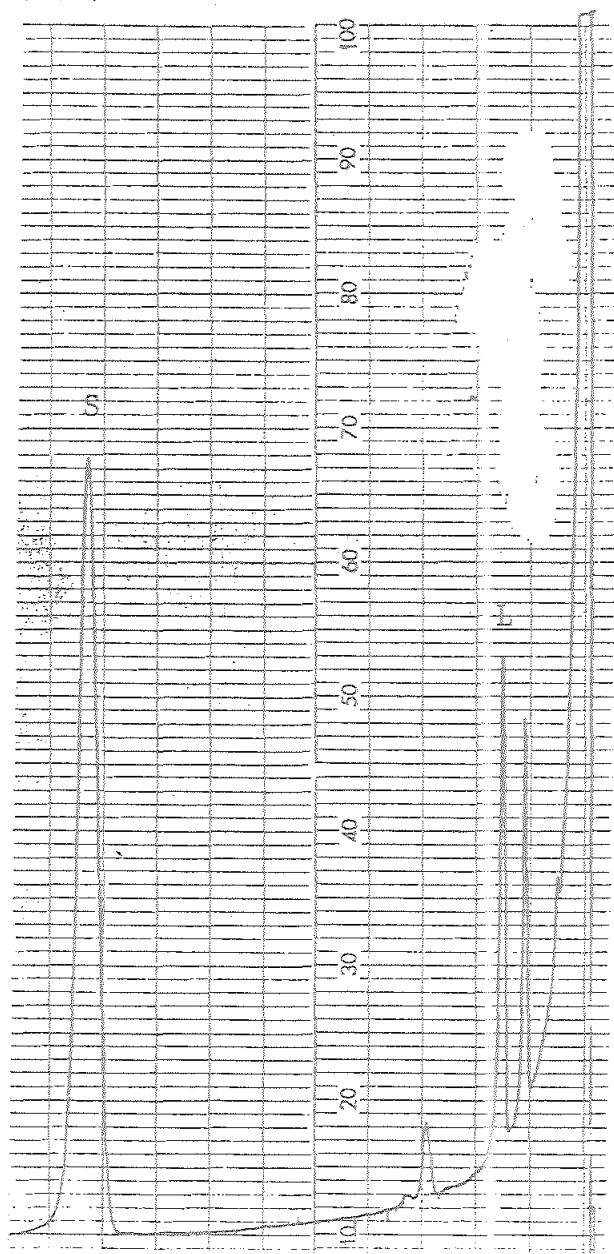


FIGURA 4. Cromatografía líquido-gas de los ácidos grasos metilados presentes en una muestra patrón de los mismos. Ácidos láctico (L) y succínico (S).

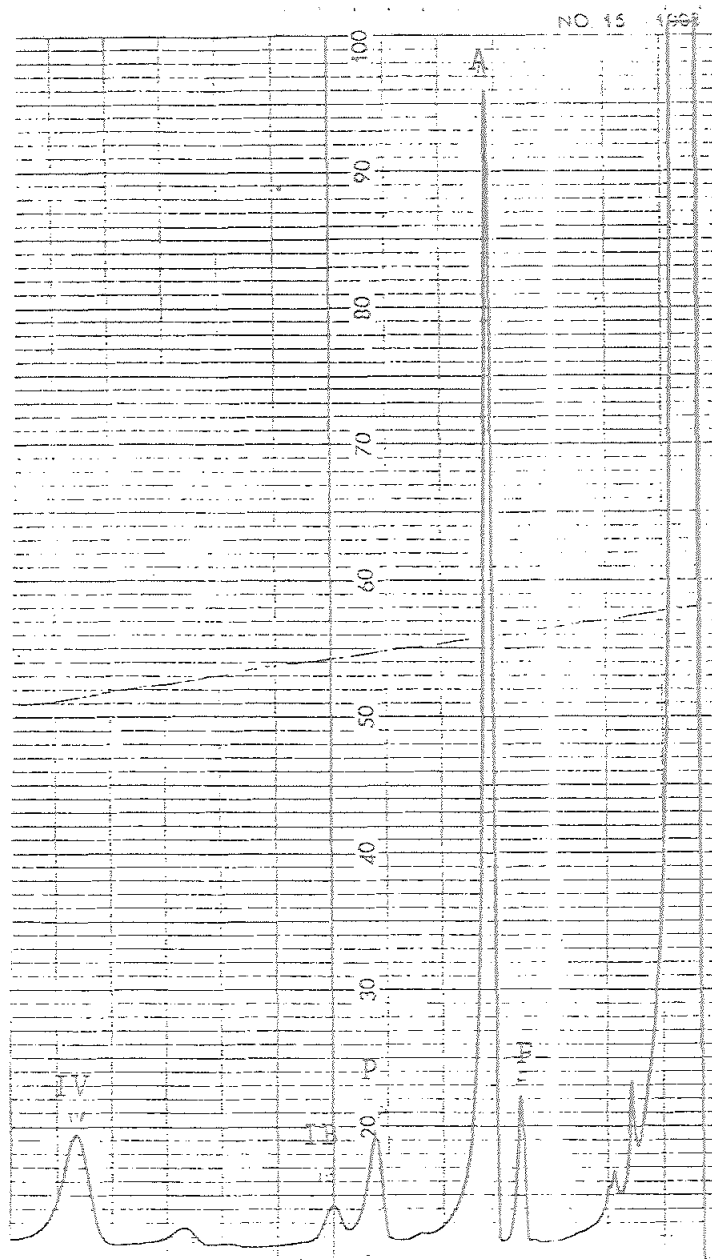


FIGURA 5. Cromatografía líquido-gas de los ácidos grasos producidos por *B. vulgaris* A 182 en medio PYG. Ácidos acético (A), fórmico (F), propiónico (P), isobutírico (IB) e isovalérico (IV).

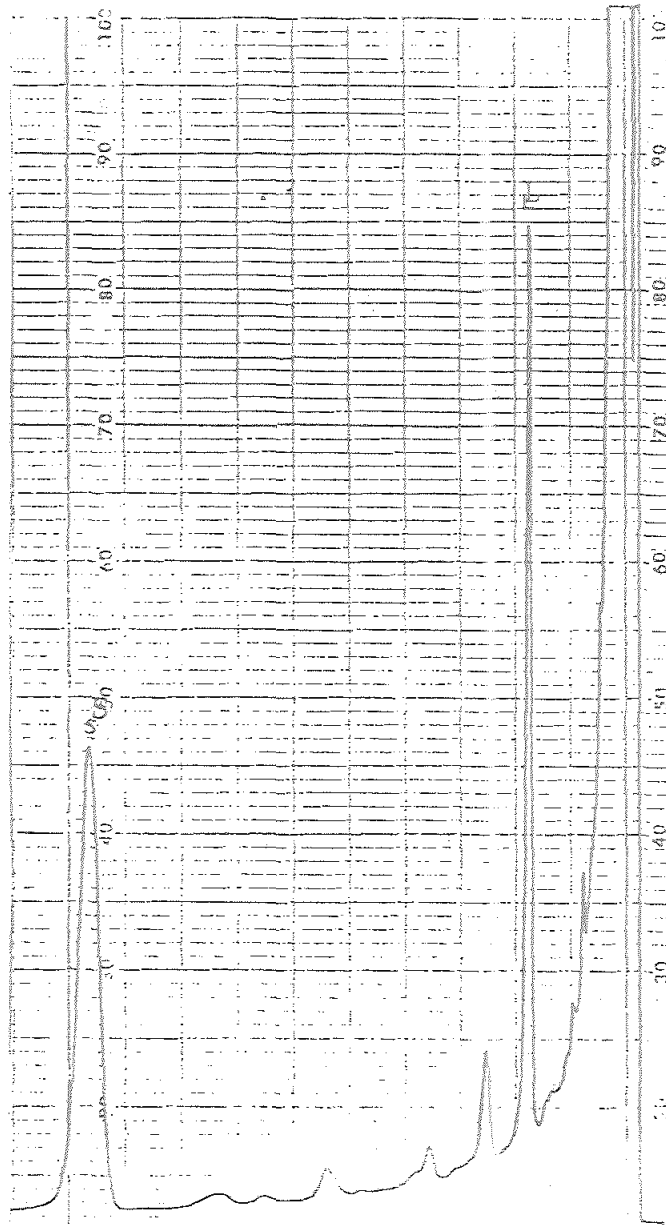


FIGURA 6. Cromatografía líquido-gas de los ácidos grasos metilados producidos por *B. vulgatus* A 182 en medio PYG. Ácidos succínico (S) y láctico (L).

Tabla III. CMIs a las cuales, el 50% (CMI 50) y 90% (CMI 90) de las especies de Bacteroides fueron inhibidas por los antimicrobianos probados, utilizando dos medios de cultivo diferentes.

	CMI 50		CMI 90	
	WC	BA	WC	BA
Carbenicilina	64	128	128	256
Cefaclor	64	64	128	256
Cefadroxil	64	32	128	64
Cefalotina	32	64	128	128
Cefamandol	16	16	32	32
Cefoperazona	32	32	128	128
Cefsulodin	4	4	32	32
Cefotaxime	8	8	32	32
Cefoxitina	2	4	8	8
Cefuroxima	4	2	16	16
Clindamicina	0,125	0,125	0,25	0,25
Cloranfenicol	128	128	128	128
Eritromicina	512	256	512	512
Metronidazol	4	16	8	64
Moxalactam	0,5	0,5	0,5	0,5
Tetraciclina	4	4	8	16

menor que el anterior, requiriendo 0,5 µg/ml para inhibir al 90% de las cepas.

De los restantes agentes estudiados, cefoxitina inhibió al 90% de las cepas a 8 µg/ml, mientras que cefuroxima y tetraciclina requirieron 8-16 µg/ml. Cefsulodin, cefotaxime y cefamandol inhibieron al 90% de las cepas estudiadas a la concentración de 32 µg/ml y metronidazol a 8-64 µg/ml, dependiendo del medio de cultivo utilizado para la realización del antibiograma cuantitativo. Los antibióticos que mostraron una actividad menor fueron carbenicilina, cefaclor, cefadroxil, cefalotina, cefoperazona, cloranfenicol y eritromicina, los cuales requirieron una concentración mayor de 128 µg/ml para inhibir al 90% de las especies de *Bacteroides* probadas.

Debido a la utilización en el presente estudio de 11 agentes antimicrobianos pertenecientes a la familia de los beta-lactámicos y a la resistencia mostrada por estas bacterias anaerobias frente a los mismos, se determinó la capacidad de producción del enzima beta-lactamasa en todas las cepas de *B. fragilis*, siguiendo la técnica descrita en el apartado correspondiente de

Métodos. Un 83% de las bacterias probadas eran productoras de dicho enzima capaz de inactivar a estos agentes antimicrobianos.

Estudiando comparativamente la sensibilidad a los beta-lactámicos de los *Bacteroides* productores y no productores del enzima, se obtuvieron los resultados que se muestran en las Tablas IV y V.

En términos generales, las diferencias de sensibilidad obtenidas en los medios WC y BA no fueron estadísticamente significativas, a pesar de que las CMIs en WC fueron en general más pequeñas que las obtenidas en BA.

3. DETECCION DE FACTORES EXTRACROMOSOMICOS EN ESPECIES DE *Bacteroides*. CALCULO DE SU PESO MOLECULAR

A la luz de los resultados obtenidos en los estudios de sensibilidad a diversos agentes antimicrobianos, producción del enzima beta-lactamasa por un elevado número de bacterias y las diferencias encontradas en la sensibilidad a los antibióticos beta-lactámicos

Tabla IV. Suceptibilidad in vitro de 50 especies de Bacteroides productoras de beta-lactamasa; frente a 11 agentes antimicrobianos pertenecientes a la familia de los beta-lactámicos, en dos medios de cultivo: BA y WC.

Antibiótico	Medio	Porcentaje acumulativo de CMI (µg/ml)													
		0,05	0,125	0,25	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512
Carbenicilina	BA				4			8			28	60	92		100
	WC				4			8	16	28	44	92	100		
Cefaclor	BA						4		12	24	60	68	84	92	100
	WC								8	36	56	88	100		
Cefadroxil	BA								48	76	92	96	100		
	WC						4	12	28	76	92	96	100		
Cefalotina	BA						4	12	24	68	84	100			
	WC					4	8	28	52	80	88	100			
Cefamandol	BA							28	48	76	88	100			
	WC						8	36	68	96	100				

Tabla IV. (continuación).

Antibiótico	Medio	Porcentaje acumulativo de CMI (µg/ml)													
		0,05	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Cefoperazona	BA								8	20	40	56	96	100	
	WC								8	16	32	80	96	100	
Cefsulodin	BA						12	68	76	84	92	96	100		
	WC				4	28	32	56	72	84	96	100			
Cefotaxime	BA						12	24	56	68	92		96	100	
	WC							8	28	56	68	92		96	100
Cefoxitina	BA							8	72	96		100			
	WC					16	52	68	100						
Cefuroxima	BA					40	56	60	80	88	100				
	WC						4	56	92		96	100			
Moxalactam	BA			4	84	92			96		100				
	WC	4	16	44	92				96		100				

Tabla V. Suceptibilidad in vitro de 10 especies de Bacteroides no productoras de beta-lactamasa, frente a 11 agentes antimicrobianos pertenecientes a la familia de los beta-lactámicos, en dos medios de cultivo: BA y WC.

Antibiótico	Medio	Porcentaje acumulativo de CMI ($\mu\text{g/ml}$)													
		0,05	0,125	0,25	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512
Carbenicilina	BA										40	60	100		
	WC								20		60	100			
Gefaclor	BA										88		100		
	WC									60	88	100			
Cefadroxil	BA								20	100					
	WC									40	80	100			
Cefalotina	BA								20	100					
	WC								20	60	100				
Cefamandol	BA								20	60	80	100			
	WC								20	60	80	100			

entre productores y no productores del enzima, se procedió a la búsqueda de factores extracromosómicos presentes en estas bacterias anaerobias, a fin de estudiar sus posibles implicaciones en los procesos anteriormente citados.

Previamente se establecieron las condiciones óptimas de tiempo, concentración de agarosa e intensidad y voltaje de electroforesis, utilizando para ello las bacterias portadoras de plásmidos enumeradas en el apartado de Materiales.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7. Como se puede apreciar, existe una buena correlación entre el peso molecular mostrado por los plásmidos y su migración en el gel, cuando la electroforesis se efectuaba durante 2,30 horas a 150 V y 50 mA, al 0,8% en agarosa. En las Figuras 8 y 9 se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizaron dos de las concentraciones de agarosa descritas: 0,7 y 1,0% respectivamente. En ambos casos, no se apreció una correlación lineal entre los plásmidos de alto y bajo peso molecular. La Figura 10 muestra el comportamiento en gel de agarosa, de plásmidos de diferente peso molecular, cuan

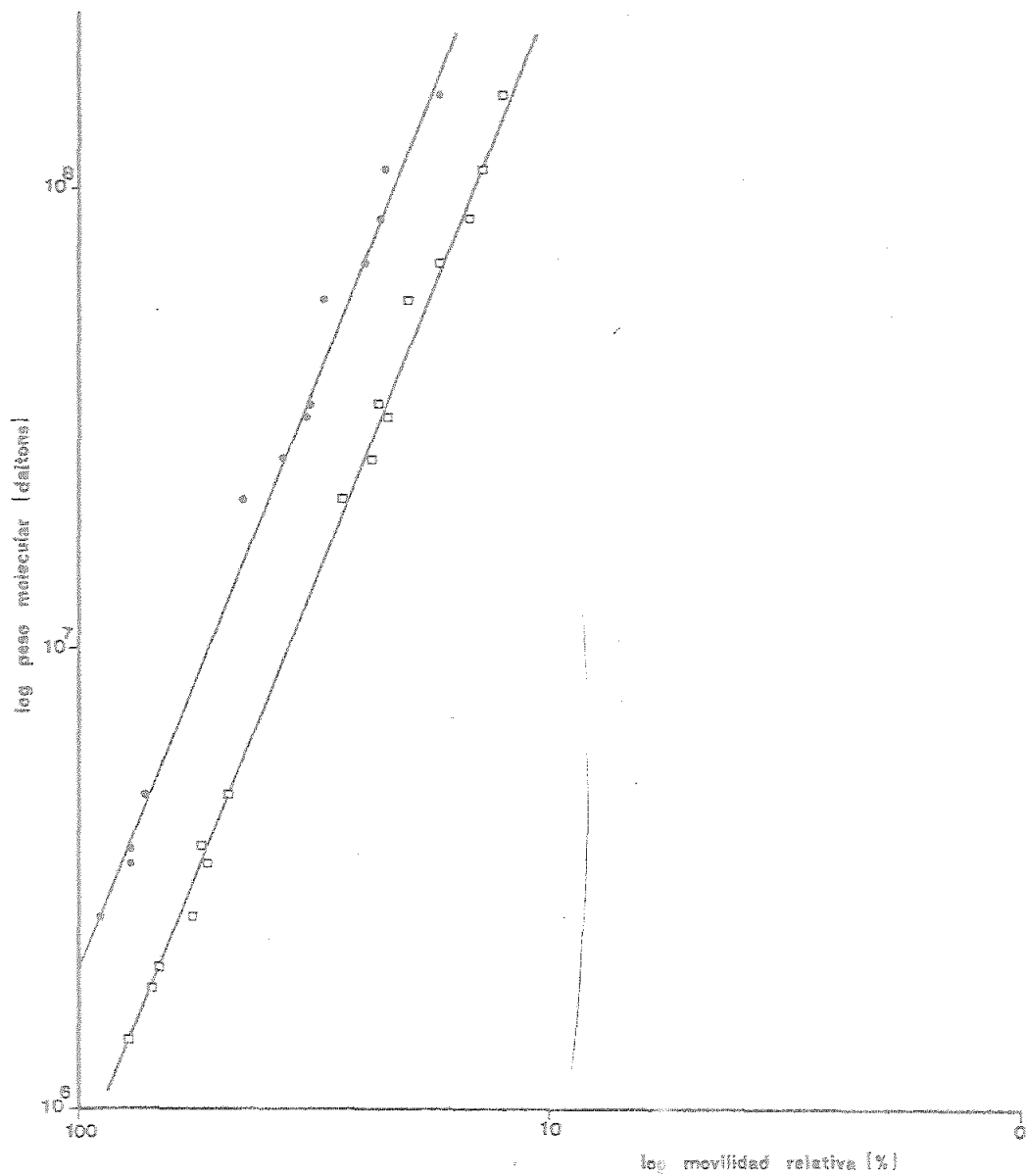


FIGURA 7. Representación gráfica de la movilidad relativa en gel de agarosa al 0,8%, de diversos plásmidos de peso molecular conocido, sometidos a electroforesis durante 2,30 horas (□) y 3,30 horas (•) a 150 V y 50 mA.

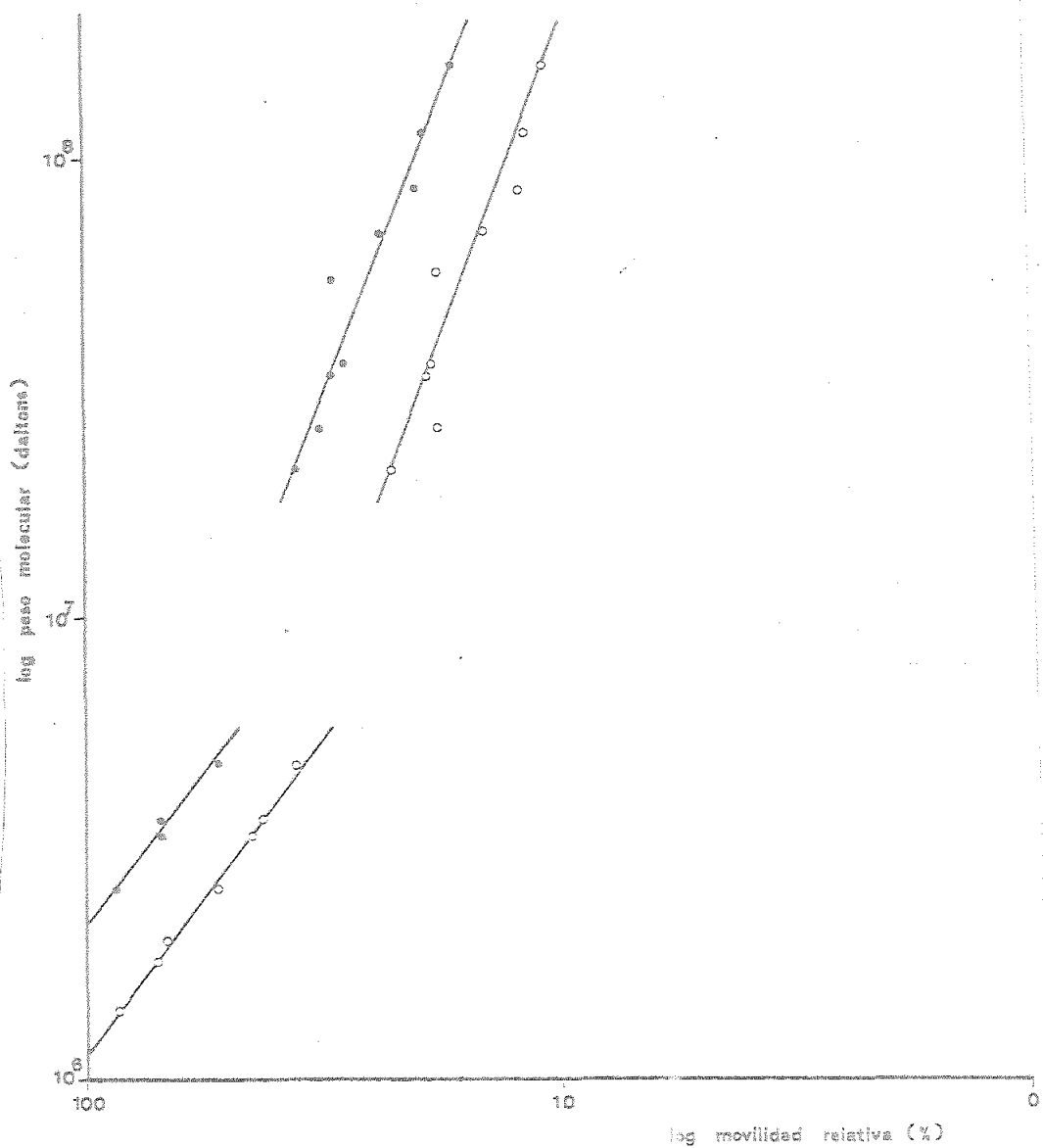


FIGURA 8. Representación gráfica de la movilidad relativa en gel de agarosa al 0,7%, de diversos plásmidos de peso molecular conocido, sometidos a electroforesis durante 2,30 horas (○) y 3,30 horas (●) a 150 V y 50 mA.

