

ESTUDIOS SOBRE EL ANTIBIOTICO FOSFOMICINA: OBTENCION DE PROTOPLASTOS Y TRANSMISION DE LA FOSFOMICIN-RESISTENCIA EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Por

J. LLANEZA, F. J. MENDEZ, M. CARMEN MENDOZA,
M. ROSARIO RODICIO,

y

C. HARDISSON
Departamento Interfacultativo de Microbiología.
Universidad de Oviedo

RESUMEN

Se estudia: a) La utilización de la fosfomicina como agente inductor en la formación de protoplastos y b) Tipos de resistencia bacteriana a fosfomicina en aislados clínicos de *S. marcescens* y *Ps. aeruginosa*. Encontrando que: a) Tratando con 10 µg/ml de fosfomicina durante una hora se logra inducir la formación de esferoplastos y verdaderos protoplastos en *E. coli* y *S. marcescens*. b) Las cepas resistentes a más de 64 µg/ml de fosfomicina de *Ps. aeruginosa* presentaban alterado el sistema de transporte del α-glicerofosfato pero no las de *S. marcescens*. En 10 cepas de *S. marcescens* se demuestra, por primera vez, la aparición de una fosfomicin-resistencia portada por un plásmido transferible por conjugación.

La fosfomicina es un antibiótico descubierto en España en 1966 en el curso de una investigación conjunta llevada a cabo por la Compañía Española de Penicilina y Antibióticos y la Casa Merck Sharp Dohne de USA y es producida en caldos de fermentación por tres especies del género *Streptomyces*: *S. fradiae*, *S. viridochromogenes* y *S. wedmorensis*.

CHRISTENSEN y col. en 1969 identificaron su estructura química, diferente a la de los otros antibióticos de uso en clínica, como el ácido L-cis-1,2 epoxi-propil-fosfónico. El grupo epoxi es el determinante de su actividad antibacteriana siendo un antibiótico de amplio espectro. La molécula es ópticamente activa, presenta polaridad y su peso molecular es de 138,1. Forma fácilmente sales orgánicas e inorgánicas, utilizándose las de sodio y calcio en terapia. Es un antibiótico prácticamente atóxico para las células eucariotas, por ejercer su acción bactericida sobre la pared de la célula bacteriana (7). Esta acción se centra en el primer

escalón de su síntesis, para lo cual necesita penetrar en el citoplasma donde inhibe la acción del enzima fosfoenol-piruvato: UDP-G1-cNa-3 enolpiruvil transferasa, que es el primer responsable de la transformación de la N-acetil-glucosamina en N-acetil-murámico. Por tanto la fosfomicina actúa como análogo estructural del fosfoenolpiruvato uniéndose de forma covalente, a través de su grupo epoxi, al residuo de cisteína del enzima inactivándolo. Para su actuación es necesaria la presencia del sustrato uridin-difosfo-N-acetil-glucosamina y por tanto no compite con el ácido fosfoenolpirúvico en otras reacciones celulares. Penetra en la célula bacteriana utilizando al menos dos sistemas de transporte, el del α -glicerofosfato y el de la hexosa-fosfato, este último solamente cuando se induce exogenamente por glucosa-6-P.

En el presente trabajo damos cuenta de los resultados más significativos obtenidos por nosotros sobre la utilización de este antibiótico como agente inductor de la formación de protoplastos y sobre el estudio de la resistencia bacteriana a la fosfomicina, en tres especies de bacterias gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Serratia marcescens*.