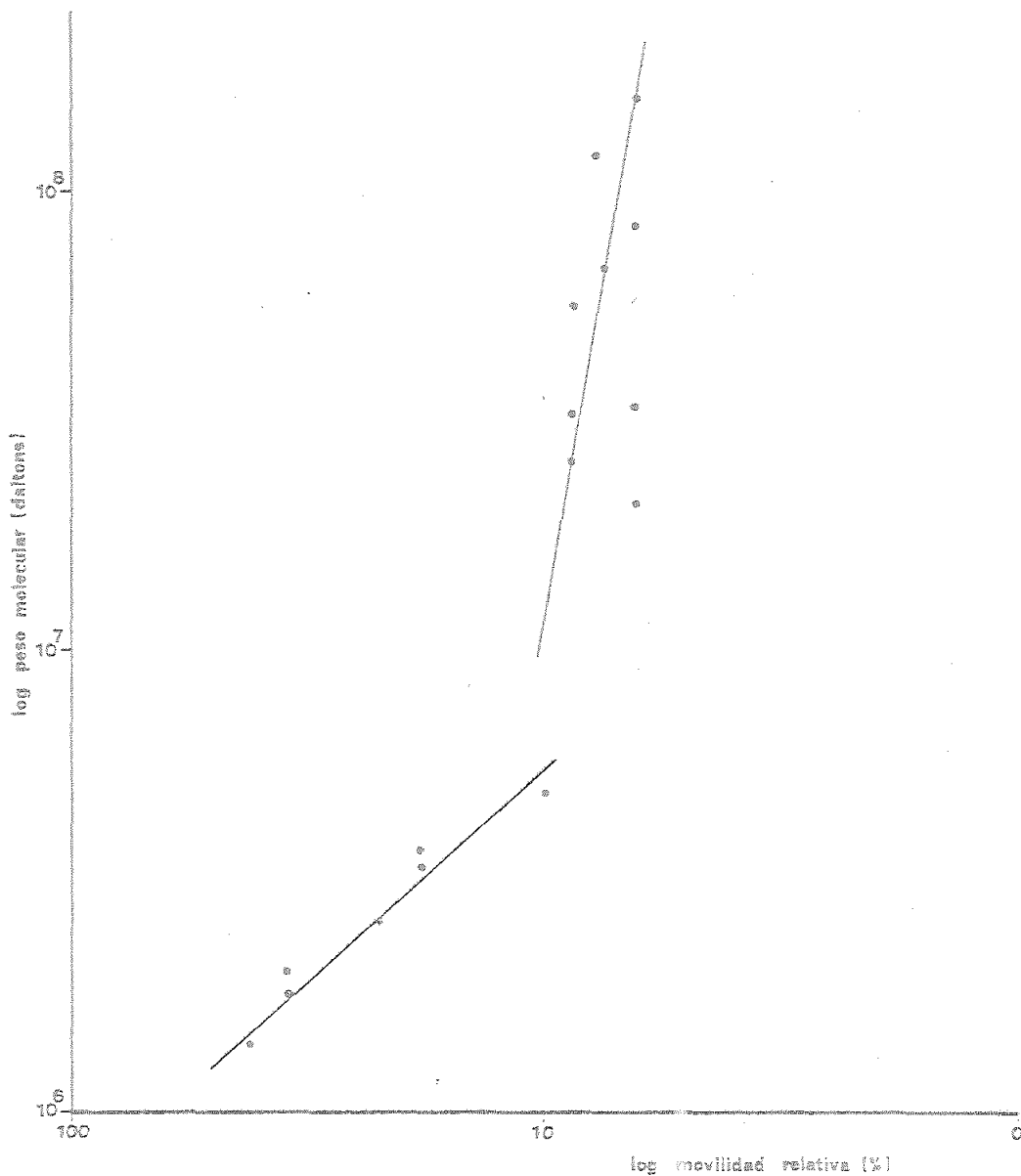
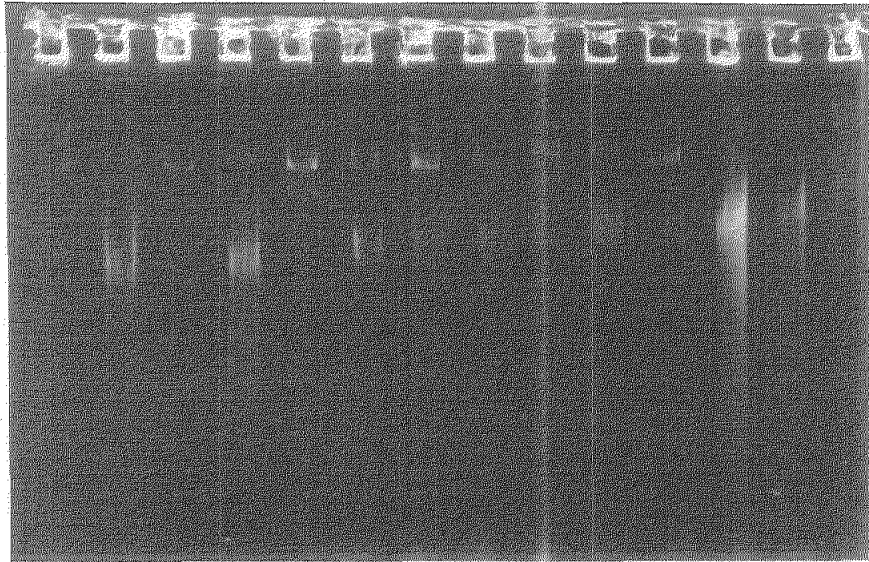


FIGURA 9. Representación gráfica de la movilidad relativa en gel de agarosa al 1,0%, de diversos plásmidos de peso molecular conocido, sometidos a electroforesis durante 2,30 horas a 150 V y 50 mA.

FIGURA 10. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 2,30 horas a 150 V y 50 mA, de estirpes de *E. coli* portadoras de plásmidos, efectuada a partir de colonias aisladas. Línea 1: cruce *E. coli* J53 R27 x *E. coli* J62 R1-14; línea 2: *E. coli* J53 R27 (plásmido R27; PM: 112 Md); línea 3: cruce *E. coli* J53 R1/1 x *E. coli* J62 R1-14; línea 4: *E. coli* J53 R1/1 (plásmido R1/1; PM: 67 Md); línea 5: cruce *E. coli* J62 R1-16 x *E. coli* J62 R1-14; línea 6: *E. coli* J62 R1-14 (plásmido R1-14; PM: 59 Md); línea 7: cruce *E. coli* J53 R27 x *E. coli* J62 R1-16; línea 8: *E. coli* J62 R1-16 (plásmido R1-16; PM: 25 Md). Líneas 9 -14: iguales a las anteriores.

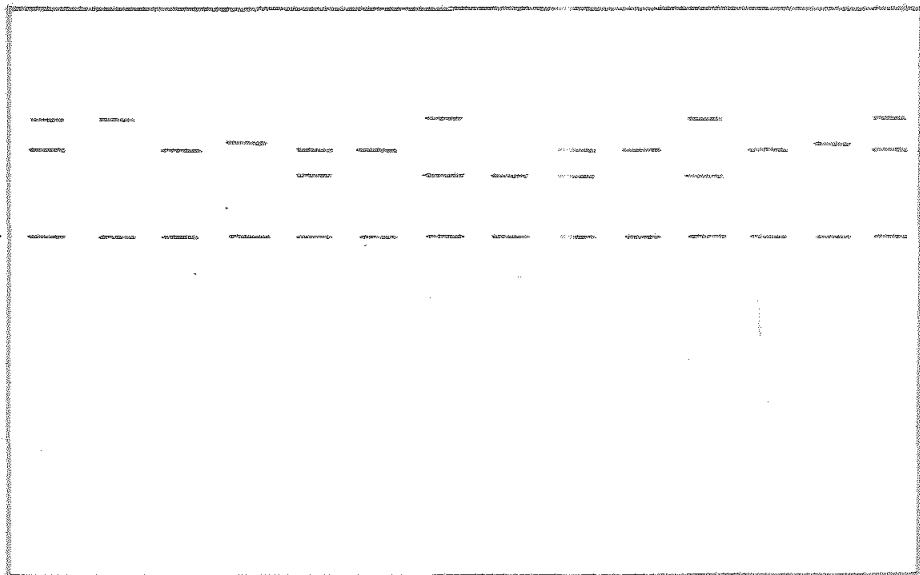
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

peso molecular (md)

112
67
59
25
Cr



do se utilizó el método de electroforesis a partir de una colonia aislada descrito anteriormente.

Una vez fijadas las condiciones en que se debería llevar a cabo la electroforesis, se procedió a la detección de los plásmidos presentes en las 60 cepas de *B. fragilis* aisladas, cuyos resultados se muestran en la Tabla VI. En las Figuras 11 y 12 se muestran las electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, de los plásmidos portados por las cepas de *B. fragilis* más representativas del presente estudio. Los pesos moleculares de los mismos se determinaron por extrapolación en la recta de calibrado efectuada en cada experimento, como se describió en el apartado de Métodos y fueron confirmados posteriormente, mediante electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos purificados en gradiente de ClCs.

4. TRANSFERENCIA POR CONJUGACION DE LOS FACTORES EXTRACROMOSOMICOS PRESENTES EN *Bacteroides*

La conjugación de las cepas de *B. fragilis* portadoras de plásmidos, con *E. coli* K-12 E 711 y *B. fragilis* TM 4000, ambas de probada capacidad receptora, se

Tabla VI. Relación de estirpes de *Bacteroides fragilis* portadoras de plásmidos, pesos moleculares de los mismos, resistencia a antimicrobianos de las cepas y producción del enzima beta-lactamasa.

Estirpe	Patrón de resistencia	Producción de enzima	Plásmidos (Mdal)	Denominación
<i>B. vulgatus</i> A 182	CL, MTZ, CTX, AM, CF, EM	+ +	20 y 4	pSEa 1 y pSEa 2
<i>B. fragilis</i> A 107	"	"	"	"
<i>B. fragilis</i> A 140	CL, CAR, CTX, AM, CF, TC, EM	+	17 y 3,7	pSEa 3 y pSEa 4
<i>B. fragilis</i> A 108	"	+ + + +	"	"
<i>B. fragilis</i> A 138	CTX, AM, CF	+	20	pSEa 5
<i>B. vulgatus</i> A 159	"	-	4	pSEa 6
<i>B. fragilis</i> A 167	"	+ +	"	pSEa 7
<i>B. fragilis</i> A 169	"	-	"	pSEa 8
<i>B. fragilis</i> A 176	"	+	"	pSEa 9

CL: Clindamicina; MTZ: Metronidazol; AM: Ampicilina; CF: Cefalotina; EM: Eritromicina; CAR: Carbenicilina; CTX: Cefotaxime; TC: Tetraciclina.

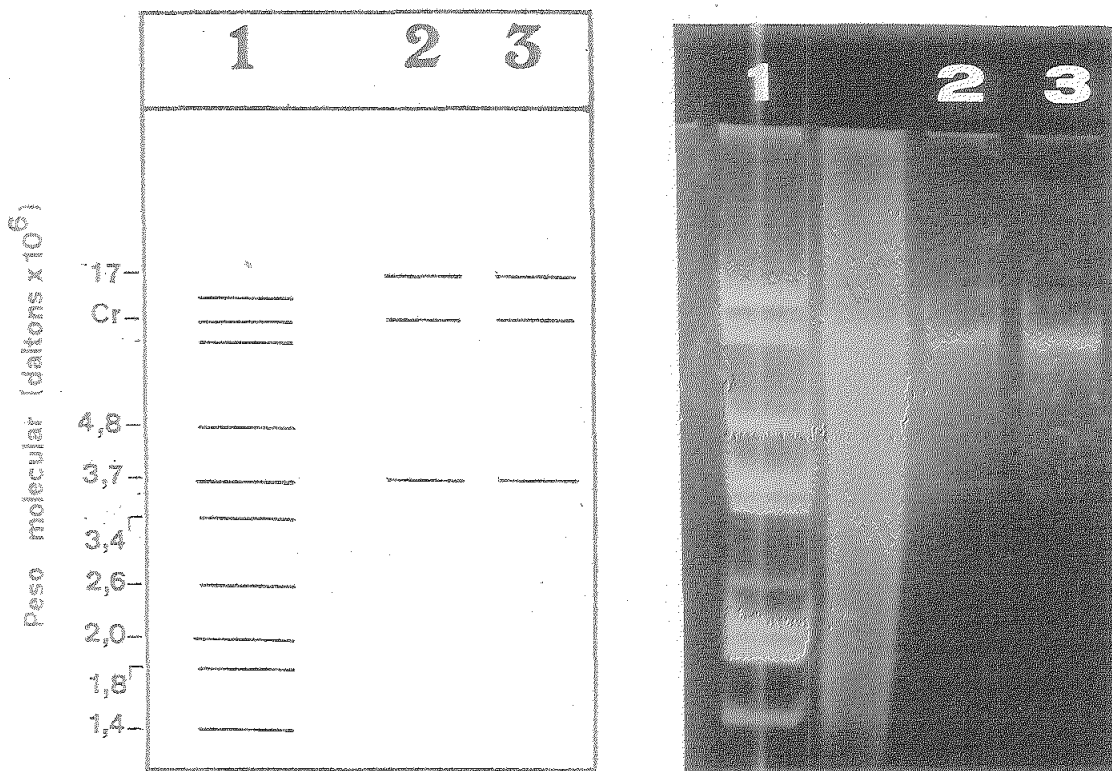


FIGURA 11. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 2,30 horas a 150 V y 50 mA, de las cepas de *B. fragilis* estudiadas y que eran portadoras de plásmidos.. Línea 1: plásmidos portados por *E. coli* V 517 obtenidos mediante centrifugación en gradiente de ClCs, utilizados como referencia para la estimación del peso molecular de otros plásmidos. Línea 2: plásmidos presentes en *B. fragilis* A 140 obtenidos a partir de una colonia aislada. Línea 3: plásmidos portados por *B. fragilis* A 108 obtenidos a partir de una colonia aislada. Cr: banda correspondiente al ADN cromosómico.

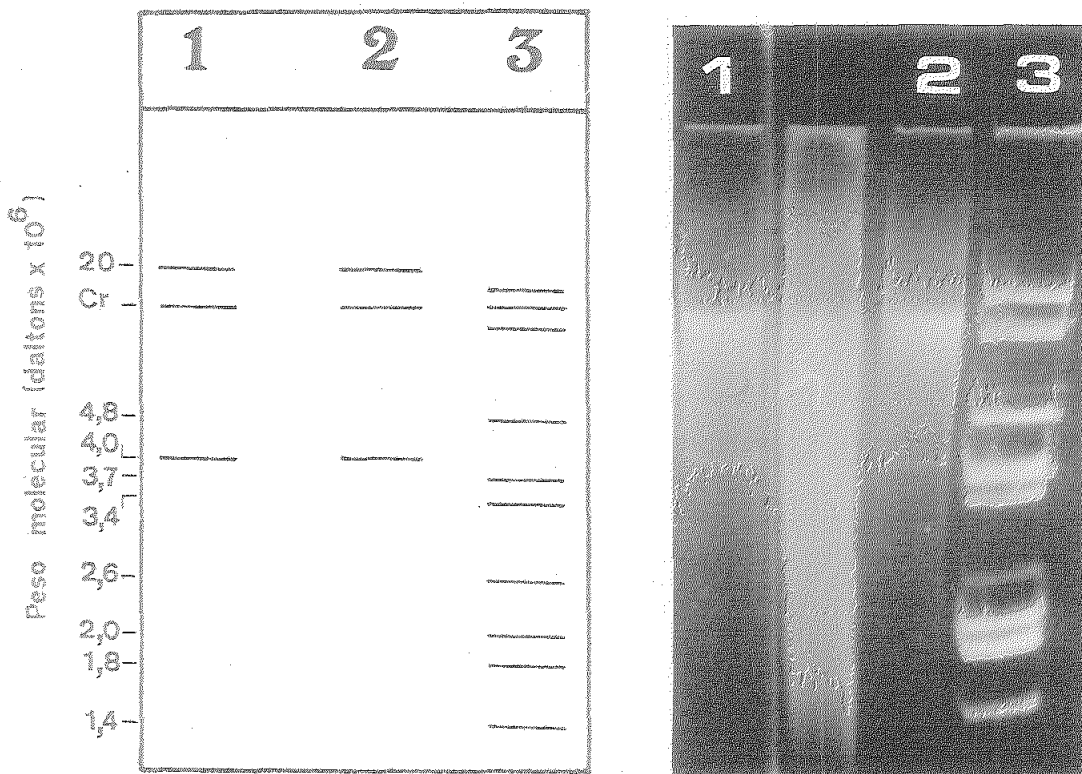


FIGURA 12. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 2,30 horas a 150 V y 50 mA, de las cepas de *B. fragilis* estudiadas y que eran portadoras de plásmidos. Línea 1: plásmidos presentes en *B. vulgatus* A 182 obtenidos a partir de una colonia aislada de dicha bacteria. Línea 2: plásmidos presentes en *B. fragilis* A 107 obtenidos a partir de una colonia aislada de dicha bacteria. Línea 3: plásmidos portados por *E. coli* V 517 obtenidos mediante centrifugación en gradiente de CLCs, utilizados como referencia para la estimación del peso molecular de otros plásmidos. Cr: banda correspondiente al ADN cromosómico.

realizó con objeto de poner de manifiesto la posible existencia de resistencias transferibles por conjugación.

De las 9 bacterias anaerobias que presentaban dichos factores extracromosómicos (Tabla VI), tan solo 4 de ellas fueron capaces de transferir dichas resistencias a antibióticos a la vez que los hacían los plásmidos portados por las mismas. En las Tablas VII y VIII, se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizaron *B. vulgatus* A 182 y *B. fragilis* A 107 como donadores y *E. coli* K-12 E 711 como cepa receptora. Así mismo, estan reflejados los experimentos que se realizaron utilizando como donadores, filtrados libres de células de *B. vulgatus* A 182 y *B. fragilis* A 107 tratados y no tratados con cloroformo.

Los experimentos que se llevaron a cabo utilizando *B. fragilis* A 140 y *B. fragilis* A 108 como bacterias donadoras y *B. fragilis* TM 4000 como bacteria receptora, aparecen resumidos en las Tablas IX y X respectivamente. También se muestran en dichas Tablas, los resultados obtenidos cuando se utilizaron filtrados libres de células tratados y sin tratar con cloroformo, de *B. fragilis* A 140 y *B. fragilis* A 108 como donadores y *B. fragilis* TM 4000 como bacteria receptora.

Tabla VII. Transferencia de la resistencia a antibióticos desde *B. vulgatus* A 182 a *E. coli* K-12 E 711^a

Donador	Receptor	Marcadores seleccionados	Frecuencia de conjugación ^b	Marcadores transferidos ^b	Plásmidos transferidos ^b
<i>B. vulgatus</i> A 182	<i>E. coli</i> K-12 E 711	AM o CF, crecimiento en O ₂	2,7 x 10 ⁻⁷	AM,CF,CTX	pSEa 1,pSEa 2
Filtrados libres de células de <i>B. vulgatus</i> A 182	"	"	<10 ⁻⁸	- - -	- - -
Filtrados libres de células de <i>B. vulgatus</i> A 182 tratados con clo ₂ roformo	"	"	<10 ⁻⁸	- - -	- - -

a) *E. coli* K-12 E 711 era resistente a CL, MTZ, EM y NAL.

b) Determinación media de tres experimentos.

AM: Ampicilina; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxime; CL: Clinadamicina; MTZ: Metronidazol; EM: Eritromicina; NAL: Acido nalidixico.

Tabla VIII. Transferencia de la resistencia a antibióticos desde *B. fragilis* A 107 a *E. coli* K-12 E 711^a.

Donador	Receptor	Marcadores seleccionados	Frecuencia de conjugación ^b	Marcadores transferidos ^b	Plásmidos transferidos ^b
<i>B. fragilis</i> A 107	<i>E. coli</i> K-12 E 711	AM o CF, crecimiento en O ₂	2 x 10 ⁻⁷	AM, CF, CTX	pSEa1, pSEa2
Filtrados libres de células de <i>B. fragilis</i> A 107	"	"	< 10 ⁻⁸	- - -	- - -
Filtrados libres de células de <i>B. fragilis</i> A 107 tratados con cloroformo	"	"	< 10 ⁻⁸	- - -	- - -

a) *E. coli* K-12 E 711 era resistente a CL, MTZ, EM y NAL.

b) Determinación media de tres experimentos.

AM: Ampicilina; CF: Cefalotina; CTX: Cefotaxime; CL: Clindamicina; MTZ: Metronidazol; EM: Eritromicina; NAL: Acido nalidixico.

Tabla IX. Transferencia de la resistencia a antibióticos desde *B. fragilis* A 140 a *B. fragilis* TM 4000^a.

Donador	Receptor	Marcadores seleccionados	Frecuencia de conjugación ^b	Marcadores transferidos ^b	Plásmidos transferidos ^b
<i>B. fragilis</i> A 140	<i>B. fragilis</i> TM 4000	TC	$1,9 \times 10^{-6}$	TC	pSEa3, pSEa4
Filtrados libres de células de <i>B. fragilis</i> A 140	"	"	$< 10^{-8}$	-	- - -
Filtrados libres de células de <i>B. fragilis</i> A 140 tratados con clo-roformo	"	"	$< 10^{-8}$	-	- - -

a) *B. fragilis* TM 4000 era resistente a CL, CAR, CTX, AM, CF y RIF.

b) Determinación media de tres experimentos.

TC: Tetraciclina; CL: Clindamicina; CAR: Carbenicilina; CTX: Cefotaxime; AM: Ampicilina; CF: Cefalotina; RIF: Rifampicina.

Tabla X. Transferencia de la resistencia a antibióticos desde *B. fragilis* A 108 a *B. fragilis* TM 4000^a.

Donador	Receptor	Marcadores seleccionados	Frecuencia de conjugación ^b	Marcadores transferidos ^b	Plásmidos transferidos ^b
<i>B. fragilis</i> A 108	<i>B. fragilis</i> TM 4000	TC	$2,2 \times 10^{-6}$	TC	pSEa3, pSEa4
Filtrados libres de células de <i>B. fragilis</i> A 108	"	"	$< 10^{-8}$	-	- - -
Filtrados libres de células de <i>B. fragilis</i> A 108 tratados con clo ₂ roformo	"	"	$< 10^{-8}$	-	- - -

a) *B. fragilis* TM 4000 era resistente a CL, CAR, CTX, AM, CF y RIF.

b) Determinación media de tres experimentos.

TC: Tetraciclina; CL: Clindamicina; CAR: Carbenicilina; CTX: Cefotaxime; AM: Ampicilina; CF: Cefalotina; RIF: Rifampicina.

En la Figura 13 se muestra la electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos portados por algunos de los transconjugantes aislados.

No se obtuvieron transconjugantes cuando se efectuaron experimentos de transferencia entre *B. fragilis* A 140 y *B. fragilis* A 108 utilizados como bacterias donadoras y *E. coli* K-12 E 711 como bacteria receptora, a pesar de que la selección de los mismos se efectuó con Tc y Am o Cf.

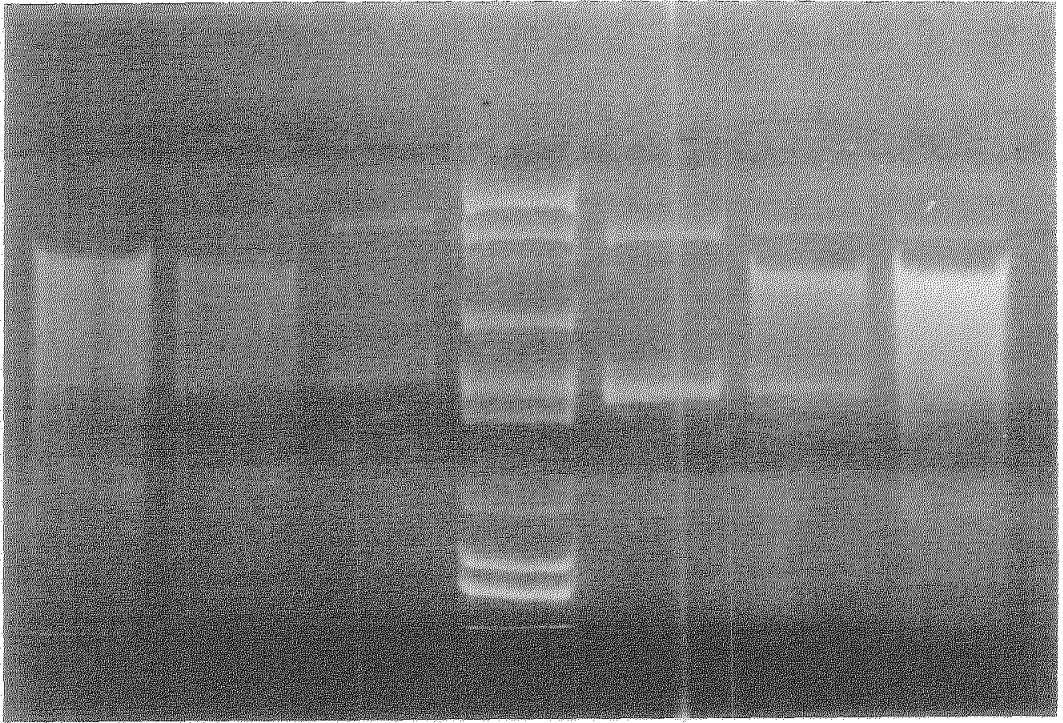
Puesto que *B. fragilis* TM 4000 es una estirpe resistente a un gran número de beta-lactámicos y productora del enzima beta-lactamasa, no fué posible la selección de transconjugantes resistentes a estos antimicrobianos cuando se utilizaron como cepas donadoras de estas resistencias, las cuatro especies de *Bacteroides* portadoras de plásmidos mencionadas previamente.

Los intentos de transferir las resistencias a estos antibióticos desde las cuatro especies de *Bacteroides* descritas a otras bacterias del mismo género, sensibles a los antibióticos mencionados y no productoras del enzima beta-lactamasa, no tuvieron éxito. La signi

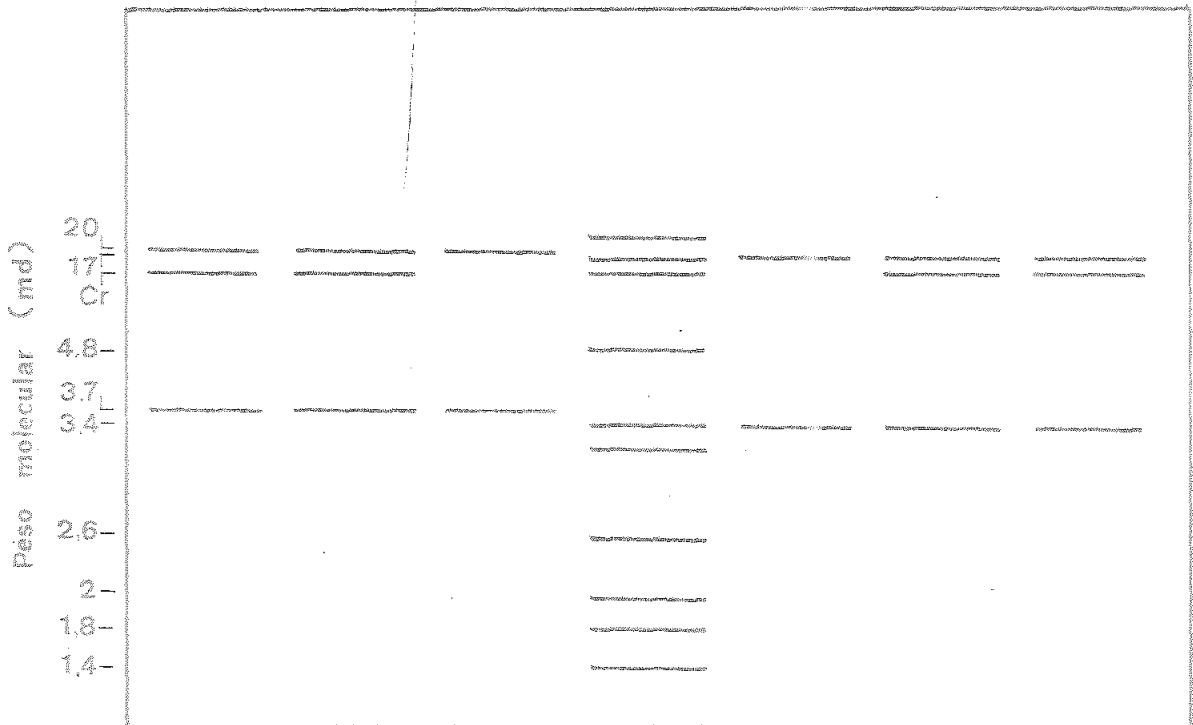
FIGURA 13. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% durante 2,30 horas a 150 V y 50 mA efectuada con ADN purificado mediante centrifugación en gradiente de CLCs.

(A): plásmidos portados por un transconjugante *B. vulgatus* A 182 x *E. coli* K-12 E 711. (B): igual que (A).

(C): plásmidos portados por *B. vulgatus* A 182. (D): plásmidos portados por *E. coli* V 517. (E): plásmidos portados por *B. fragilis* A 140. (F): plásmidos portados por un transconjugante *B. fragilis* A 140 x *B. fragilis* TM 4000. (G): igual que (F).



A B C D E F G



ficación de estos hallazgos será discutida con posterioridad.

Para comprobar la autotransferibilidad de los plásmidos estudiados, se realizaron experimentos de conjugación con las estirpes que habían recibido dichos factores extracromosómicos, utilizadas ahora como bacterias donadoras y *E. coli* Hfr H como bacteria receptora, obteniéndose idénticos resultados que los expuestos para los transconjugantes descritos anteriormente.

5. TRATAMIENTOS CON AGENTES CURANTES DE PLASMIDOS

En un intento de conseguir bacterias que hubieran perdido uno u otro plásmido y de esta forma estudiar las características de los mismos por separado, se procedió al tratamiento de las estirpes de *B. fragilis* con agentes curantes de plásmidos.

Previamente al tratamiento, se realizaron pruebas para la determinación de la máxima concentración subinhibitoria de dichos agentes. En las Figuras 14 a 17 se exponen en D.O. a 630 nm, los resultados correspondien

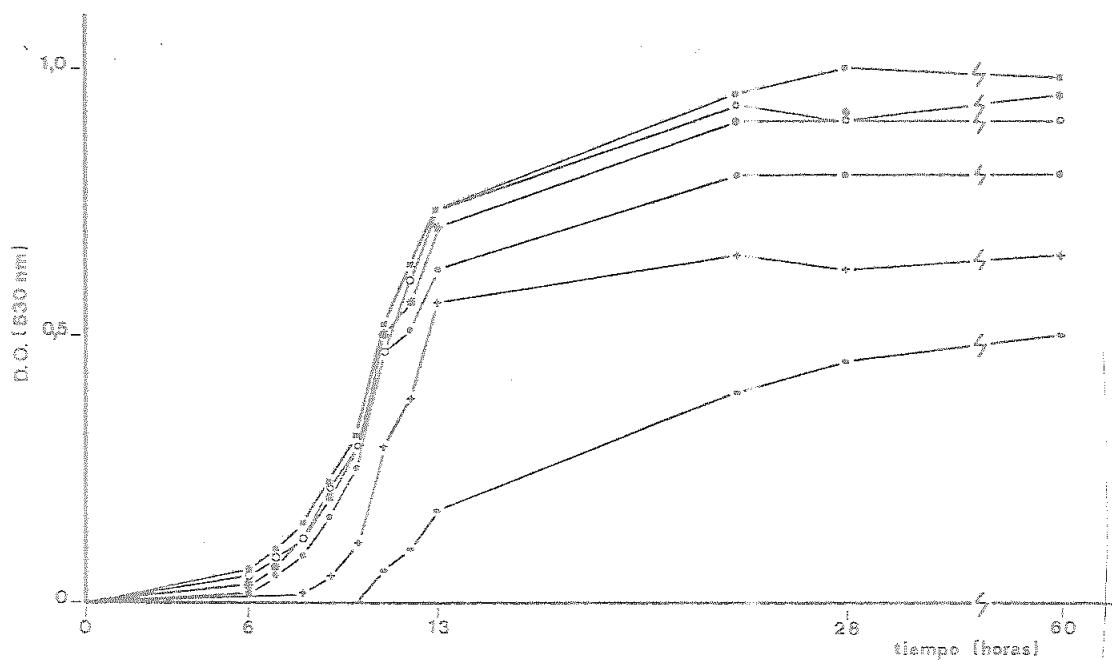


FIGURA 14. Efecto de la concentración de BrEt ($\mu\text{g/ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. vulgatus* A 182.

(■) sin BrEt. (○) 5 $\mu\text{g/ml}$. (*) 10 $\mu\text{g/ml}$.

(●) 20 $\mu\text{g/ml}$. (+) 30 $\mu\text{g/ml}$. (◐) 50 $\mu\text{g/ml}$.

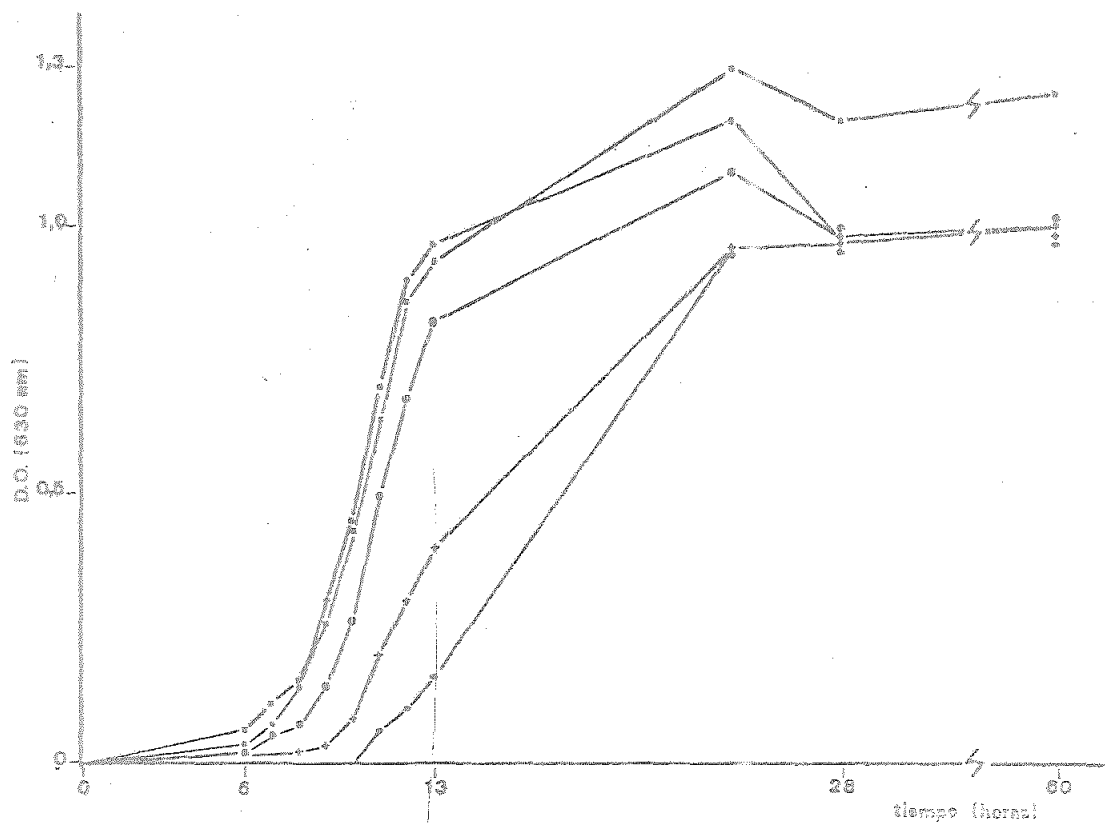


FIGURA 15. Efecto de la concentración de BrEt ($\mu\text{g/ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. fragilis* A 107.

(□) sin BrEt. (○) 5 $\mu\text{g/ml}$. (*) 10 $\mu\text{g/ml}$.

(+) 20 $\mu\text{g/ml}$. (-) 30 $\mu\text{g/ml}$.

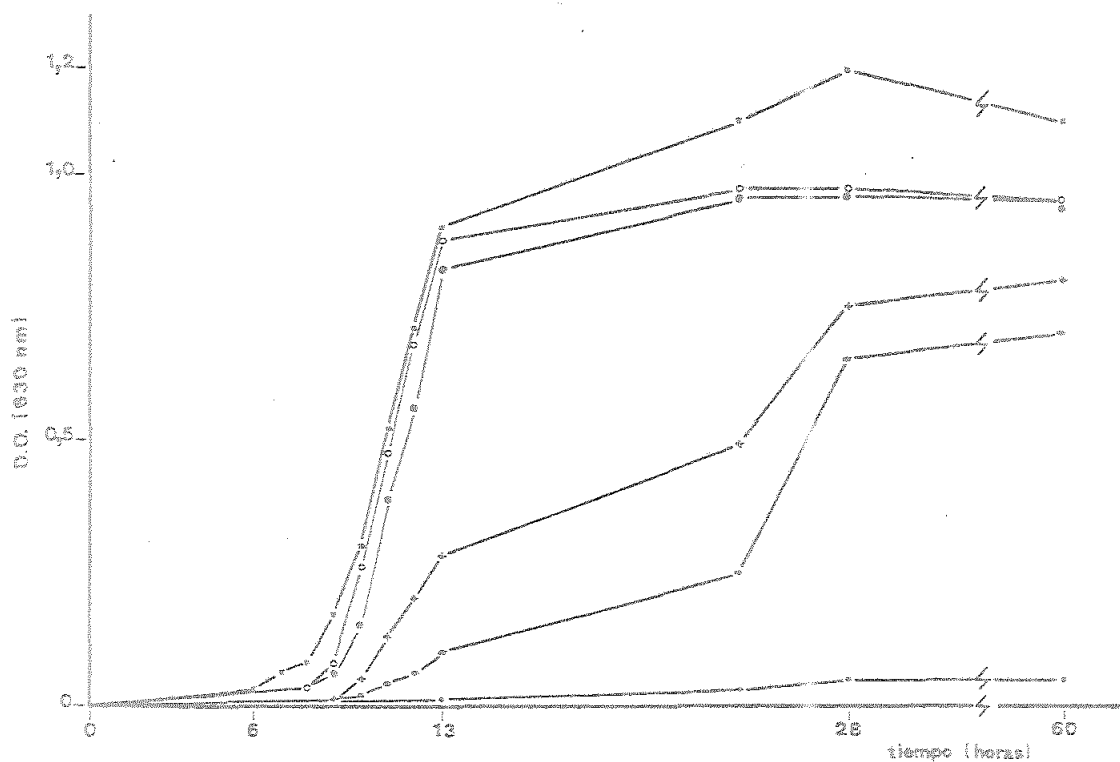


FIGURA 16. Efecto de la concentración de BrEt ($\mu\text{g/ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. fragilis* A 140.

(*) sin BrEt. (o) 5 $\mu\text{g/ml}$. (•) 10 $\mu\text{g/ml}$.
 (+) 20 $\mu\text{g/ml}$. (=) 30 $\mu\text{g/ml}$. (*) 50 $\mu\text{g/ml}$.

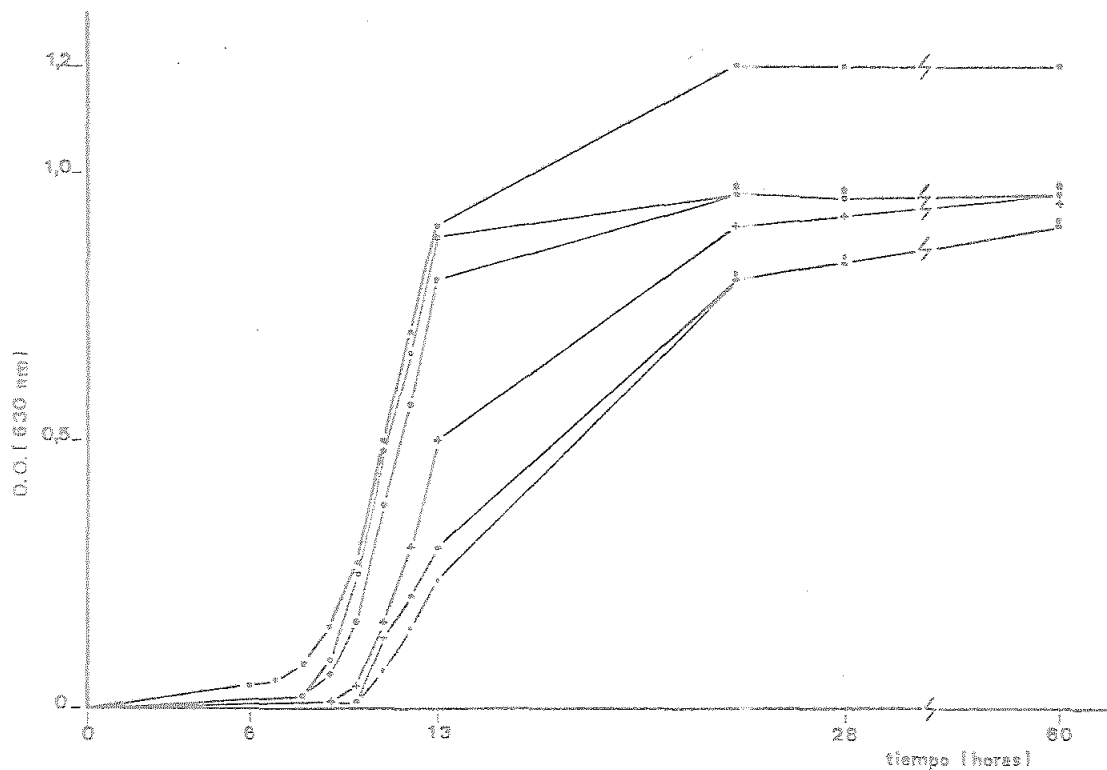


FIGURA 17. Efecto de la concentración de BrEt ($\mu\text{g/ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. fragilis* A 108.

(*) sin BrEt. (•) 5 $\mu\text{g/ml}$. (◦) 10 $\mu\text{g/ml}$.

(+) 20 $\mu\text{g/ml}$. (=) 30 $\mu\text{g/ml}$. (**) 50 $\mu\text{g/ml}$.

tes obtenidos en las lecturas que se realizaron a distintos tiempos de incubación con BrEt en las concentraciones indicadas. Se eligió la concentración de 10 µg/ml de este agente para el tratamiento posterior de todas las estirpes estudiadas, ya que parece ser la que más se ajusta a la curva de crecimiento de las mismas en ausencia del compuesto mencionado.

Los resultados que se exponen en las Figuras 18 a 21, en D.O. a 430 nm, corresponden a las lecturas realizadas a diversos tiempos de incubación con SDS, de las bacterias anaerobias objeto del presente estudio. Como se puede apreciar por las mismas, la concentración más idónea de las ensayadas fué la de 5 µg/ml, motivo por el que se eligió para el tratamiento en los ensayos definitivos. En la Figura 22 se representa el número de células viables de *B. vulgatus* A 182 frente a la D.O. a 430 nm.

5.1. Efecto del BrEt sobre la resistencia a antimicrobianos y la estabilidad de los plásmidos en Bacteroides

En las Tablas XI y XII se muestran los resultados obtenidos al estudiar a lo largo del tiempo, algunos de los caracteres presentados por las estirpes de *B. fragi*

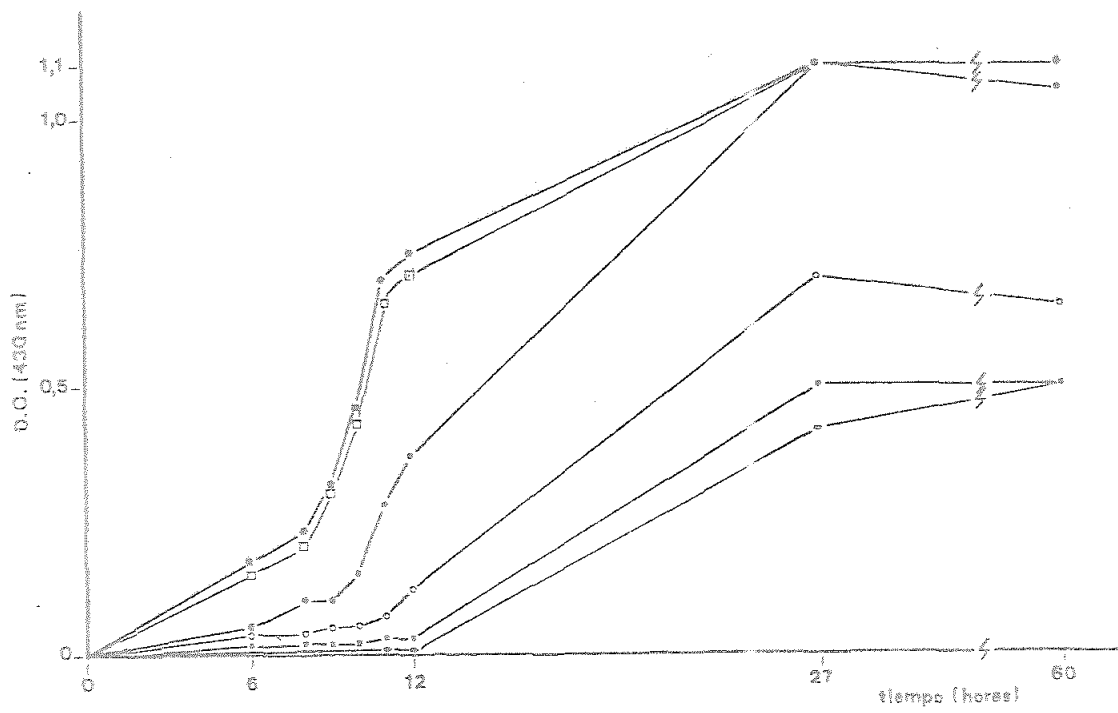


FIGURA 18. Efecto de la concentración de SDS ($\mu\text{g/ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. vulgatus* A 182.