OBTENCION DE PROTOPLASTOS CON FOSFOMICINA

Al ser la fosfomicina un inhibidor de la síntesis de la pared celular bacteriana puede utilizarse, a concentraciones adecuadas, para inducir la formación de estructuras desprovistas de pared, protoplastos, o de estructuras con la pared alterada, esferoplastos. En bacterias gram-positivas la obtención de protoplastos no ofrece dificultades, debido a que los enzimas muralíticos y los inhibidores metabólicos utilizados normalmente atacan al peptidoglicano, que en este tipo de bacterias es fácilmente asequible. En bacterias gram-negativas la eliminación de la pared celular ofrece mayores dificultades debido a su gran complejidad química y estructural, en este caso se obtienen esferoplastos a no ser que se utilice un tratamiento mixto; EDTA + agente lítico o inhibidor de la pared celular. El EDTA actúa facilitando la penetración del segundo agente, bien gracias a la facilidad que tiene de solubilizar material de la capa externa de la pared celular o bien actuando como quelante de cationes implicados en la formación de enlaces cruzados entre los lipopolisacáridos de la membrana externa.

STAPLEY y col. (15) citan la posibilidad de obtener esferoplastos al tratar *Proteus vulgaris* con fosfomicina. Nosotros utilizando cepas bacterianas sensibles a 1 μ g/ml de fosfomicina, *Escherichia coli* ML 1, *Serratia marcescens* y *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario, aplicando el método descrito anteriormente (14), logramos obtener un elevado porcentaje de verdaderos protoplastos (Fig. 2) a partir de *E. coli* (Fig. 1) usando únicamente 10 μ g/ml de fosfomicina. La formación de protoplastos empieza después de una hora de incubación alcanzándose el máximo a las dos horas. El bajo peso molecular de la fosfomicina permite su paso a través de la membrana externa de la pared celular haciendo innecesario

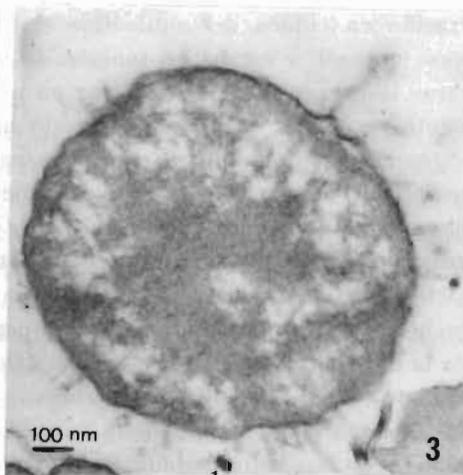
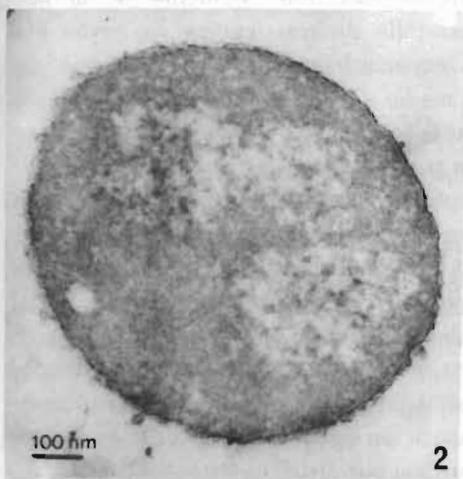
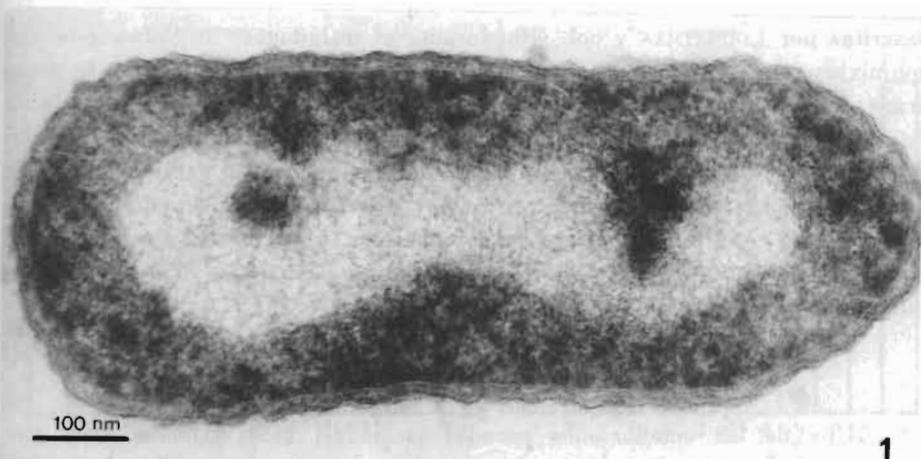