(*) sin SDS. (□) 5 $\mu\text{g/ml}$. (◦) 10 $\mu\text{g/ml}$.

(◉) 20 $\mu\text{g/ml}$. (⊠) 30 $\mu\text{g/ml}$. (⊖) 50 $\mu\text{g/ml}$.

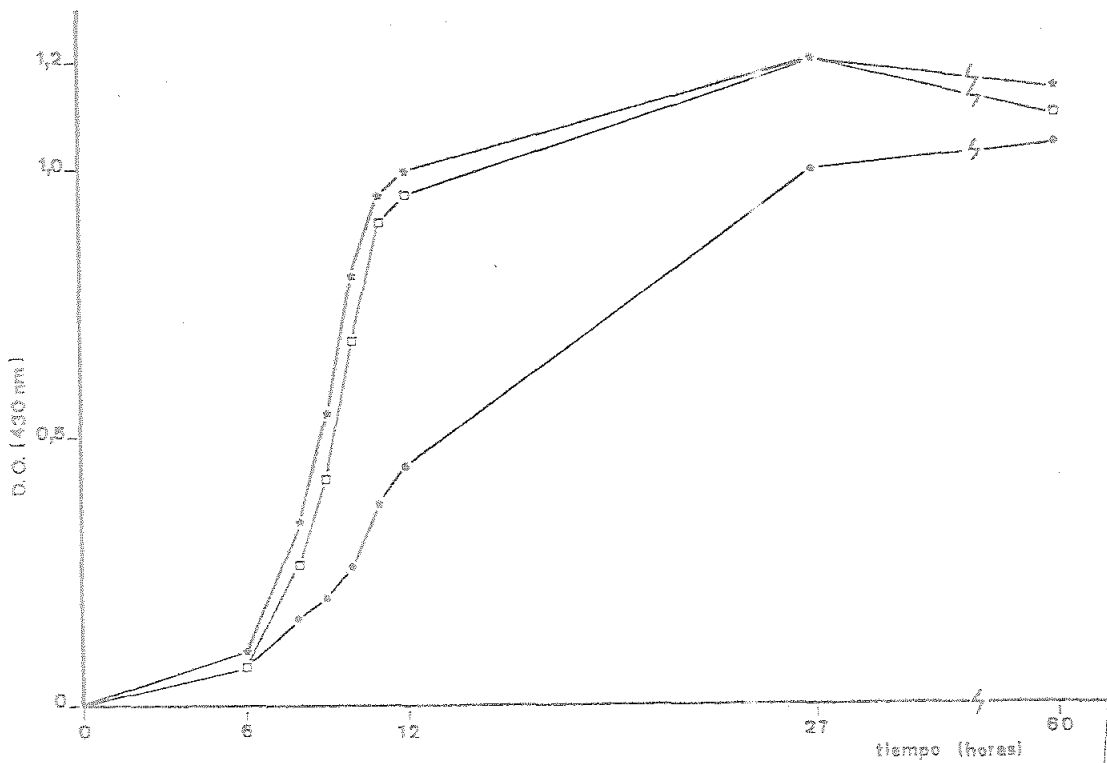


FIGURA 19. Efecto de la concentración de SDS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. fragilis* A 107. (*) sin SDS. (□) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (○) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

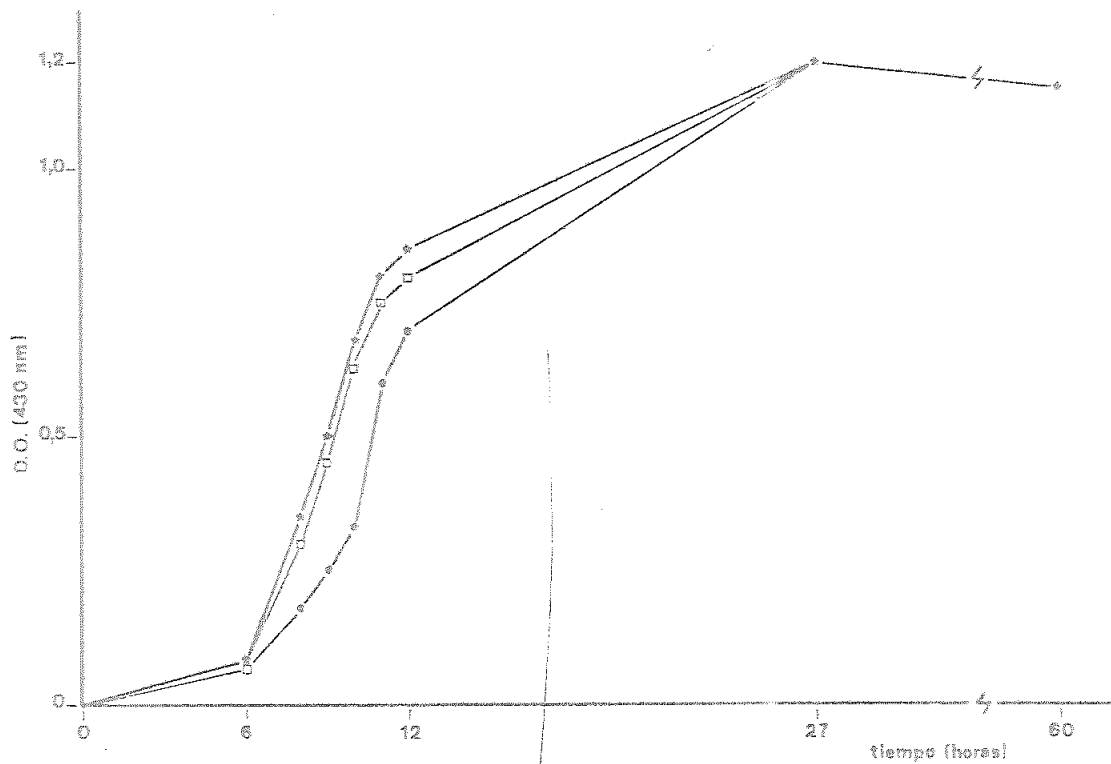


FIGURA 20. Efecto de la concentración de SDS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. fragilis* A 140. (*) sin SDS. (□) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (•) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

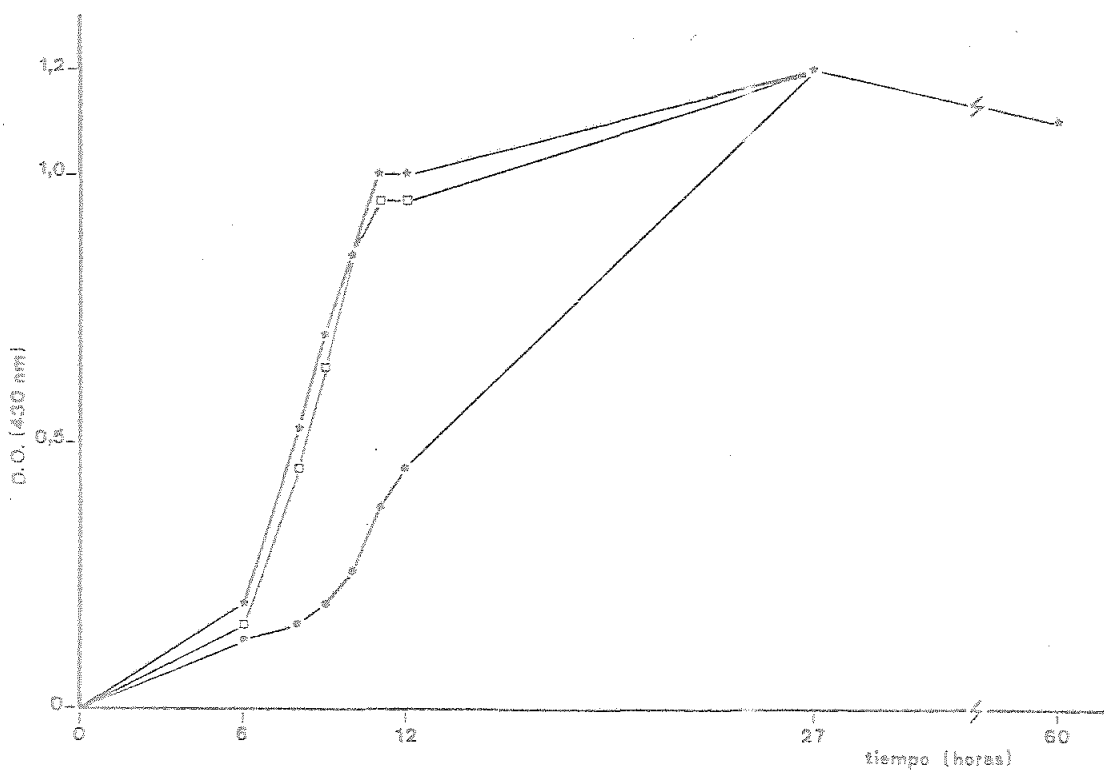


FIGURA 21. Efecto de la concentración de SDS ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sobre la curva de crecimiento de *B. fragilis* A 108. (*) sin SDS. (□) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. (○) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

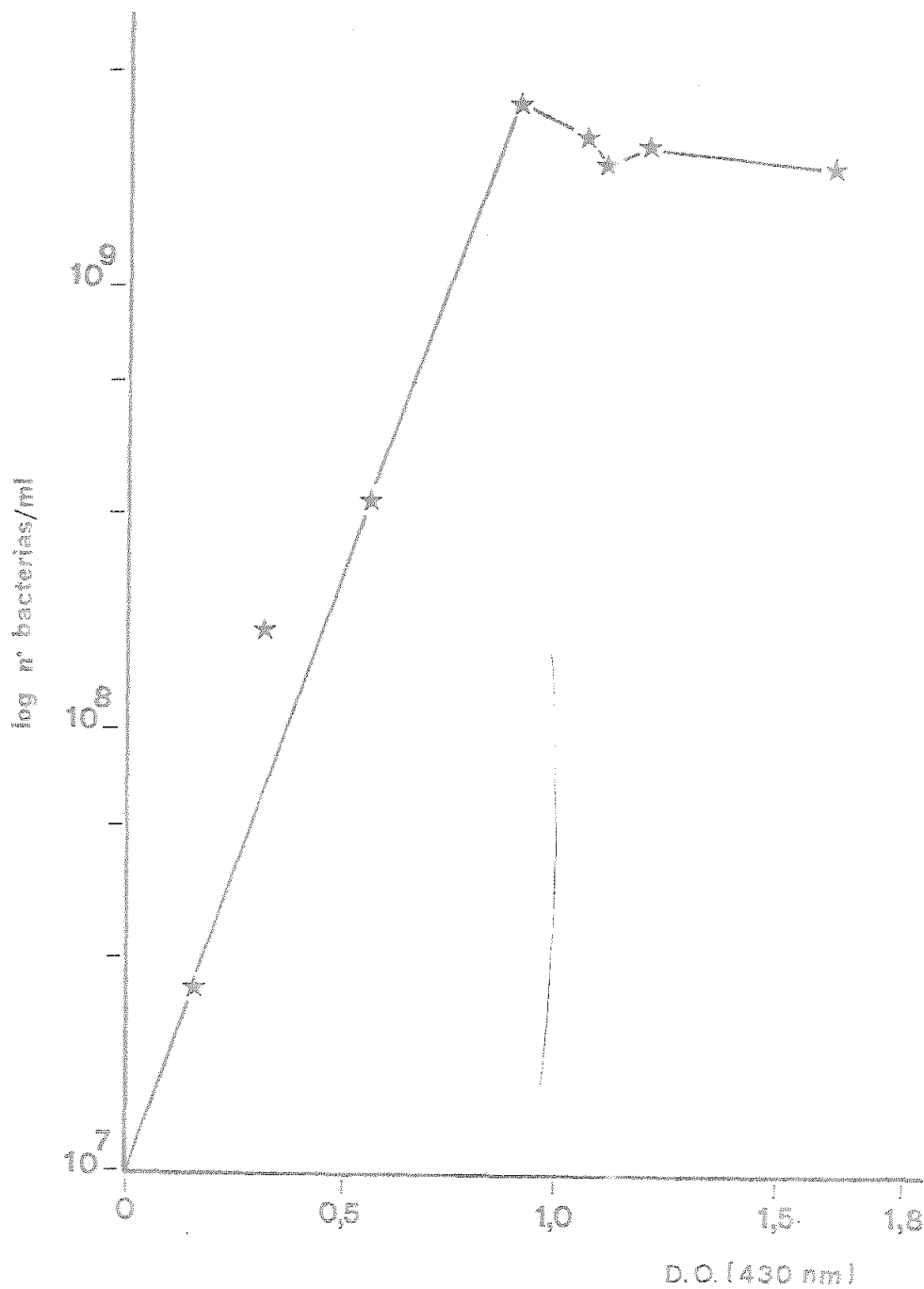


FIGURA 22. Representación gráfica del número de células viables por mililitro frente a la D.O. a 430 nm, de un cultivo en medio líquido (PVG) de *B. vulgatus* A 182 incubado a 37 °C en anaerobiosis durante 24 horas.

Las tratadas con dicho agente, tales como la resistencia a antibióticos, producción del enzima beta-lactamasa y presencia de plásmidos. Como se puede apreciar por estos resultados, la estabilidad de los plásmidos no se vió afectada por la presencia de este agente *lavador* en el medio de cultivo, ya que el 100% de los *Bacteroides* presentaron ambos plásmidos incluso después de 60 horas de tratamiento con B α E ϵ . No obstante, en el caso de *B. vulgatus* A 182 (Tabla XI), se pudo observar una disminución de la resistencia a antibióticos beta-lactámicos, que vá acompañada de una disminución concomitante de la producción del enzima beta-lactamasa (el 40% de las cepas estudiadas a las 60 horas de incubación con B α E ϵ , eran sensibles a Am y carecían del enzima).

5.2. Efecto del SDS sobre la resistencia a antimicrobianos y la estabilidad de los plásmidos en *Bacteroides*

La influencia del SDS a lo largo del tiempo sobre la sensibilidad a antibióticos y otros caracteres estudiados, aparecen reflejados en las Tablas XIII y XIV.

De la misma forma que el tratamiento con B α E ϵ , el SDS no afecta aparentemente la estabilidad de los plásmi

Tabla XI. Estudio de algunos caracteres presentados por *B. vulgatus* A 182 (A) y *B. fragilis* A 107 (B) después del tratamiento a lo largo del tiempo con 10 µg/ml de BrEt. Los datos se expresan en % de bacterias tratadas que presentan el carácter estudiado.

=====

(A)

Carácter ⁽¹⁾	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
<i>Am^r</i>	100	100	100	100	60
Producción de beta-lactamasa	100	100	100	100	60
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(B)

Carácter ⁽¹⁾	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
<i>Am^r</i>	100	100	100	100	100
Producción de beta-lactamasa	100	100	100	100	100
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(1) Para cada carácter y tiempo, se estudiaron 5 clones.

Tabla XII. Estudio de algunos caracteres presentados por *B. fragilis* A 140 (A) y *B. fragilis* A 108 (B) después del tratamiento a lo largo del tiempo con 10 µg/ml de BrEt. Los datos se expresan en % de bacterias tratadas que presentan el carácter estudiado.

=====

(A)

Carácter (1)	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
Tc ^h	100	100	100	100	100
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(B)

Carácter (1)	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
Tc ^h	100	100	100	100	100
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(1) Para carácter y tiempo, se estudiaron 5 clones.

Tabla XIII. Efecto del SDS (5 µg/ml) a lo largo del tiempo sobre la resistencia a antibióticos, producción de beta-lactamasa y presencia de plásmidos en *B. vulgatus* A 182 (A) y *B. fragilis* A 107 (B).

=====

(A)

Carácter ⁽¹⁾	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
<i>Am^r</i>	100	100	100	40	90 ⁽²⁾
Producción de beta-lactamasa	100	100	100	40	90
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(B)

Carácter ⁽¹⁾	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
<i>Am^r</i>	100	100	100	100	60
Producción de beta-lactamasa	100	100	100	100	60
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(1) Para cada carácter y tiempo, se estudiaron 5 clones.

(2) Los datos se expresan en % de bacterias tratadas que presentaban el carácter estudiado.

Tabla XIV. Efecto del SDS (5 µg/ml) a lo largo del tiempo sobre la resistencia a antibióticos y presencia de plásmidos en *B. fragilis* A 140 (A) y *B. fragilis* A 108 (B).

(A)					
Carácter (1)	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
Tc ^r	100	100	100	100	100 ⁽²⁾
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100
(B)					
Carácter (1)	Tiempo (horas)				
	12	24	36	48	60
Tc ^r	100	100	100	100	100
Presencia de plásmidos	100	100	100	100	100

(1) Para cada carácter y tiempo, se estudiaron 5 clones.

(2) Los datos se expresan en % de bacterias tratadas que presentaban el carácter estudiado.

dos en las bacterias estudiadas. No ocurrió así con la resistencia a antibióticos, que se perdió en un 60% a las 48 horas de tratamiento con dicho agente y en un 10% al mismo periodo de tiempo en el caso de *B. vulgatus* A 182, así como en un 40% a las 60 horas de tratamiento con este agente en el caso de *B. fragilis* A 107.

No se vió afectada en ningún momento, la capacidad de resistencia a Tc exhibida por *B. fragilis* A 140 y *B. fragilis* A 108.

5.3. Efecto de la temperatura sobre la resistencia a antimicrobianos y la estabilidad de los plásmidos en Bacteroides

Los resultados obtenidos cuando se estudió el efecto de la temperatura (12-24 horas a 44,5 °C) sobre los caracteres presentados por las cepas de *B. fragilis* estudiadas, se muestran en la Tabla XV. Como se puede apreciar, tan solo *B. vulgatus* A 182 se vió afectado en su resistencia a Am y producción de beta-lactamasa, ya que el 100% de los clones estudiados perdieron dichos caracteres a las 12 y 24 horas de tratamiento. Sin embargo, el 100% de los mismos conservaron los plásmidos

Tabla XV. Efecto de la temperatura (44,5 °C) sobre la estabilidad de los plásmidos, re sistencia a antibióticos y producción de beta-lactamasa en estirpes de *B. fragilis*¹

Estirpe	Tiempo (h)	Am ^h	Tc ^h	Producción de beta-lactamasa	Presencia de plásmidos
<i>B. vulgatus</i> A 182	12	0	NP	0	100
	24	"	"	"	"
<i>B. fragilis</i> A 107	12	100	NP	100	100
	24	"	"	"	"
<i>B. fragilis</i> A 140	12	NP	100	NP	100
	24	"	"	"	"
<i>B. fragilis</i> A 108	12	NP	100	NP	100
	24	"	"	"	"

(1) Los resultados se expresan en % de bacterias que presentaban el carácter. Las deter_u minaciones se efectuaron en 5 clones.

NP: No probado.

portados. El resto de *Bacteroides* estudiados, no se vieron afectados en ninguno de los caracteres analizados.

5.4. Efecto combinado del BrEt, SDS y temperatura, sobre la resistencia a antimicrobianos y estabilidad de plásmidos en *Bacteroides*

En un intento de conseguir bacterias que fueran portadoras de uno u otro plásmido de los dos portados, se sometieron las mismas a un tratamiento combinado de los agentes probados anteriormente. Los resultados obtenidos se presentan en las Tablas XVI y XVII y como se puede apreciar, este tratamiento combinado no afectó a ninguna de las funciones estudiadas en las estirpes de *B. fragilis*, aunque fué letal en ambos casos para *B. vulgatus* A 182.

La estabilidad de los plásmidos en el resto de estirpes fué manifiesta, presentándose ambos en el 100% de ellas.

6. ANALISIS DE LA PRODUCCION DE BETA-LACTAMASA MEDIANTE LA TECNICA DE ELECTROENFOQUE.

Los transconjugantes obtenidos en los experimentos

Tabla XVI. Efecto combinado del BrEt (10 µg/ml) y la temperatura (44,5 °C) sobre la resistencia a antibióticos, producción de beta-lactamasa y presencia de plásmidos en especies de Bacteroides¹.

Estirpe	Am ^r	Tc ^r	Producción de beta-lactamasa	Presencia de plásmidos
<i>B. vulgatus</i> A 182	0	NP	0	0
<i>B. fragilis</i> A 107	100	NP	100	100
<i>B. fragilis</i> A 140	NP	100	NP	100
<i>B. fragilis</i> A 108	NP	100	NP	100

(1) Los resultados se expresan en % de clones que presentaron el carácter estudiado. Todas las determinaciones se efectuaron en 5 clones a la vez.

NP: No probado.

Tabla XVII. Efecto combinado del SDS (5 µg/ml) y la temperatura (44,5 °C) sobre la resistencia a antimicrobianos, producción del enzima beta-lactamasa y presencia de plásmidos en especies de Bacteroides¹.

Estirpe	Am ^r	Tc ^r	Producción de beta-lactamasa	Presencia de plásmidos
<i>B. vulgatus</i> A 182	0	NP	0	0
<i>B. fragilis</i> A 107	100	NP	100	100
<i>B. fragilis</i> A 140	NP	100	NP	100
<i>B. fragilis</i> A 108	NP	100	NP	100

(1) Los resultados se expresan en % de clones que presentaron el carácter estudiado. Todas las determinaciones se efectuaron en 5 clones a la vez.

NP: No probado

que se muestran en las Tablas VII y VIII, fueron estudiados en base a la producción del enzima beta-lactamasa y todos ellos presentaron una gran afinidad por el compuesto cromogénico 87/312, clasificándolos por esta razón en superproductores del enzima. Dicha afinidad por la Cefalosporina Cromogénica era superior a la observada en las bacterias donadoras, lo cual indujo a pensar que la capacidad de degradación del compuesto y por tanto de la resistencia a algunos beta-lactámicos por los transconjugantes, podría deberse a la recepción de los plásmidos mencionados, los cuales llevarían los determinantes genéticos para la codificación de una beta-lactamasa. Análisis posteriores llevados a cabo con enzimas semipurificados procedentes de células rotas por sonicación, dieron como resultado la detección de beta-lactamasas con puntos isoeléctricos diferentes en células donadoras, células receptoras y células transconjugantes, según se muestra en la Figura 23. Como se puede apreciar, el enzima producido por *B. vulgaris* A 182 (línea 4) presenta un punto isoeléctrico de 4,9 mientras que en *E. coli* K-12 E 711 (línea 2) y los recombinantes que resultaron del cruce de ambas bacterias (línea 3), el punto isoeléctrico presentado por el enzima beta-lactamasa es idéntico en ambos, con un

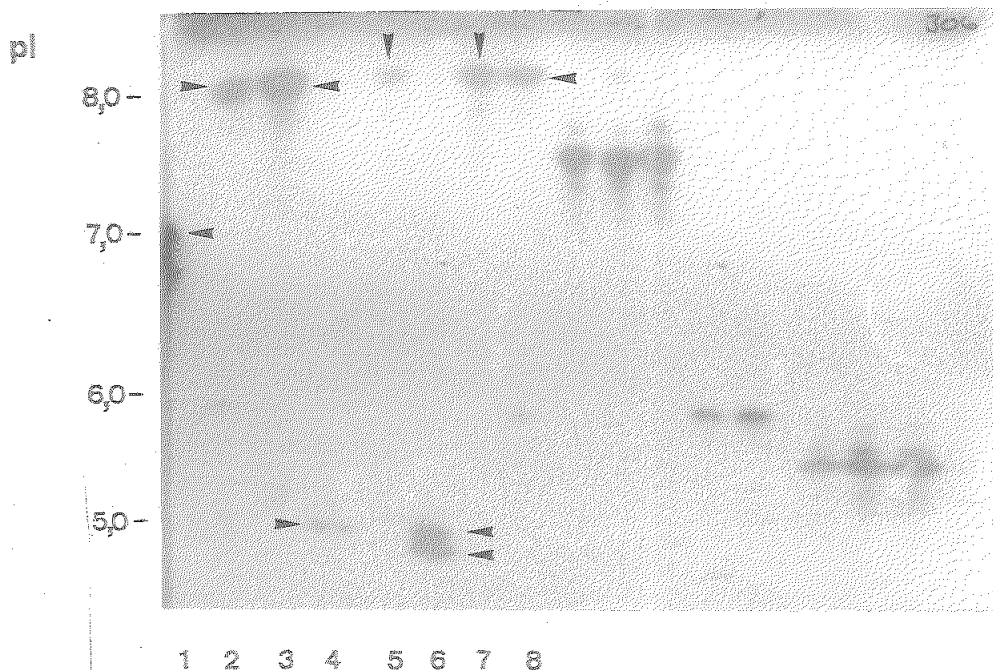


FIGURA 23. Electroenfoque de beta-lactamasas obtenidas mediante rotura de las células y electroforesis en gel de poliacrilamida. Línea 1: Mioglobina utilizada como marcador de punto isoeléctrico. Línea 2: receptor *E. coli* K-12 E 711 (enzima concentrada 2 veces). Línea 3: transconjugante *B. vulgatus* A 182 x *E. coli* K-12 E 711. Línea 4: donador *B. vulgatus* A 182. Línea 5: *E. coli* K-12 J53-R997, cuya producción de beta-lactamasa está controlada por el plásmido R997. Línea 6: donador *B. fragilis* A 107. Línea 7: transconjugante *B. fragilis* A 107 x *E. coli* K-12 E 711 (enzima concentrada 6 veces). (pI): punto isoeléctrico.

valor aproximado de 8,1.

Resultados similares se obtuvieron estudiando esta característica en los transconjugantes procedentes del cruce *B. fragilis* A 107 x *E. coli* K-12 E 711 (línea 7), cuya enzima exhibe un punto isoeléctrico de 8,1 mientras que *B. fragilis* A 107 presenta dos tipos de enzima con distintos puntos isoeléctricos: 4,7 y 4,9 (línea 6).

Estos resultados no evidenciaron la transferencia de la capacidad para la producción del enzima beta-lactamasa desde *B. vulgatus* A 182 y *B. fragilis* A 107 a *E. coli* K-12 E 711, puesto que los transconjugantes estudiados carecían del enzima presente en las cepas donadoras. No obstante la presencia en los transconjugantes de un enzima con idéntico punto isoeléctrico que el detectado en la cepa receptora, este aparecía en mayor concentración en los recombinantes, lo cual denota una superproducción del mismo (líneas 2, 3 y 7, 8).

7. TRATAMIENTO DE LOS PLASMIDOS PRESENTES EN CEPAS DE *B. fragilis* CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Los datos obtenidos hasta ahora indicaban claramen

te la existencia de tres grupos de *Bacteroides* portadores de plásmidos con característica diferentes:

Grupo 1: *Bacteroides* resistentes a antibióticos beta-lactámicos, productores del enzima beta-lactamasa y portadores de dos plásmidos (pSEa 1 y pSEa 2) que eran transferidos a *E. coli* K-12 E 711 por conjugación.

Grupo 2: *Bacteroides* resistentes a beta-lactámicos y tetraciclina, productores de beta-lactamasa, portadores de dos plásmidos (pSEa 3 y pSEa 4) que eran transferidos por conjugación a *B. fragilis* TM 4000 pero no a *E. coli* K-12 E 711.

Grupo 3: *Bacteroides* resistentes a diversos antimicrobianos, algunos de ellos productores del enzima beta-lactamasa y portadores de un único plásmido que no era transferido a ninguna de las cepas bacterianas utilizadas como receptoras.

A fin de confirmar la ubicación en cada uno de estos tres grupos de las bacterias aisladas, se procedió al estudio de los patrones de restricción presentado por los plásmidos. Para ello, se purificaron en gradiente de densidad según se indica en Métodos (Figura 24) y se trataron con los enzimas de restricción descritos en

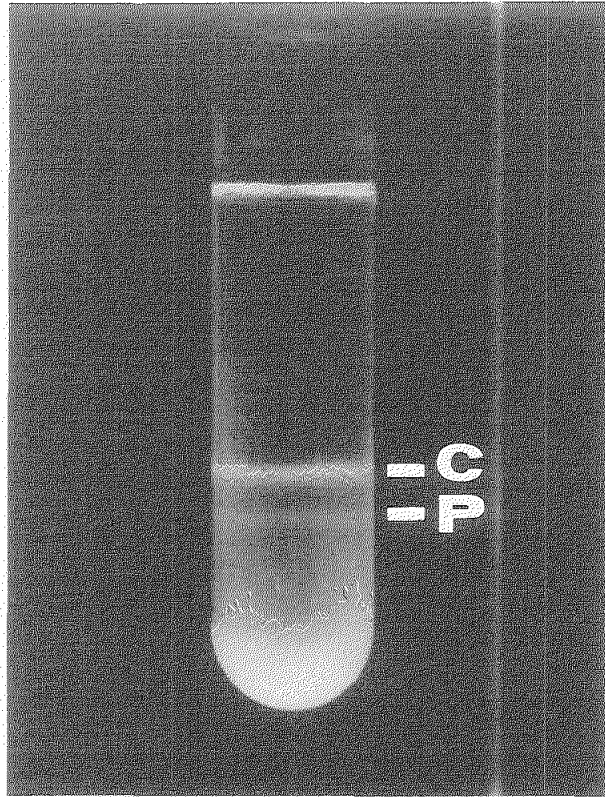


FIGURA 24. Gradiente de densidad en ClCs de un lisado celular de *B. fragilis* A 140. (C): banda correspondiente al ADN cromosómico. (P): banda correspondiente al ADN plasmídico. Las bandas se visualizaron mediante iluminación con luz ultravioleta.

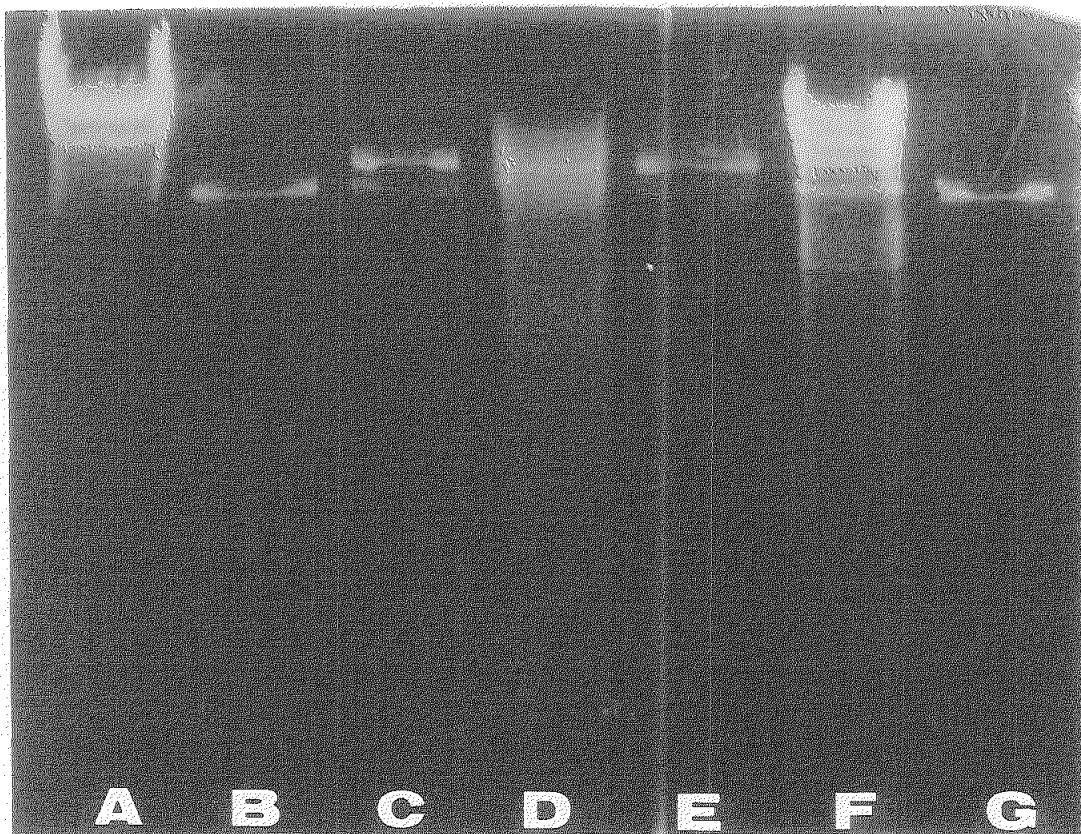
Materiales.

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 25, 26, 27 y 28. En las Figuras 25 y 26 se muestran los patrones de restricción de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 observándose que el primero de ellos es cortado por *Hind III* (B) y *Eco RI* (G en Figura 25 y D en Figura 26) en un solo punto, ya que la migración del plásmido así cortado, coincide con la banda del mismo plásmido en su forma lineal abierta obtenida por congelación y descongelación de éste. No se apreciaron bandas de restricción correspondientes al plásmido de bajo peso molecular (pSEa 2) a pesar de utilizar para el tratamiento plásmidos concentrados dos veces más que los no sometidos a tratamiento de restricción (Figura 25 D y Figura 26 A).

En las Figuras 27 y 28 se muestran los patrones de restricción de los plásmidos pSEa 3 y pSEa 4. El primero de ellos (pSEa 3) presentó un solo punto de corte cuando se trató con el enzima de restricción *Pst I*, mientras que el resto de endonucleasas no escindieron al mismo. Tampoco se apreciaron en este caso los fragmentos de restricción correspondientes al plásmido pSEa 4.

Por último, los plásmidos correspondientes al Grupo 3 de los descritos anteriormente, no fueron cortados por ninguna de las enzimas de restricción probadas, lo cual contribuye a su inclusión en este grupo, distinto de los anteriores.

FIGURA 25. Tratamiento de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 con distintos enzimas de restricción. (A): λ x Sal I. (B): pSEa 1 y pSEa 2 x Hind III. (C): pSEa 1 y pSEa 2 x Hinc II. (D): pSEa 1 y pSEa 2. (E): pSEa 1 y pSEa 2 x Pst I. (F): λ x Pst I. (G): pSEa 1 y pSEa 2 x Eco RI + Pst I. La electroforesis se efectuó en gel de agarosa al 0,7% durante 2 horas a 150 V y 50 mA.



A B C D E F G

TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS (md)

33
25
20
10
4

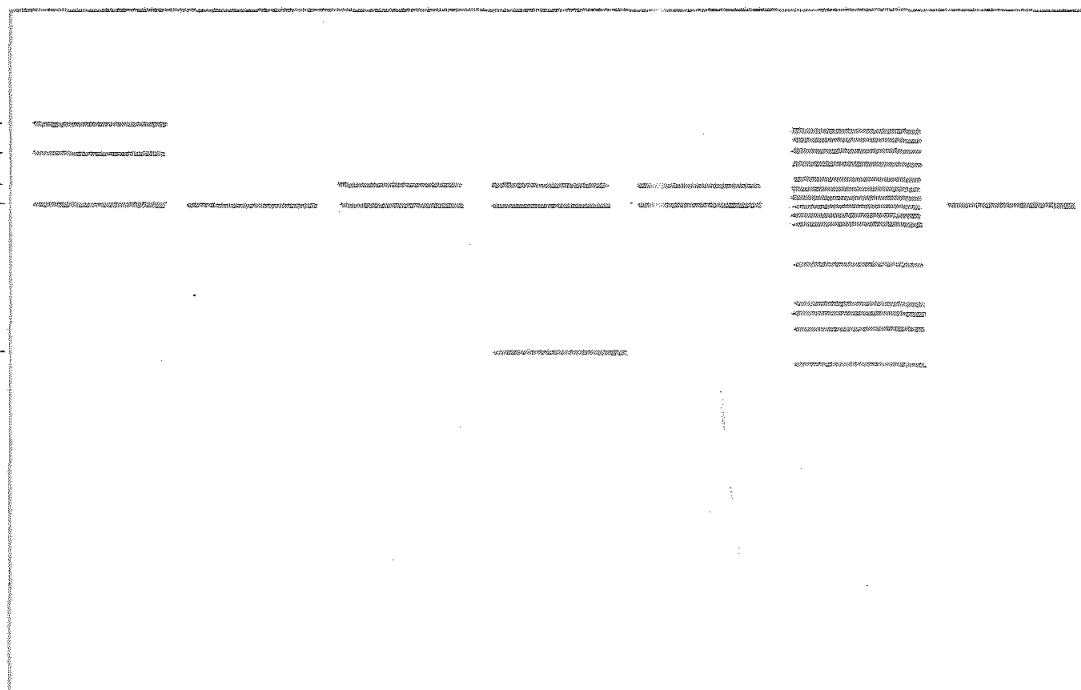
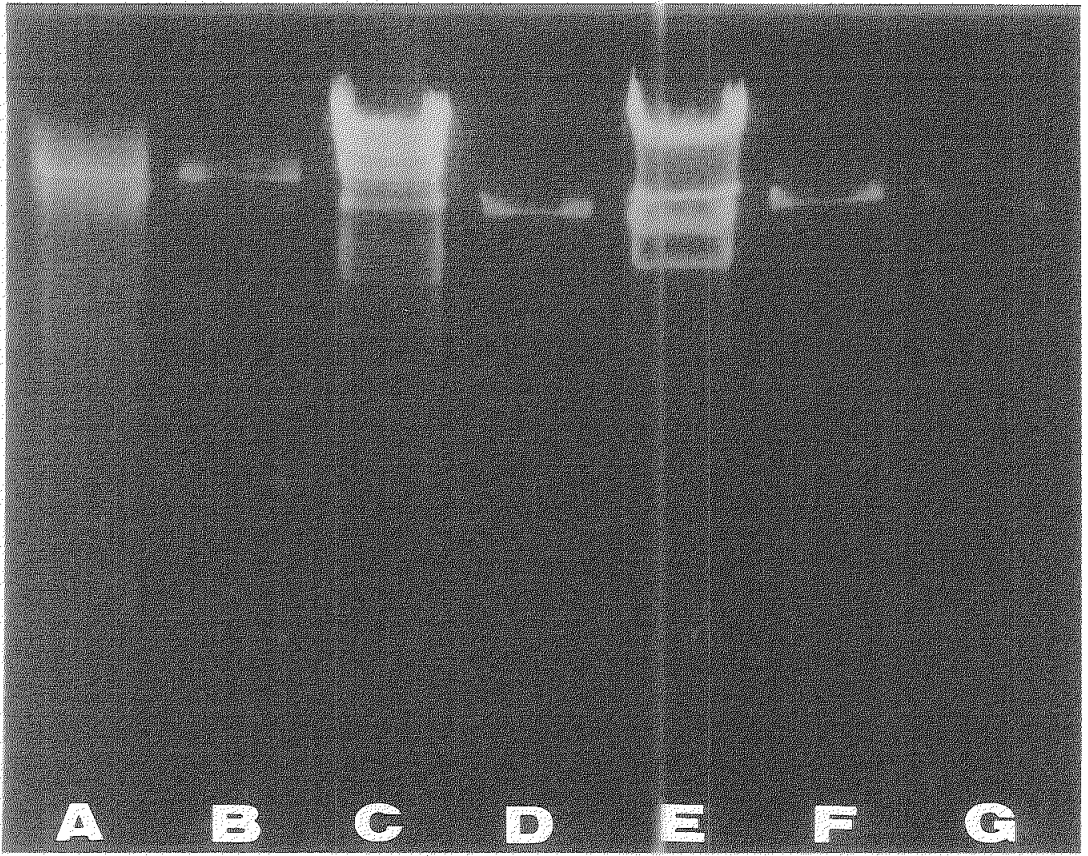


FIGURA 26. Tratamiento de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 con distintas enzimas de restricción. (A): pSEa 1 y pSEa 2. (B): pSEa 1 y pSEa 2 x Pst I. (C): λ x Pst I. (D): pSEa 1 y pSEa 2 x Eco RI + Pst I. (E): λ x Eco RI. (F): pSEa 1 y pSEa 2 x Eco RI. (G): pSEa 1 y pSEa 2 x Bam H-I. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 0,7% durante 2 horas a 150 V y 50 mA.



TAMANO DE LOS FRAGMENTOS (md)

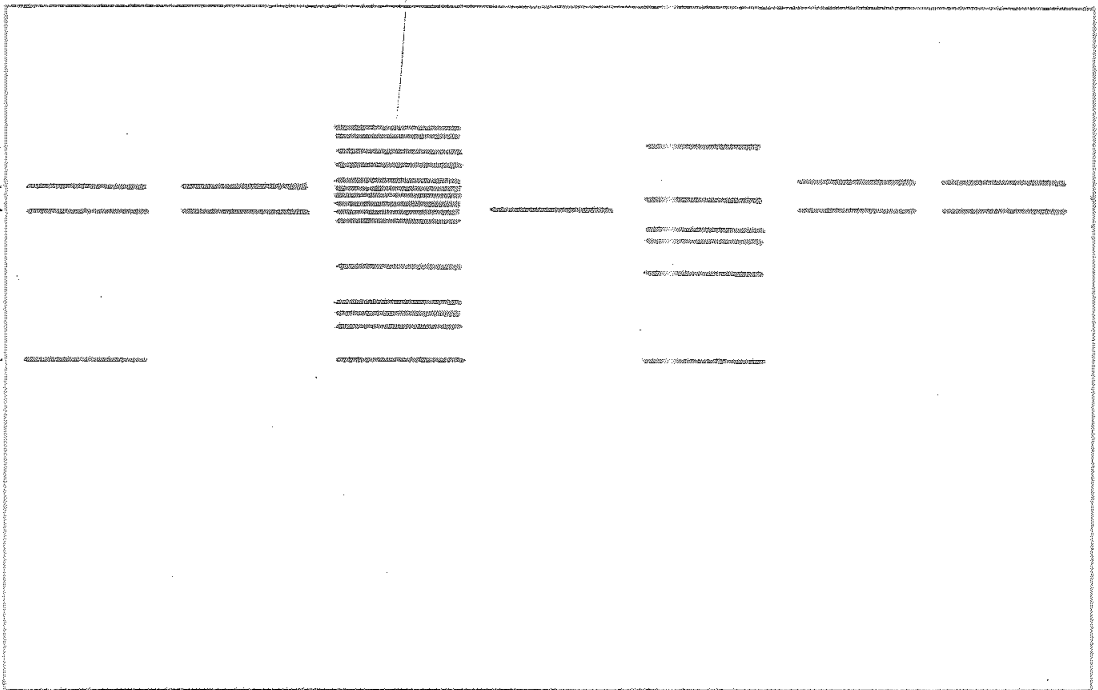
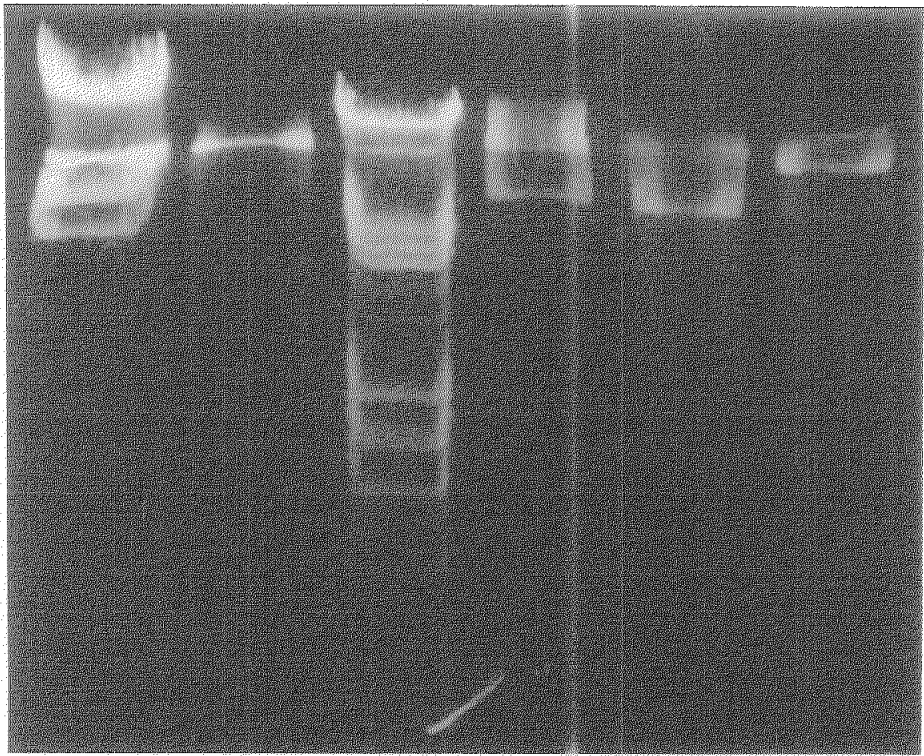


FIGURA 27. Tratamiento de los plásmidos pSEa 3 y pSEa 4 con distintos enzimas de restricción. (A): λ x Eco RI. (B): pSEa 3 y pSEa 4 x Eco RI. (C): λ x Pst I. (D): pSEa 3 y pSEa 4 x Pst I. (E): pSEa 3 y pSEa 4 x Eco RI + Pst I. (F): pSEa 3 y pSEa 4 x Hinc II. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 0,7% durante 2 horas a 150 V y 50 mA.



A B C D E F

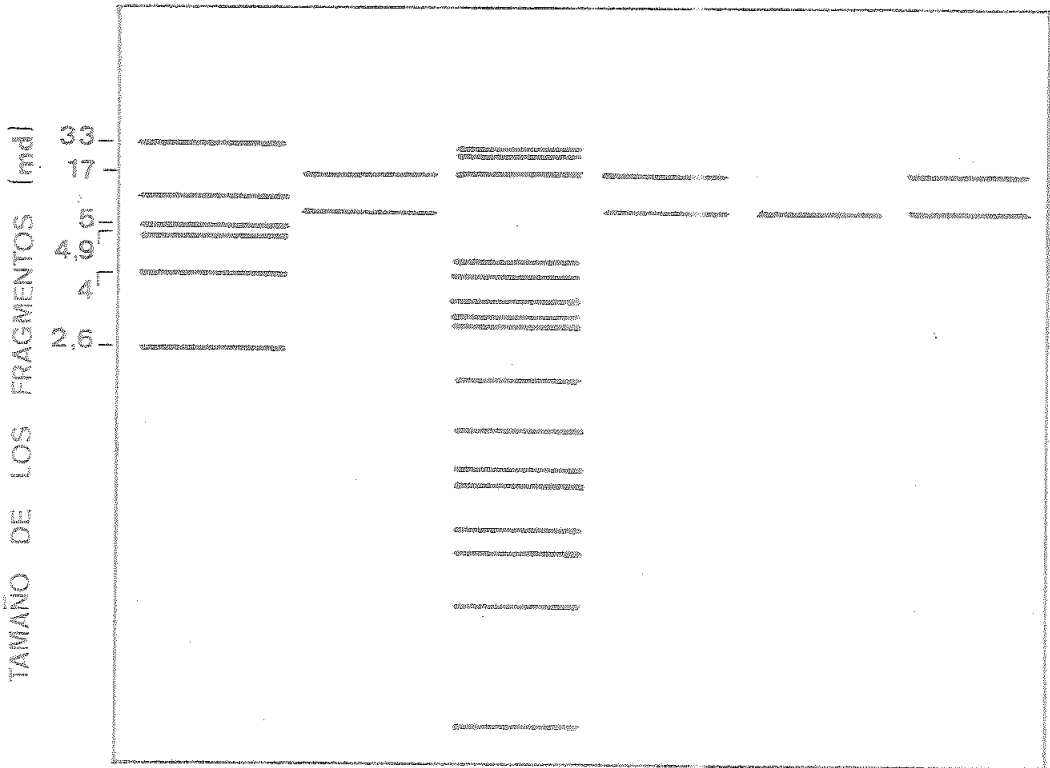
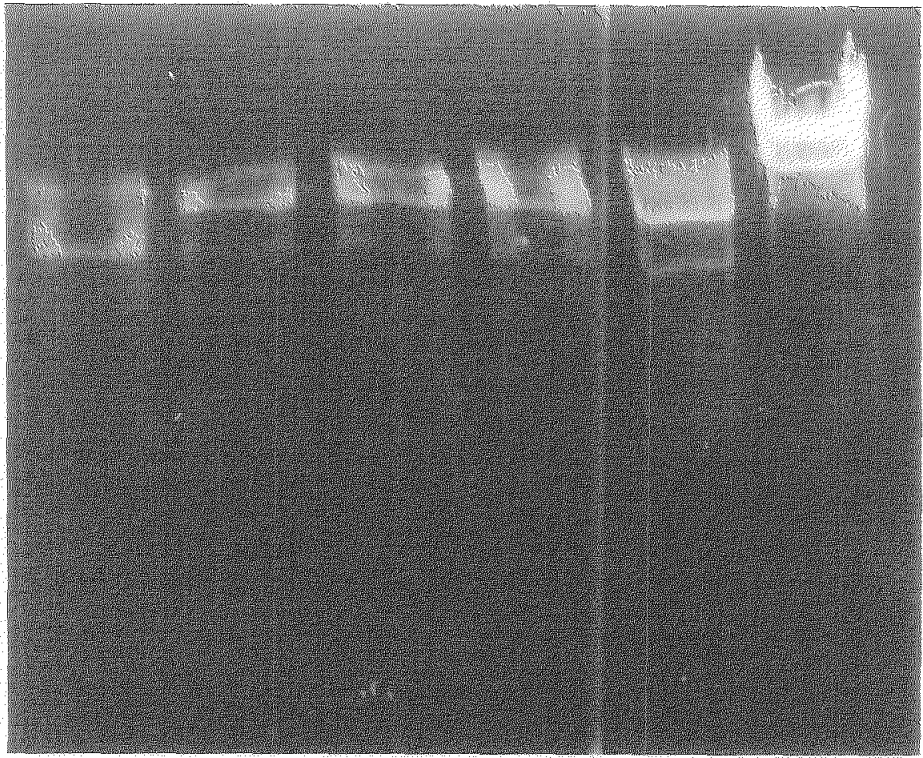


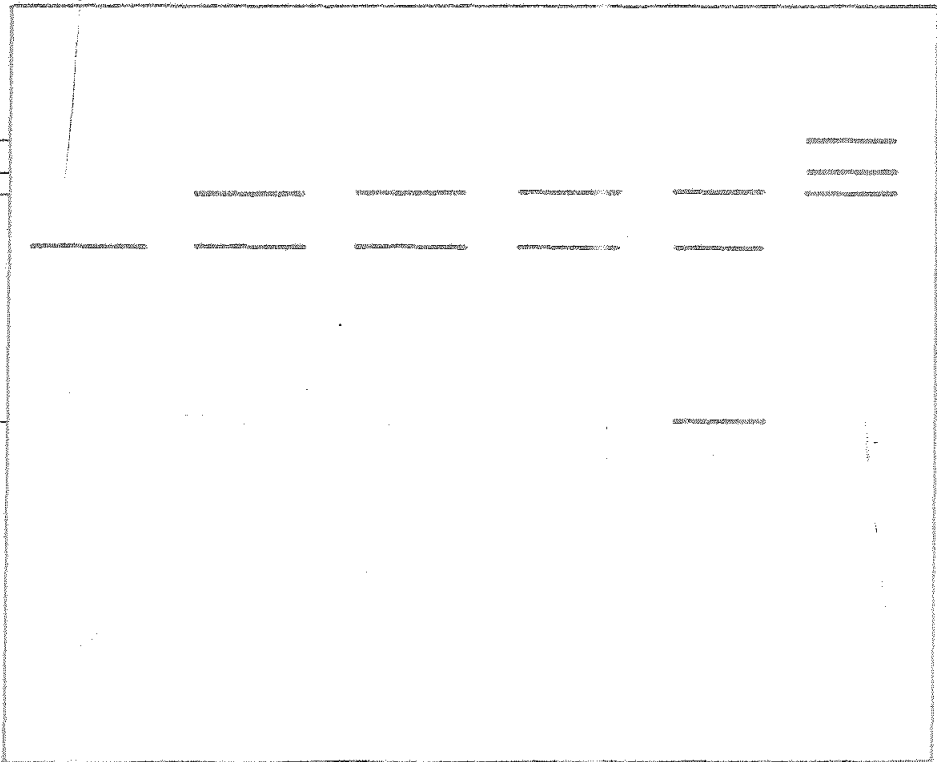
FIGURA 28. Tratamiento de los plásmidos pSEa 3 y pSEa 4 con distintas enzimas de restricción. (A): pSEa 3 y pSEa 4 x Eco RI + Pst I. (B): pSEa 3 y pSEa 4 x Hinc II. (C): pSEa 3 y pSEa 4 x Hind III. (D): pSEa 3 y pSEa 4 x Bam H-I. (E): pSEa 3 y pSEa 4. (F): λ x Sal I. La electroforesis se llevó a cabo en gel de agarosa al 0,7% durante 2 horas a 150 V y 50 mA.



A B C D E F

TAMAÑO DE LOS FRAGMENTOS (md)

33
20
17
37



DISCUSION

El intestino grueso de un adulto normal presenta aproximadamente de 10^{11} a 10^{12} bacterias por gramo de heces, correspondiendo del 90 al 99% de esta flora microbiana residente, a bacterias anaerobias estrictas (Socransky *et al.*, 1963; Drasar, 1974; Holdeman *et al.*, 1976; Jawetz *et al.*, 1978). El microorganismo que predomina cuantitativamente en el c6lon es *B. fragilis*, que incluye cinco especies conocidas anteriormente como subespecies del grupo *fragilis*. De ellas, *B. fragilis* subespecie *fragilis*, denominada ahora *B. fragilis*, constituye solo un 0,04% de la flora normal col6nica, aunque este microorganismo presenta un alto porcentaje de aislamiento en cultivos cl6nicos (Bartlett, 1980).

En los estudios llevados a cabo por nosotros sobre pacientes con diagn6stico de abscesos y exudados de heridas, se aislaron un total de 60 microorganismos pertenecientes al grupo *B. fragilis*, de los cuales un 62% del total correspondieron a estirpes de *B. fragilis*.

Las restantes bacterias pertenecientes a dicho grupo, presentaron un porcentaje de aislamiento menor, obteniéndose un 14% para *B. vulgatus*, 10% para *B. distasonis*, 9% de *B. ovatus* y 5% de *B. thetaiotaomicron* (Figura 2). Estas frecuencias de aislamiento son similares a las obtenidas por otros autores, quienes estiman que del 60 al 70% del total de bacterias pertenecientes a dicho grupo y obtenidas de muestras clínicas, corresponden a estirpes de *B. fragilis* (Holdeman *et al.*, 1976; Gorbach y Tally, 1980; Wallace *et al.*, 1981).

La Cromatografía Líquido-Gas de los ácidos grasos volátiles y metilados, efectuada sistemáticamente a cada uno de los aislamientos bacterianos, fué de gran ayuda para la clasificación en especies de aquellos *Bacteroides* cuyas pruebas bioquímicas no lo permitían con seguridad. La utilidad de este método para la clasificación definitiva de bacterias anaerobias, está adquiriendo en los últimos años una importancia creciente, a pesar de que ello conlleve la adquisición de un material altamente sofisticado (Holdeman y Moore, 1975; Moss y Dess, 1975; Sutter *et al.*, 1975).

Los patrones de resistencia presentados por estas

bacterias anaerobias objeto del presente trabajo, ofrecen en general pequeñas diferencias con los estudiados anteriormente por otros autores.

Hasta el año 1976, los medios utilizados para la elaboración del antibiograma ~~cuantitativo~~ de bacterias anaerobias eran diversos y no había unificación de criterios sobre el medio específico a utilizar. A partir de ese año, fué sugerido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards, el medio de Wilkins y Chalgren para la realización de la prueba de susceptibilidad a antibióticos de bacterias anaerobias (Wilkins y Chalgren, 1976). Para nuestros estudios se utilizó el medio citado anteriormente, así como el medio Brucella Agar Sangre, de uso común en el antibiograma de bacterias anaerobias antes de la aparición del medio Wilkins y Chalgren, lo cual pudiera constituir uno de los factores base para la aparición de esas pequeñas divergencias.

Nuestros resultados con clindamicina, el antibiótico más efectivo de los 16 utilizados, puesto que inhibió al 90% de las cepas de *B. fragilis* a una concentración de 0,25 µg/ml (Tabla III), concuerdan esencial

mente con otros obtenidos anteriormente (Kislak, 1972; Martin *et al.*, 1972; Henderson *et al.*, 1977), mientras que el porcentaje de inhibición dado por otros autores, atribuye a este antibiótico menor efectividad que la obtenida por nosotros, ya que de 19 cepas estudiadas, solo 2 fueron inhibidas a una concentración de 6,25 $\mu\text{g/ml}$ (Nastro y Finegold, 1972). Estas diferencias pudieran ser debidas a múltiples razones, entre las que destacarían principalmente el escaso número de cepas probadas por estos autores y la utilización de un medio de cultivo líquido para la prueba de sensibilidad. El hecho de atribuir una buena efectividad a clindamicina es debido a que en ensayos previos (Kagan, 1974) se demostró que después de la administración intramuscular de dosis de 300, 450 y 600 mg de este antibiótico, las concentraciones que se alcanzaron en suero fueron de 3,8 a 4,9, 5,3 y 6,2 a 6,3 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, de 2 a 4 horas después de su administración. A las 12 horas, las concentraciones medias fueron de 1,2 a 1,6, 2,0 y 2,5 a 2,8 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, concentraciones que son suficientes para inhibir al microorganismo según los datos de CMI obtenidos por nosotros.

Los resultados obtenidos con tetraciclina, no coin

ciden con los presentados por otros autores como Zabransky *et al.*, (1973); quienes determinaron la CMI de dicho antibiótico a 50 cepas de *B. fragilis* aisladas de muestras clínicas, por el método de dilución en caldo. Sus estudios precisan que dicho antibiótico inhibe al 90% de las cepas estudiadas a una concentración de 64 microgramos por mililitro, mientras que nosotros obtuvimos una CMI de 8 µg/ml para el mismo porcentaje de bacterias (Tabla III). No obstante, la acción de la tetraciclina presenta un patrón típicamente bimodal, es decir, aparecen bacterias extremadamente sensibles a dicho antibiótico mientras que otras son más resistentes; sin embargo, la mayoría de las cepas probadas presentan CMIs intermedias, por lo que la CMI dependerá del grupo en el que se encuentren las cepas estudiadas en cada caso. Este patrón de comportamiento es igual que el descrito para otros microorganismos con este antibiótico y con otros análogos de tetraciclina (Ericsson y Sherris, 1971). Otros autores argumentan además que el número de *Bacteroides* resistentes a tetraciclina se encuentra entre el 50 y el 60% y que dicha resistencia ha ido aumentando progresivamente en los últimos años (Sutter y Finegold, 1976)

Metronidazol es un antibiótico medianamente efectivo frente a *Bacteroides* según Henderson *et al.*, (1977), con una CMI de 12,5 µg/ml. Nuestros resultados están de acuerdo con estos, ya que entre 8 y 16 µg/ml de este antibiótico son suficientes para inhibir al 90% de dichas bacterias anaerobias.

Respecto a carbenicilina, se ha detectado la aparición de cepas resistentes a dicho antibiótico a partir de 1976 (Salaki *et al.*, 1976). Posteriormente, Privitera *et al.*, (1979) y Tally *et al.*, (1979) detectaron cepas de *B. fragilis* cuya resistencia a este antimicrobiano no estaba asociada con plásmidos transferibles por conjugación a *E. coli*, *B. fragilis* y *B. thetaiotaomicon*. En nuestros estudios, el 90% de las cepas probadas presentaron una CMI de 128-256 µg/ml, lo cual indica que su resistencia a este antibiótico es muy alta, resultando ineficaz para el tratamiento de la mayoría de las infecciones causadas por *Bacteroides*. A pesar de los resultados expuestos (Tabla III), la resistencia a carbenicilina no pudo ser relacionada con la presencia de plásmidos en las estirpes estudiadas, como será discutido posteriormente.

Los resultados obtenidos con cloranfenicol, con una CMI de 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el 90% de las cepas de *B. fragilis* estudiadas (Tabla III), no se correlacionan con los datos aportados por Zabransky *et al.*, (1973), que obtuvieron una CMI de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para el 100% de las cepas estudiadas, realizada en medio líquido, ni con los de Henderson *et al.*, (1977), quienes en medio de Müller-Hinton obtuvieron una CMI 90 de 12,5 a 16,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para las cepas probadas. Las divergencias observadas pudieran deberse también a las razones aducidas anteriormente.

Eritromicina es un antibiótico poco efectivo frente a estas bacterias (CMI 90, 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y los datos obtenidos concuerdan perfectamente con los de Thorton y Cramer (1971) y Sutter y Finegold (1976), pues encontraron que aproximadamente el 100% de las bacterias anaerobias analizadas eran resistentes a más de 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de dicho antibiótico. Es probable que estos resultados se deban a que eritromicina es un antibiótico eminentemente activo frente a bacterias Gram positivas, aunque otros autores atribuyen una buena eficacia a este antibiótico frente a bacterias anaerobias Gram negativas (Kislak, 1972; Martin *et al.*, 1972).

Los resultados obtenidos cuando se utilizaron antibióticos pertenecientes a la familia de los beta-lactámicos, coinciden esencialmente con la mayoría de los trabajos publicados hasta ahora. La razón primordial para esta buena correlación pudiera radicar en la reciente utilización de estos antimicrobianos para la realización del antibiograma de bacterias anaerobias, que coincide con el desarrollo paralelo de medios de cultivo más adecuados para la elaboración de dichas pruebas de sensibilidad (Sutter *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1977; Bach *et al.*, 1978; Chow *et al.*, 1978; Hamilton *et al.*, 1978; Neu y Fu, 1978; Perea *et al.*, 1978). En términos generales, las 60 especies de *Bacteroides* estudiadas presentaron una marcada resistencia a algunos de los antibióticos beta-lactámicos probados, como cefaclor, cefadroxil, cefalotina, cefamandol, cefoperazona, cefsulodin, cefotaxime y cefuroxima (Tabla III).

Algunos autores consideran que los antibióticos beta-lactámicos son poco eficaces frente a la mayoría de las cepas de *B. fragilis* que se aíslan de muestras clínicas distintas de las procedentes de la cavidad oral y estructuras relacionadas (Leung y Williams, 1978). Estas resistencias pueden estar asociadas a la incapa-

cidad del antibiótico para penetrar en la célula bacteriana a fin de encontrar el sitio de acción que está localizado a nivel de la membrana interna (Darland y Birnbaum, 1977; Richmond, 1979) o también a la producción de un enzima inactivante de dichos antibióticos denominado beta-lactamasa, que permanece en el espacio periplásmico (Sykes y Mattew, 1976; Leung y Williams, 1978; Brook *et al.*, 1980). El porcentaje de aislamiento de *Bacteroides* productores de beta-lactamasa en muestras clínicas es elevado, lo cual apunta hacia esta posibilidad como causa más probable, si bien no la única, de resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en general. Nuestros resultados muestran que el 83% de los *Bacteroides* estudiados son productores de este enzima inactivante, datos similares a los obtenidos por Weirinch y Del Bene (1976), Leung y Williams (1978), Olsson *et al.*, (1979) y Brook *et al.*, (1980), los cuales han comunicado que un 90, 81, 80 y 85% respectivamente de *Bacteroides* aislados en muestras clínicas, son productores de algún tipo de beta-lactamasa.

El método utilizado para la detección de este enzima fué en todos los casos anteriormente descritos, al

igual que en nuestro estudio, el desarrollado por O'Callaghan *et al.*, (1972) en el que se utiliza la Cefalosporina Cromogénica como sustrato de la reacción enzimática, ya que ha sido considerado como el procedimiento más sensible y de uso fácil para la realización de este ensayo en bacilos Gram negativos (Sykes y Mattew, 1976).

Las cepas de *B. fragilis* objeto del presente estudio, se pueden desdoblar en dos bloques: los productores de beta-lactamasa y los no productores de dicho enzima. La actividad *in vitro* de los beta-lactámicos frente a ellos, muestra claras diferencias de sensibilidad (Tablas IV y V). Para la mayoría de los 11 antibióticos beta-lactámicos estudiados, el grupo de *Bacteroides* productores de beta-lactamasa presenta mayor resistencia a los mismos que los no productores, resistencia que se manifiesta claramente en una diferencia de CMI de al menos dos unidades de dilución, para cualqquiera de los antibióticos probados y en ambos medios de cultivo (Tablas IV y V). Aparentemente, se podrían atribuir estas diferencias únicamente a la presencia o ausencia del enzima inactivante, propiedad que juega

sin duda un papel muy importante en la resistencia a dichos antibióticos, pero es posible que otros factores, tales como las características de difusión del sustrato a través de la membrana externa de la célula tengan también su importancia (Boman *et al.*, 1974).

A pesar de que las cepas de *B. fragilis* no productoras de beta-lactamasa fueron más sensibles a la acción de los beta-lactámicos que las cepas productoras, sin embargo las concentraciones requeridas para su inhibición fueron en algunos casos superiores a las esperadas, hecho que podría ser atribuido a la imposibilidad del antibiótico de penetrar hasta los lugares de acción, por la disminución de permeabilidad de las capas más externas de la bacteria a dichos antibióticos (Boman *et al.*, 1974; Sykes y Matthew, 1976). Además de esto, dentro del grupo de *Bacteroides* productores de enzima, no existe uniformidad alguna respecto de la cantidad y tipo de beta-lactamasa producida. En este grupo coexisten desde bajoproductores hasta superproductores del enzima, con lo que las diferencias en sensibilidad serían aún mayores si se atendiera a clasificar a este grupo en subgrupos, en base a los

criterios aludidos anteriormente. Sin embargo, seguimos pensando que de mayor importancia a la hora de evaluar estas diferencias en sensibilidad, era la presencia o ausencia del enzima beta-láctamasa, hecho asumido también por diversos autores (Weinrich y Del Bene, 1976; Darland y Birnbaum, 1977; Olsson *et al.*, 1979).

La determinación del peso molecular de un plásmido se puede llevar a cabo por diversos métodos, entre los que se encuentran aquellos basados en la movilidad de los mismos en gel de agarosa y los que se apoyan en mediciones efectuadas a nivel de microscopio electrónico. Respecto a los métodos que se basan en las propiedades de movilidad electroforética del ADN, algunos autores como Meyers *et al.*, (1976) y Willshaw *et al.*, (1979), utilizando ADN semipurificado proveniente de plásmidos de peso molecular conocido, han establecido que el rango de migración de los mismos en gel de agarosa al 0,75%, a 120 V y 60 mA, es inversamente proporcional al logaritmo de su masa cuando su peso molecular variaba desde 1,8 hasta 80×10^6 d. Macrina *et al.*, (1978), mediante purificación de los plásmidos presentados por *E. coli* V 517 en gradiente de

CICs, estimaron que existía una buena correlación entre la movilidad relativa de estos en gel de agarosa al 0,8% y su peso molecular, cuando se efectuaba la electroforesis a 30 mA y 90 V durante 2,30 horas. Todos estos autores asumen que la detección de plásmidos de ADN por electroforesis en gel de agarosa es un método muy sensible, no requiere tratamiento con radioisótopos ni ultracentrifugación y los resultados son comparables a las medidas obtenidas por microscopía electrónica. Partiendo de esta base y apoyándonos en trabajos previos (Eckhardt, 1978; Palomares, 1979), desarrollamos un método que nos permitiera la detección y estimación del peso molecular de plásmidos de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, partiendo de ADN sin purificar.

Los resultados muestran que son posibles ambas de terminaciones y que para unas condiciones precisas, existe una buena correlación entre plásmidos que difieren en un rango amplio de pesos moleculares (0,4 hasta 116×10^6 d) (Figura 7). El método muestra además una buena resolución y a pesar de que el ADN cromosómico aparece frecuentemente fraccionado, ya que la lisis de la bacteria se efectuaba sobre el gel mismo y en

las condiciones descritas previamente, no interfiere de forma apreciable en la movilidad de los plásmidos en el gel. Debido a que es un método fácil de efectuar y particularmente rápido, permitía la estimación repetitiva del peso molecular de los plásmidos portados por *Bacteroides*. De esta forma, la medición final obtenida era consecuencia del ajuste de varias estimaciones efectuadas con el mismo plásmido y el mismo control de pesos moleculares.

De los 60 *Bacteroides* aislados por nosotros de muestras clínicas, 9 de ellos eran portadores de plásmidos, lo que representa un 15% del total, 7 de los cuales eran *B. fragilis* y los dos restantes, *B. vulgatus*. Wallace *et al.*, (1981), encontraron que de 32 cepas de *B. fragilis* aisladas de muestras clínicas, 8 contenían plásmidos (25%), siendo 7 de ellas *B. fragilis* y la restante *B. distasonis*. No se encontraron en la bibliografía consultada otros datos sobre porcentaje de *Bacteroides* conteniendo factores extracromosómicos; sin embargo parece claro que *B. fragilis* es el componente de este grupo de bacterias anaerobias donde se presentan plásmidos con más frecuencia. Los pesos molecula-

res de estos plásmidos son generalmente bajos (entre 1,6 y 5×10^6 d), aunque se han descrito algunos hasta de 20, 27 y 32×10^6 d (Stiffler *et al.*, 1974; Tally *et al.*, 1979; Welch *et al.*, 1979(a); Welch *et al.*, 1979(b); Macrina *et al.*, 1981; Butler, comunicación personal).

El rango de pesos moleculares mostrado por los plásmidos encontrados por nosotros variaba desde 3,7 hasta 20×10^6 d, como se puede apreciar en la Tabla VI, los cuales entran en el margen de pesos moleculares apreciado por esos autores. Dos de ellos, ambos presentes en *B. fragilis* A 140 y *B. fragilis* A 108, de 17 (pSEa 3) y 3,7 (pSEa 4) Md respectivamente, nunca habían sido descritos en trabajos anteriores. Naturalmente y como será discutido con posterioridad, el hecho de que algunos de los plásmidos estudiados en esta Tesis coincidan en peso molecular con otros descritos en la bibliografía existente, no indica un origen común de los mismos ni, posiblemente, una analogía genética ni estructural.

Según Iobe y Mitsuhasi (1977), los plásmidos auto

transferibles poseen pesos moleculares que oscilan entre 20 y 100×10^6 d, mientras que los plásmidos que carecen de esta capacidad tendrían unos pesos moleculares comprendidos entre 2 y 10×10^6 d. La mayoría de los plásmidos encontrados por nosotros en cepas de *Bacteroides* poseen un peso molecular que les incluiría en el segundo grupo de los descritos (Tabla VI); sin embargo, el hecho de que algunos plásmidos de peso molecular bajo (pSEa 2 y pSEa 4) vayan acompañados en la misma bacteria por otros de mayor tamaño y por tanto con mayor probabilidad de autotransferibilidad, hace pensar que sean estos últimos los que ayudarían a aquellos para su movilización (Mallamy y Tally, 1981).

Con el fin de diferenciar los plásmidos encontrados en *Bacteroides*, se realizó el análisis de los mismos mediante enzimas de restricción. A pesar de que no fué posible diferenciar físicamente a través de esta técnica los plásmidos de bajo peso molecular (pSEa 2 y pSEa 4), si lo fué en el caso de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 3 (Figuras 25, 26, 27 y 28). El hecho de que pSEa 1 y pSEa 3 presenten patrones de restricción diferentes, implica que portan secuencias nucleotídicas

distintas, ya que las enzimas de restricción son específicas para la digestión del ADN solo en regiones determinadas del mismo (Grinsted *et al.*, 1977; Carlton y Brown, 1979; New England Biolabs, Inc., 1981/82). Por tanto, podemos deducir que además de su movilidad electroforética (Figuras 11, 12 y 13), dichos plásmidos difieren al menos en ciertas secuencias nucleotídicas, detectadas mediante la utilización de estas enzimas de restricción.

Otras características que permiten diferenciar los plásmidos encontrados en las cepas de *B. fragilis* objeto del presente estudio, son sus propiedades de transferencia y expresión fenotípica en el huésped. Respecto a la transferencia por conjugación de plásmidos presentes en cepas de *B. fragilis* aisladas de muestras clínicas, ha sido un tema muy cuestionado hasta hace pocos años. Algunos autores pensaban que este proceso era poco probable *in vitro* y consecuentemente *in vivo*; argumentaron para ello que las condiciones de anaerobiosis en las que se desarrollan normalmente estas bacterias, serían un obstáculo insalvable para llevar a cabo dicho proceso (Burt y Woods, 1976; Del Bene *et al.*,

1976). Fueron Macrina y Kopeko (1979), Tally *et al.*, (1979) y Welch *et al.*, (1979), quienes demostraron la capacidad de cepas de *B. fragilis* de transferir factores extracromosómicos inter e intraespecíficamente. Se comprobó también que la cinética de transmisión de plásmidos conjugativos en cepas de *B. fragilis*, del mismo modo que en otras bacterias, tanto aerobias como anaerobias, se aproxima a un modelo de acción de masas (Levin *et al.*, 1979; Tally *et al.*, 1979).

En términos generales, las frecuencias de transmisión de estos factores extracromosómicos presentes en cepas de *B. fragilis*, a menudo factores R, estaban comprendidas entre 10^{-6} y 10^{-8} para el plásmido pBFTM 10 que se encuentra en *B. fragilis* TMP 10 y que confiere resistencia a clindamicina, cuando utilizaron como receptora, la cepa de *B. fragilis* TM 4000. La frecuencia de transferencia del mismo plásmido a *B. fragilis* TM 4500 fué de 10^{-8} . Macrina *et al.*, (1981) describen frecuencias similares para los cruces interespecíficos entre *B. fragilis* portador del plásmido pBF 4, con determinantes genéticos para la resistencia a clindamicina, lincomicina y eritromicina, y *B. uniformis*, sien-

do estas de 1×10^{-6} a $5,3 \times 10^{-7}$; de la misma forma que Welch *et al.*, (1979) y Wallace *et al.*, (1981). Nuestros resultados muestran que las frecuencias de transferencia intraespecíficas para los plásmidos pSEa 3 y pSEa 4, cuando la selección de transconjugantes se efectuaba con tetraciclina, son similares a las obtenidas por otros autores para otros plásmidos, estando comprendidas entre $1,9$ y $2,2 \times 10^{-6}$ (Tablas IX y X). Las frecuencias de transferencia intergenéricas obtenidas con *B. vulgatus* A 182 y *B. fragilis* A 107 como bacterias donadoras y *E. coli* K-12 E 711 como receptor, están comprendidas entre 2 y $2,7 \times 10^{-7}$, cuando la selección de transconjugantes se realizó con Am o C₄ y en aerobiosis, transfiriéndose en ambos casos los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2, de 20 y 4×10^6 d respectivamente (Tablas VII y VIII).

Parece evidente, al menos en los pocos trabajos realizados hasta ahora y en los estudios llevados a cabo por nosotros, que los plásmidos de *B. fragilis* se transfieren a baja frecuencia, tanto intra como interespecíficamente. Esto no ocurre con otras bacterias anaerobias tales como *B. ochraceus*, cuya fre-

cuencia de transferencia de factores R a *E. coli* es de 1 a 4×10^{-4} (Guiney y Davis, 1978); sin embargo, Smith *et al.*, (1981) obtuvieron frecuencias de 2 a 4×10^{-7} al transferir por conjugación los plásmidos presentes en *Clostridium difficile* a otras cepas de la misma especie carentes de plásmidos.

B. vulgatus A 182 y *B. fragilis* A 107 transfirieron a *E. coli* K-12 E 711 los dos plásmidos presentes en ellas (pSEa 1 y pSEa 2) y esta bacteria manifestó simultáneamente la resistencia a Am, Cf y Ctx. Los datos expuestos en las Tablas VII y VIII inducen a pensar que es necesario un contacto célula a célula para la transferencia de estos factores extracromosómicos y resistencias a *E. coli*, ya que en ambos casos, utilizando filtrados libres de células donadoras, tratados y sin tratar con cloroformo, no se detectó la presencia de transconjugantes. Paralelamente, la transferencia de los plásmidos pSEa 3 y pSEa 4 y la resistencia a Tc desde *B. fragilis* A 140 y *B. fragilis* A 108 hasta *B. fragilis* TM 4000, requirió también del contacto célula a célula, lo que indica que para estas bacterias y en nuestras condiciones experimentales, el

proceso de conjugación es la forma más común de transferencia de material genético, aunque puede que no sea la única. Guiney y Davis (1978), Welch *et al.*, (1979), Macrina *et al.*, (1981) y Smith *et al.*, (1981), han demostrado también la necesidad de contacto célula a célula para que se lleven a cabo los procesos de transferencia de material genético en este tipo de bacterias.

Los plásmidos encontrados en las cinco cepas restantes de *B. fragilis*, no pudieron ser transferidos por conjugación ni a *E. coli* K-12 E 711 ni a *B. fragilis* TM 4000. Cuatro de ellos eran de peso molecular bajo (4×10^6 d), por lo que suponemos que carecerían de los genes *tra* que confieren la capacidad de autotransferencia (Tabla VI) (Iobe y Mitsuhasi, 1977). Stiffler *et al.*, (1974) y Wallace *et al.*, (1981) no lograron la transferencia por conjugación de plásmidos de peso molecular bajo ($1,6$ a 5×10^6 d), argumentando para la ocurrencia de este suceso, entre otras razones, que podían haberse transferido pero no expresado en el recombinante o bien que las nucleasas de la bacteria receptora pudieran haber digerido el ADN donado. El plásmido restante, residente en *B. fragilis* A 138 (pSEa 5)

podría ser transferible, pero el método de selección de los transconjugantes no nos permitió detectarlo. O bien, existiría algún tipo de impedimento para su transferencia como los expuestos anteriormente.

No existe evidencia clara que nos lleve a suponer que los plásmidos pSEa 3 y pSEa 4 codifican para la producción del enzima beta-lactamasa, puesto que no se ha podido poner de manifiesto esta propiedad en los transconjugantes obtenidos; pero si parece que estén implicados de alguna forma en la resistencia a tetraciclina de los mismos, ya que es el único marcador presente en las células donadoras que se manifestó claramente en las células transconjugantes (Tablas IX y X). Por el contrario, los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 parecen estar implicados en la resistencia a antibióticos beta-lactámicos, puesto que los marcadores transferidos a las células receptoras desde las especies de *Bacteroides* portadoras de dichos plásmidos, junto con ellos, eran Am, C_f y C_{tx}. Además, estas resistencias eran transferidas en bloque en los cruces secundarios efectuados con *E. coli* K-12 E 711 como bacteria donadora y *E. coli* H_fh H como bacteria receptora, así co-

mo la producción del enzima beta-lactamasa en las células transconjugantes obtenidas de dicho cruce. Otras pruebas a favor de la hipótesis mencionada más arriba serán discutidas con posterioridad.

Existe una gran variedad de agentes químicos tales como compuestos de *acrídina*, *BrEt*, *SDS* y *novobiocina*, así como el crecimiento a temperaturas elevadas, que son capaces de liberar o *curar* de plásmidos de ADN a las células portadoras de ellos (Novick, 1969; Nakamura, 1975; Hanh y Ciak, 1976; Hill y Carlisle, 1981). Estos plásmidos, que pueden existir como moléculas de ADN que se replican autónomamente, pueden ser eliminados en algunos casos por estos agentes, bien por interferir con su replicación (*acrídnas*, *BrEt* y *novobiocina*) o por alteración de los lugares de anclaje en la membrana de la célula huésped (*SDS* y temperaturas elevadas) (Novick, 1969). Los estudios sobre eliminación de plásmidos de ADN mediante tratamiento con estos agentes han sido escasos en bacterias anaerobias, sobre todo en *B. fragilis*. Wallace *et al.*, (1981) utilizaron *naranja de acridina*, *Rif* y *SDS* como agentes eli

minadores de los plásmidos portados por *B. fragilis* y *B. distasonis*, pero no tuvieron éxito en su propósito. Las concentraciones usadas de cada agente fueron de 25 µg/ml, 0,025% y 2,5 µg/ml respectivamente.

Para nuestros estudios empleamos BrEt como agente eliminador perteneciente al primer grupo de los descritos arriba y SDS y temperaturas elevadas, incluidos en el segundo grupo de agentes lavadores de plásmidos. Las concentraciones elegidas como óptimas a utilizar en experimentos posteriores, por no interferir con el crecimiento de las bacterias estudiadas, se detallan en el apartado de Resultados (Gráficas 14 a 21). Los resultados expuestos en las Tablas XI a XVII indican que *B. vulgatus* A 182 es más susceptible a la acción de los agentes lavadores probados que las tres estirpes restantes de *B. fragilis*, diferencias ligadas quizá al carácter de especie. En términos generales, se puede observar que ninguno de los agentes eliminadores de plásmidos empleados por nosotros, fueron capaces de eliminar los plásmidos portados por estas especies de *Bacteroides*. Sin embargo, se apreció una pérdida en la capacidad de resistencia a Am, acompaña

da siempre de la incapacidad para la producción del enzima beta-lactamasa en *B. fragilis* A 107 y sobre todo, en *B. vulgatus* A 182 . Estos resultados podrían ser explicados suponiendo que la producción de beta-lactamasa estuviese codificada por un gen presente en alguno de los dos plásmidos portados por ambas especies de *Bacteroides* , en términos de un descenso en el número de copias de uno, otro o ámbos plásmidos, lo que llevaría a una disminución de la producción de dicha enzima y por tanto, de la resistencia a *Am* como antibiótico representativo de la familia de los beta-lactámicos. Hill y Carlisle (1981) encontraron que el tratamiento de estirpes enteropatógenas de *E. coli* con SDS e incubación a temperaturas elevadas, si bien no permitía la pérdida de los plásmidos portados por estas bacterias, disminuía su enteropatogenicidad, argumentando una drástica disminución en el número de copias del plásmido responsable de la producción de dicha enterotoxina. Otra explicación posible de los resultados obtenidos por nosotros en el tratamiento de *B. fragilis* A 107 y *B. vulgatus* A 182 con los agentes eliminadores de plásmidos anteriormente descritos, sería la aparición de una mutación en el gen responsa

ble de la producción del enzima beta-lactamasa, que podría encontrarse en alguno de los plásmidos, lo cual conduciría a la misma explicación aducida anteriormente, aunque lo más probable es que estos plásmidos no estén relacionados con la resistencia a beta-lactámicos en estas estirpes, al menos de forma directa, como luego se discutirá más ampliamente.

B. fragilis A 140 y *B. fragilis* A 108 no experimentaron pérdida en su capacidad de resistencia a Tc con ninguno de los tratamientos aplicados. Tampoco se pudo observar la pérdida de alguno de los plásmidos portados por las mismas, por lo que pensamos que serán necesarios estudios genéticos posteriores basados en experimentos de transformación y transducción con ambos plásmidos, los cuales permitirán el esclarecimiento de la localización de los determinantes genéticos de resistencia a Tc en uno u otro plásmido, o bien en el cromosoma.

Un punto que llamaba poderosamente la atención fué que en los ensayos previos de producción del enzima beta-lactamasa por los transconjugantes obtenidos

de los cruces *B. vulgatus* A 182 ó *B. fragilis* A 107 con *E. coli* K-12 E 711, demostraban una superproducción de este enzima por dichas bacterias. La transferencia de resistencia a antibióticos beta-lactámicos junto con la producción de dicho enzima y la presencia de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 en las cepas transconjugantes, llevaron a pensar que los determinantes genéticos de la resistencia a estos antibióticos podrían residir en alguno de los dos plásmidos transferidos. Por otra parte, la cepa receptora *E. coli* K-12 E 711 no producía cantidades detectables de beta-lactamasa utilizando el método de la Cefalosporina Cromogénica, por lo que se procedió al estudio de las enzimas mediante una técnica más sensible, a fin de determinar las características bioquímicas de las mismas y establecer de esta manera, analogías o diferencias entre ellas. Esta técnica permitió apreciar que a pesar del factor de cripticidad presentado por *E. coli* K-12 E 711, definido como el cociente entre la actividad enzimática específica de células rotas y la actividad enzimática específica de células enteras (Sykes y Matthew, 1976), existía una diferencia significativa en

la cantidad de enzima producida por la estirpe receptora original y los transconjugantes obtenidos (Figura 23). Además, este enzima presentó un punto isoeléctrico idéntico en ambos casos ($pI=8,1$), en los transconjugantes obtenidos cuando se utilizó *B. fragilis* A 107 como célula donadora y aquellos detectados cuando actuó *B. vulgatus* A 182 como bacteria donadora, lo cual induce a pensar que se trata de la misma beta-lactamasa.

Respecto a las características isoeléctricas de las beta-lactamasas producidas por *Bacteroides*, nuestros resultados indican que *B. vulgatus* A 182 produce una beta-lactamasa con pI de 4,9, mientras que *B. fragilis* A 107 produce dos tipos distintos de este enzima, uno de pI de 4,7 y otro de 4,9 (Figura 23). Otros autores han comunicado la presencia en *B. fragilis* de beta-lactamasas con puntos isoeléctricos de 7,4 y 8,0 (Sykes y Mattew, 1976), mientras que Sato *et al.*, (1980) observaron un pI de 5,2 en la beta-lactamasa producida por una estirpe de esta bacteria anaerobia. Olsson-Liljequist *et al.*, (1980) y Leung y Williams, (1980) han descrito beta-lactamasas con pI de 4,9 en

tres estirpes de *Bacteroides fragilis* aisladas de muestras clínicas.

Debido a estas características isoeléctricas del enzima expuestas anteriormente y apoyándonos en las diferencias en cuanto al punto isoeléctrico mostrado por las enzimas de las cepas donadoras de *B. fragilis* y las de las cepas de *E. coli* K-12 E 711 receptora y transconjugantes, se puede pensar que dichas enzimas estarían codificadas por un gen que se encontraría localizado en el cromosoma de estas bacterias, teoría defendida por muchos autores (O'Callaghan *et al.*, 1968; Sykes y Mattew, 1976; Weinrich y Del Bene, 1976; Leung y Williams, 1978; Britz y Wilkinson, 1978; Olsson *et al.*, 1979; Brook *et al.*, 1980; Olsson-Liljequist *et al.*, 1980; Pechère *et al.*, 1980; Sato *et al.*, 1980).

A pesar de que nuestros resultados sugerían que probablemente ninguno de los plásmidos transferidos a *E. coli* K-12 E 711 (pSEa 1 y pSEa 2) portaba los genes que codifican la producción de beta-lactamasa, ya que de otra manera sería previsible detectarlo en los transconjugantes y eso no sucedía realmente, parecía claro

que dichos plásmidos jugaban un papel muy importante en dicha superproducción de enzima por parte de los transconjugantes.

Según Burman *et al.*, (1973), *E. coli* K-12 E 711 produce pequeñas cantidades de una beta-lactamasa codificada por el gen *amp C* que se encuentra localizado en el cromosoma de dicha bacteria. La actividad de este enzima es tan baja, que no contribuye al nivel de resistencia de estas células a los antibióticos beta-lactámicos (Lindstrom y Nordstrom, 1972). No obstante, se han podido aislar mutantes resistentes, los cuales producen grandes cantidades de este tipo de beta-lactamasa (Bertani, 1954; Boman *et al.*, 1974). La mutación en el gen regulador *amp A*, denominada *amp A1*, conduce a un incremento de la producción de este enzima de alrededor de 10 veces (Lindstrom y Nordstrom, 1972). Esta mutación ha sido mapeada y se encuentra muy cerca del gen estructural para la producción de la beta-lactamasa cromosómica, denominado *amp C* (Bergstrom y Normark, 1979). Siendo la frecuencia de mutación espontánea para *Am* en *E. coli* K-12 E 711 inferior a 10^{-8}

y teniendo en cuenta las frecuencias de conjugación y de transferencia de resistencia a beta-lactámicos obtenidas por nosotros (Tablas VII y VIII), no pensamos que la resistencia observada en las bacterias transconjugantes portadoras de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 frente a dichos antibióticos, sea consecuencia directa de una mutación espontánea en el gen *amp A* de *E. coli* K-12 E 711, que provocaría el aumento referido de la producción de beta-lactamasa. No obstante, admitimos la posibilidad de mutación en dicho(s) gen(es) pero expresada en términos diferentes, como a continuación discutiremos.

El papel que juegan muchos plásmidos en el metabolismo de la célula huésped es bastante conocido por todos (Chernin y Mikoyan, 1981) y se sabe que algunos de ellos poseen un efecto mutagénico en las células que los contienen (Howarth, 1965; Howarth, 1966; Novick *et al.*, 1976). Estos datos servirían de apoyo para postular que la función de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 (o alguno de ellos) consistiría en producir una mutación *amp A1* o análoga, que originaría la superproducción de la beta-lactamasa cromosómica en los transcon

jugantes mencionados, ya que la presencia de dichos plásmidos en las células huéspedes ha ido acompañada siempre de una elevación de la producción de dicho enzima (Figura 23). Esta acción mutagénica se podría ejercer mediante varios mecanismos, algunos de los cuales pasamos a comentar.

En primer lugar, existe la posibilidad de que uno de los plásmidos pSEa 1 ó pSEa 2, portara la información necesaria para la síntesis de una proteína, cuya función fuera la de bloquear la síntesis del represor del gen estructural *amp C*, represor que está sintetizado por el gen regulador *amp A*. De esta forma, la síntesis del producto del gen *amp C* (el enzima beta-lactamasa) estaría desregulada y se daría una superproducción del mismo. También es posible que la proteína sintetizada por un gen presente en dicho(s) plásmido(s) ejerciera la función de bloquear la molécula represora, producto del gen *amp A*, uniéndose a ella y modificando su estructura de forma tal que impidiera su unión al gen *amp C*, llegándose al mismo resultado que el señalado anteriormente. Hay, sin embargo, otras explicaciones posibles de estos fenómenos si consideramos

la posibilidad de que uno de los plásmidos portara un transposón (Tn) o secuencia de inserción (IS) que al ser transferido(a) a la célula huésped *E. coli* K-12 E 711 por un mecanismo parecido a la conjugación, con o sin intervención directa de un plásmido como vehículo transportador, descrito en *S. faecalis* por Clewel (1981), se integrara en el gen *amp* A del cromosoma bacteriano por un mecanismo semejante al de integración del fago *Mu*, típico de los transposones, con lo que se llegaría a la superproducción de beta-lactamasa comentada con anterioridad (Shapiro, 1977; Starlinger, 1980; Bukhari, 1981). También en *Bacteroides fragilis* se han descubierto mecanismos de resistencia a antibióticos mediados por transposones con características análogas al descrito anteriormente (Butler, comunicación personal).

Todo esto nos conduce al planteamiento de un estudio más exhaustivo de estas posibilidades a través de la utilización de técnicas que ayuden a clarificar, mediante qué mecanismo(os) este(os) plásmido(s) podrían alterar la producción de enzima en las bacterias que los hospedan. Como perspectivas más inmediatas, sería

de mucha utilidad la búsqueda de secuencias análogas entre los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2 y el cromosoma de *E. coli* K-12 E 711 y *E. coli* Hfr H, que se podrían detectar por marcado radioactivo de dichos plásmidos y posterior reasociación con el ADN cromosómico huésped, o bien mediante técnicas de heteroduplex a nivel de microscopio electrónico, que nos daría una visión de las secuencias comunes de ambos ácidos nucleicos, el cromosómico y el plasmídico.

CONCLUSIONES

1. La especie *B. fragilis* es la más frecuentemente aislada entre los microorganismos anaerobios del grupo *fragilis* obtenidos de muestras clínicas, con un 62%. Otras especies pertenecientes al mismo grupo de bacterias aisladas en menor proporción son *B. vulgatus*, (14%), *B. distasonis*, (10%), *B. ovatus*, (9%) y *B. thetaotaomicron*, (5%).
2. La Cromatografía Líquido-Gaseosa (CLG) es la prueba definitiva para la clasificación de estos microorganismos en especies, siendo las pruebas bioquímicas una ayuda complementaria para dicha clasificación.
3. El medio de elección para la realización del antibiograma cuantitativo de estas bacterias anaerobias es el de Wilkins y Chalgren, ya que se obtienen resultados comparables con los de Brucella Agar y no está suplementado con sangre, factor que influiría de algún modo en la fiabilidad del antibiograma.

4. De los 16 antibióticos utilizados para la realización del antibiograma cuantitativo de las bacterias pertenecientes al grupo *B. fragilis*, el más activo fué clindamicina, ya que inhibió al 90% de las cepas a una concentración de 0,25 µg/ml.

5. Los antibióticos más utilizados para el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias anaerobias vienen siendo tradicionalmente los pertenecientes al grupo de los beta-lactámicos, para los que se ha encontrado un alto grado de resistencia, debida principalmente a la producción de beta-lactamasa por el 83% de las cepas de *B. fragilis* estudiadas.

6. *B. fragilis* presenta la mayor frecuencia de plásmidos, detectados por electroforesis en gel de agarosa, de todas las especies estudiadas, siendo estos de peso molecular generalmente bajo, entre 3,7 y 20 Md.

7. Se demuestra en este trabajo, la posibilidad de transferencia de plásmidos entre especies aerobias y anaerobias en condiciones de anaerobiosis, con frecuencias

que variaron entre $1,9 \times 10^{-6}$ y $2,7 \times 10^{-7}$, no siendo por tanto dichas condiciones un obstáculo para la transferencia, sino más bien las características propias de cada microorganismo.

8. La transferencia de plásmidos era intergenérica en el caso de *B. fragilis* A 182 y A 107 (a *E. coli* K-12 E 711) pero no intraespecífica, mientras que *B. fragilis* A 140 y A108 transferían sus plásmidos únicamente a bacterias de su propia especie (*B. fragilis* TM 4000).
9. Los plásmidos transferidos en estos casos fueron pSEa 1 y pSEa 2, que conferían la capacidad de producción de beta-lactamasa (y resistencia a Am, Cf y Ctx) y pSEa 3 y pSEa 4, que conferían la capacidad de resistencia a Tc.
10. El proceso de transferencia genética entre estas bacterias fué la conjugación o mecanismo similar, ya que se demostró que no se trataba de transformación ni transducción, que serían los otros mecanismos posibles para tal transferencia.

11. En el caso de la transferencia de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2, se demostró que la resistencia a beta-lactámicos transferida por conjugación era debida a un incremento considerable de la producción del enzima beta-lactamasa por las cepas transconjugantes.
12. El (los) gen (es) implicado (s) en la síntesis de beta-lactamasa, como se demuestra por la técnica de electroenfoque, no se encuentra en los plásmidos transferidos, sino en el cromosoma de la propia bacteria receptora.
13. El efecto de los plásmidos pSEa 1 y pSEa 2, por tanto, sería afectar la expresión de este (os) gen (es) implicados en la producción de beta-lactamasa, mediante su desregulación o mutación.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, J.D., GILLESPIE, W.A. y RICHMOND, M.H.:
Chemotherapy and antibiotic-resistance transfer between Enterobacteria in the human gastro-intestinal tract. J. Med. Microbiol., 6, 461, 1973.
- ANDERSON, J.D.: *Factors that may prevent transfer of antibiotic resistance between Gram-negative bacteria in the gut.* J. Med. Microbiol., 8, 83, 1975.
- ANDERSON, E.S., HUMPHREYS, G.D. y WILLSHAW, G.A.:
The molecular relatedness of R Factors in Enterobacteria of human and animal origin. J. Gen. Microbiol., 91, 376, 1975.
- BACH, V.T., KHURANA, M.M. y THADEPALLI, H.: *In vitro activity of cefaclor against aerobic and anaerobic bacteria.* Antimicrob. Agents Chemother., 13, 210, 1978.
- BARTLETT, J.G.: *Anaerobios: puesta al día.* Simposium sobre anaerobios. Organizado por Merck Sharp & Dohme International, 1980.

BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C. y TURCK, M.:
Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Ann. J. Clin. Path., 45, 493, 1966.

BERGSTROM, S. y NORMARK, S.: *Beta-lactam resistance in clinical isolates of E. coli caused by elevated production of the amp C-mediated chromosomal beta-lactamase.* Antimicrob. Agents Chemother., 16 (4), 427, 1979.

BERTANI, G.: *Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic E. coli.* J. Bacteriol., 62, 293, 1951.

BOMAN, H.G., NORDSTROM, K. y NORMARK, S.: *Penicillin resistance in E. coli K-12; synergism between penicillinases and a barrier in the outer part of the envelope.* Ann. New York Acad. Sci., 235, 569, 1974.

BREFORT, G., MAGOT, M., IONESCO, H. y SEBALD, M.: *Characterization and transferability of C. perfringens plasmids.* Plasmid, 1, 52, 1977.

BRITZ, M.L. y WILKINSON, R.G.: *Purification and properties of beta-lactamase from B. fragilis.* Antimicrob. Agents

Chemother., 13 (3), 373, 1978.

BROOK, I., CALHOUN, L. y YOCUM, P.: *Beta-lactamase-producing isolates of B. fragilis species from children.* *Anti-microb. Agents Chemother.*, 18 (1), 164, 1980.

BUKHARI, A.I.: *Models of DNA transposition.* *TIBS*, 56, 1981.

BURMAN, L.G., PARK, J.T., LINDSTROM, E.B. y BOMAN, H.G.: *Resistance of E. coli to penicillins. X. Identification of the structural gene for the chromosomal penicillinase.* *J. Bacteriol.*, 116, 123, 1973.

BURT, S.J. y WOODS, D.R.: *R factor transfer to obligate anaerobes from E. coli.* *J. Gen. Microbiol.*, 93, 405, 1976.

CARLTON, B.C. y BROWM, B.J.: *Physical mapping of a plasmid from B. megaterium by endonuclease cleavage.* *Plasmid*, 2 (1), 59, 1979.

CLEWELL, D.B.: *Plasmids, drug resistance and gene transfer in the genus Streptococcus.* *Microbiol. Rev.*, 45 (3), 409, 1981.

CORNELIS, G., BENNETT, P.M. y GRINSTED, J.: *Properties of*

pGC1, a lac plasmid originating in *Y. enterocolitica* 842. *J. Bacteriol.*, 127, 1058, 1976.

CHERNIN, L.S. y MIKOYAN, V.S.: Effects of plasmids on chromosome metabolism in bacteria. *Plasmid*, 6, 119, 1981.

CHOW, A.W. y BEDNORZ, D.: Comparative in vitro activity of new cephalosporins against anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14, 668, 1978.

DARLAND, G. y BIRNBAUM, J.: Cefoxitin resistance to beta-lactamases: a major factor for susceptibility of *B. fragilis* to the antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 11, 725, 1977.

DATTA, N., FAIERS, M.C., REEVES, D.S., BRUMFITT, W., ORSKOV, F. y OESKOV, I.: R-Factors in *E. coli* in faeces after oral chemotherapy in general practice. *Lancet*, I, 312, 1971.

DATTA, N.: Classification of plasmids as an aid to understanding their epidemiology and evolution. *J. Antimicrob. Chemother.*, 3, 19, 1977.

DEL BENE, V.E.; ROGERS, M. y FARRAR, W.E.: *Attempted transfer of antibiotic resistance between Bacteroides and E. coli*. J. Gen. Microbiol., 92, 384, 1976.

DRASSAR, B.S.: *Some factors associated with geographical variations in the intestinal microflora*. The Normal Microbial Flora of Man. Ed. Academic Press, London, 1974.

ECKHARDT, T.: *A rapid method for the identification of plasmid DNA in bacteria*. Plasmid, 1, 584, 1978.

ERICSSON, H.M. y SHERRIS, J.C.: *Antibiotic sensitivity testing-report of an international collaborative study*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, Suppl. 217, 1971.

FINEGOLD, S.M.: *Anaerobic Bacteria in Human Disease*. Ed. Acad. Press, New York, 1977.

GORBACH, S.L. y BARTLETT, J.G.: *Medical progress: anaerobic infections*. New England J. of Med., 290, 1177, 1974.

GORBACH, S.L. y TALLY, F.P.: *Anaerobios: puesta al día*. Simposium sobre anaerobios. Organizado por Merck Sharp & Dohme International, 1980.

GRINSTED, J., BENNETT, P.M. y RICHMOND, M.H.: A restric
tion enzyme map of R-plasmid RP1. *Plasmid*, 1, 34, 1977.

GUINEY, D.G. y DAVIS, CH.E.: Identif
ication of a conjuga
tive R plasmid in *B. ochraceus* capable of transfer to
E. coli. *Nature*, 274, 181, 1978.

HAHN, F.E. y CIAK, J.: Elimination of resistance determi
nants from R-factor R1 by intercalative compounds. *Anti*
microb. Agents Chemother., 9 (1), 77, 1976.

HAMILTON-MILLER, J.M., BRUMFITT, W. y REYNOLDS, A.V.: Ce
foxime [HR 756] a new cephalosporin with exceptional
broad-spectrum activity in vitro. *J. Antimicrob. Chemo*
ther., 4, 437, 1978.

HENDERSON, D.K., CHOW, A.W. y GUZE, L.B.: Comparative sus
ceptibility of anaerobic bacteria to ticarcillin, cefoxi
lin, metronidazole and related antimicrobial agents. *Anti*
microb. Agents Chemother., 11 (4), 679, 1977.

HILL, W.E. y CARLISLE, CH.L.: Loss of plasmids during en
richment for *E. coli*. *Appl. Envir. Microbiol.*, 41 (4),
1046, 1981.

HOLDEMAN, L.V. y MOORE, W.E.C.: *Anaerobe laboratory manual*. Virginia Polytechnic Institute. ND State University Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Va., USA, ed. 1975.

HOLDEMAN, L.V. GOOD, I.J. y MOORE, W.E.C.: *Human faecal flora: variation in bacterial composition within individuals and a possible effect of emotional stress*. *App. Envir. Microbiol.*, 31, 259, 1976.

HOWARTH, S.: *Resistance to the bacteriocidal effect of ultraviolet radiation conferred on Enterobacteriaceae by the colicin factor*. *J. Gen. Microbiol.*, 40, 43, 1965.

HOWARTH, S.: *Increase in the frequency of ultraviolet-induced mutation brought about by the colicin factor col I in S. typhimurium*. *Mutat. Res.*, 3, 129, 1966.

IOBE, S. y MITSUHASHI, S.: *Genetic and biomolecular properties of R plasmids. R factor: drug resistance plasmid*. Ed. University Park Press, Tokyo, 1977.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L. y ADELBERG, E.A.: *Manual de Microbiología Médica*. Ed. Manual Moderno, México, 1978.

JONES, R.N., FUCHS, P.C., GAVAN, T.L., GERLACH, E.H., BARRY, A.L. y THORNSBERRY, C.: Cefuroxime, a new parental cephalosporine: collaborative *in vitro* susceptibility comparison with cephalotin against 5887 clinical bacterial isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13, 47, 1977.

KAGAN, B.H.: *Antimicrobial therapy*. 2nd edition. W. B. Saunders Company, Philadelphia, 1974.

KISLAK, J.W.: The susceptibility of *B. fragilis* to 24 antibiotics. *J. Infect. Dis.*, 125, 295, 1972.

LEUNG, T. y WILLIAMS, J.D.: Beta-lactamases of subspecies of *B. fragilis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4, 47, 1978.

LEVIN, B.R., STEWART, F.M. y RICE, V.A.: The kinetics of conjugative plasmid transmission: fit of a simple mass action model. *Plasmid*, 2, 247, 1979.

LINDSTROM, E.B. y NORDSTROM, K.: Automated method for determination of penicillins, cephalosporins and penicillinases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1, 100, 1972.

MACRINA, F.L., KOPECKO, D.J., JONES, K.R., AYERS, D.I. y McCOWEN, S.M.: A multiple plasmid-containing *E. coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid*, 1, 417, 1978.

MACRINA, F.L. y KOPECKO, D.J.: Proceedings of the second annual Mid-Atlantic regional extrachromosomal elements meeting. *Plasmid*, 2 (2), 296, 1979.

MACRINA, F.L., MAYS, T.D., SMITH, C.J. y WELCH, R.A.: Non-plasmid associated transfer of antibiotic resistance in *Bacteroides*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8 (D), 77, 1981.

MALLAMY, M.H. y TALLY, F.P.: Mechanisms of drug-resistance transfer in *B. fragilis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 8 (D), 59, 1981.

MARE, I.J.: Incidence of R-factors among Gram-negative bacteria in drug-free human and animals communities. *Nature*, 220, 1046, 1968.

MARTIN, W.J., GARDNER, M. y WASHINGTON II, J.A.: *In vitro* antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria

isolated from clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1, 148, 1972.

MATTEW, M., HARRIS, A.M., MARSHALL, M.J. y ROSS, G. W.:
The use of analytical isoelectric focusing for detection
and identification of beta-lactamases. *J. Gen. Microbiol.*, 88, 169, 1975.

MEYERS, J.A., SANCHEZ, D., ELWELL, L.P. y FALKOW, S.:
Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid DNA. *J. Bacteriol.*, 127 (3), 1529, 1976.

MORENO, M., DAMASO, D., PEREA, E.J., MARCO, M.L. y MANCHADO, P.:
Transmisión de factores de resistencia a los antibióticos entre bacterias: conjugación y transducción. *Antibiot. Quimioter.*, I, 211, 1971.

MOSS, C.W. y DEES, J.B.: Identification of microorganisms by gas-chromatographic-mass spectrometric analysis of cellular fatty acids. *J. Chromatography*, 112, 595, 1975.

NAKAMURA, H., SUGANUMA, A. y GREENBERG, J.: Effect of inorganic phosphate on acridine inhibition and plasmid

curing in *E. coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 91, 45, 1975.

NASTRO, L.J. y FINEGOLD, S.M.: Bactericidal activity of five antimicrobial agents against *B. fragilis*. *J. Infect. Dis.*, 126, 104, 1972.

NEU, H.C. y FU, K.P.: Cefuroxime, a beta-lactamase-resistant cephalosporin with a broad spectrum of Gram-positive and negative activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13, 657, 1978.

NEW ENGLAND BIOLABS, INC. 1981/82.

NORMARK, S. y BURMAN, L.G.: Resistance to penicillins: fine mapping and dominance of chromosomal beta-lactamase mutations. *J. Bacteriol.*, 132, 1, 1977.

NOVICK, R.P.: Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 33 (2), 1969.

NOVICK, R.P.: Bacterial plasmids. *Handbook of Microbiology*. A.I. Laskin and M.A. Lechevalier eds., Vol. 4, CRS Press, Cleveland, Ohio, USA.

NOVICK, R.P., CLOWES, R.C., COHEN, S.H., CURTISS, R. III., DATTA, N. y FALKOW, S.: *Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal*. Bacteriol. Rev., 40, 168, 1976.

O'CALLAGHAN, C.H., MUGGLETON, P.W. y ROSS, G.W.: *Effects of beta-lactamase from Gram-negative organisms on cephalosporins an penicillins*. Antimicrob. Agents Chemother., 1, 57, 1968.

O'CALLAGHAN, C.H., KIRBY, S.M., MORRIS, A. y SHINGLER, A.H.: *Novel method for detection of beta-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate*. Antimicrob. Agents Chemother., 1, 283, 1972.

OLSSON, B. DORNBUSCH, K. y NORD, C.E.: *Factors contributing to resistance to beta-lactam antibiotics in B. fragilis*. Antimicrob. Agents Chemother., 15 (2), 263, 1979.

OLSSON-LILJEQUIST, B., DORNBUSCH, K. y NORD, C.E.: *Characterization of three different beta-lactamases from the B. fragilis group*. Antimicrob. Agents Chemother., 18 (2), 220, 1980.

PALOMARES, J.C.: *Ecología de plásmidos R en el intesti-
no de pacientes con salmonellosis*. Tesis Doctoral, Uni-
versidad de Sevilla, 1979.

PALOMARES, J.C. y PEREA, E.J.: *R plasmid ecology in Sal-
monella in human gut*. Avicenum, Czechoslovak Medical
Press, Prague, 1980.

PECHERE, J.C., GUAY, R., DUBOIS, J. y LETARTE, R.: *Hy-
drolysis of cefotaxime by a beta-lactamase from B. fra-
gilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17, (6), 1001,
1980.

PEREA, E.J., AZNAR, J., GARCIA IGLIAS, M.C. y BORO-
BIO, M.V.: *Cefoxitin sodium activity against anaerobes:
effect of inoculum size, pH variation and different cul-
ture media*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4 (B), 55, 1978.

PRIVITERA, G., DUBLANCHET, A. y SERALD, M.: *Transfer of
multiple antibiotic resistance between subspecies of
B. fragilis*. *J. Infect. Dis.*, 139 (1), 97, 1979.

RICHMOND, M.H.: *R factors in man and his environment*. Mi-
crobiology 1974. Ed. D. Schlessinger. ASM, Washington,

D.C., USA, 1975.

RICHMOND, M.H.: *Resistant E. coli of farm origin and their possible danger to man. Plasmids. Medical and theoretical aspects.* Ed. S. Mitsuhashi, L. Rosival and V. Krčméry. Avicenum. Prague Spainger Verlag, Berlin, Alemania Occidental, 1977.

RICHMOND, M.H.: *Beta-lactam antibiotics and beta-lactamases: two sides of a continuing story.* Rev. Infect. Dis., 1 (1), 30, 1979.

ROSS, G.W. y BOULTON, M.G.: *Purification of beta-lactamases on QAE-Sephadex.* Biochim. Biophys. Acta, 309, 430, 1973.

SALAKI, J.S., BLACK, R., TALLY, F.P. y KISLAK, J.W.: *B. fragilis resistant to the administration of clindamycin.* Amer. J. Med., 60, 426, 1976.

SATO, K., INOUE, M. y MITSUHASHI, S.: *Activity of beta-lactamase produced by B. fragilis against newly introduced cephalosporins.* Antimicrob. Agents Chemother., 17 (4), 736, 1980.

SHAPIRO, J.A.: DNA insertion elements and the evolution of chromosome primary structure. *TIBS*, 176, 1977.

SMITH, H.W.: Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *E. coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. *Lancet*, I, 1174, 1969.

SMITH, C.J., MARKOWITZ, S.M. y MACRINA, F.L.: Transferable tetracycline resistance in *C. difficile*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19 (6), 997, 1981.

SOCRANSKY, S.S., GIBBONS, R.J., DALE, A.C., BORTINICK, L., ROSENTHAL, E. y MacDONALD, J.B.: The microbiota of the gingival crevice area of man. I. Total microscopic and viable counts of specific organisms. *Arch. Oral Biol.*, 8, 275, 1963.

STARLINGER, P.: IS elements and transposons. *Plasmid*, 3, 241, 1980.

STEERS, E., FOLTZ, E.L., CRAVES, B.S. y RIDEN, J.: An inocula-replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility of antibiotics. *Antibiot. Chemother.*, 9, 307, 1959.

STIFFLER, P.W., KELLER, R. y TRAUB, N.: *Isolation and characterization of several cryptic plasmid from clinical isolates of B. fragilis*. J. Infect. Dis., 130 (5), 544, 1974.

SUTTER, V.L., VARGO, V.L. y FINEGOLD, S.M.: *Wadsworth anaerobic bacteriology manual* (ed. 1975). Department of continuing education in health sciences university extension and the school of Medicine, UCLA, USA, 1975.

SUTTER, V.L. y FINEGOLD, S.M.: *Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents*. Antimicrob. Agents Chemother., 10, 106, 1976.

SYKES, R.B. y MATTHEW, M.: *The beta-lactamases of Gram-negative and their role in resistance to beta-lactam antibiotics*. J. Antimicrob. Chemother., 2, 115, 1976.

TALLY, F.P. y GORBACH, S.: *Pathogenesis of Bacteroides infections*. J. of Infect., 1 (1), 5, 1979.

TALLY, F.P., SNYDMAN, D.R., GORBACH, S.L. y MALLAMY, M.H.: *Plasmid-mediated, transferable resistance to clindamycin and erythromycin in B. fragilis*. J. Infect. Dis., 139 (1),

83, 1979.

THORNTON, G.F. y CRAMER, J.A.: *Antibiotic susceptibility of Bacteroides species*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 509, 1970.

WALLACE, B.L., BRADLEY, J.E. y ROGOLSKY, M.: *Plasmid analyses in clinical isolates of B. fragilis and other Bacteroides species*. *J. Clin. Microbiol.*, 14 (4), 383, 1981.

WASHINGTON II, J.A. y BARRY, A.L.: *Dilution test procedures*. *Manual of Clinical Microbiology*. Ed. ASM. Washington, D.C., USA.

WEINRICH, A.E. y DEL BENE, V.E.: *Beta-lactamase activity in anaerobic bacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10 (1), 106, 1976.

WELCH, R.A., JONES, K.R. y MACRINA, F.L.: *Transferable lincosamide-macrolide resistance in Bacteroides*. *Plasmid*, 2 (2), 261, 1979a.

WELCH, R.A., JONES, K.R. y MACRINA, F.L.: *Conjugative R*

plasmids of Bacteroides. *Plasmid*, 2 (2), 301, 1979b.

WILKINS, T.D. y CHALGREN, S.: *Medium for use in antibiotic susceptibility testing of anaerobic bacteria*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10, 926, 1976.

WILLSHAW, G.A., SMITH, H.R. y ANDERSON, E.S.: *Application of agarose gel electrophoresis to the characterization of plasmid DNA in drug-resistant Enterobacteria*. *J. Gen. Microbiol.*, 114, 15, 1979.

ZABRANSKY, R.J., JOHNSTON, J.A. y HAUSER, K.J.: *Bacteriostatic and bactericidal activities of various antibiotics against B. fragilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 3 (2), 152, 1973.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes,
a la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Rufino Linares Lucas
titulada "Adaptación R. en especies de
Bacteroides".

resolvió otorgarle la calificación de Sobresaliente
"cum laude"

Sevilla, 13 de Octubre 1982

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Beltrán

R. Bayo

Augusto

Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

[Signature]

[Signature]

Rufino Linares



500272864

FBI E 70-045

292564