Fig. 1.-Sección longitudinal de una célula intacta de *E. coli*. CM: membrana citoplásmica, RL: capa rígida, OM: membrana externa.

Fig. 2.-Protoplasto de *Escherichia coli*.

Fig. 3.-Esferoplasto de *Serratia marcescens*, se aprecian las proyecciones tubulares-vesiculares.

el tratamiento previo con EDTA. A partir de *S. marcescens* también es posible obtener verdaderos protoplastos aunque su porcentaje es inferior al de *E. coli*. Aparecen además numerosos esferoplastos en los cuales la membrana externa aunque alterada, aparece rodeando parcialmente a la célula (Fig. 3). En ambos tipos de estructuras observamos que la capa intermedia de peptidoglicano había sido eliminada. Los esferoplastos presentaban gran cantidad de proyecciones tubulares-vesiculares (Fig. 3) formadas a partir de la membrana externa y que están constituidas por una unidad de membrana. Proyecciones similares fueron

descritas por LOUNATMAA y col. (10) durante el tratamiento de *Salmonella* con polimixina, atribuyéndose este efecto a la acción del antibiótico sobre la membrana. En *Ps. aeruginosa*, PÉREZ UREÑA y col. (13) describieron la formación de esferoplastos usando EDTA y fosfomicina. Nosotros no logramos inducir la formación de esferoplastos utilizando únicamente fosfomicina, a pesar de aumentar su concentración y el tiempo de exposición (10-100 µg/ml de fosfomicina durante cuatro horas). Las formas obtenidas por nosotros, protoplastos y esferoplastos, son estables y útiles para posteriores experimentos y para el aislamiento de estructuras subcelulares.

RESISTENCIA BACTERIANA A LA FOSFOMICINA

Una de las conclusiones sacadas en la III MESA REDONDA SOBRE FOSFOMICINA (2) hacía referencia a que en los tres años y medio de la utilización en clínica del antibiótico el desarrollo de resistencias «in vivo» era poco marcado y estaba en función de la especie bacteriana, mientras que «in vitro» la presencia de fosfomicina en un medio de cultivo podía producir fácilmente resistencias, por selección de mutantes resistentes, principalmente de origen cromosómico que se caracterizaban por ser cepas defectivas y avirulentas en animales de experimentación. Los mecanismos de resistencia identificados en mutantes espontáneos o inducidos por la acción de mutágenos se clasifican en dos grupos: I) ALTERACIONES EN LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DEL ANTIBIÓTICO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA: *mutantes glp T⁻*, han perdido el sistema de transporte del α -glicerofosfato y *mutantes uhp⁻*, han perdido el sistema de transporte de entrada de la hexosa-fosfato. II) ALTERACIONES EN EL PUNTO DE ACTUACIÓN DE LA FOSFOMICINA: aunque no se ha demostrado totalmente su existencia hay información suficiente para aceptarla. El estudio de la posible aparición de transferencia plasmídica de la resistencia a la fosfomicina ha sido abordado por distintos autores (1, 6, 12, 17) obteniendo resultados controvertidos, que no aportan conclusiones definitivas. Si como viene sucediendo con la mayoría de los antibióticos de uso en clínica, el carácter fosfomicin-resistencia (Fos^r) se incorporase a plásmidos conjugativos, la diseminación de la resistencia podría tener lugar con elevada frecuencia, sobre todo en ambiente hospitalario, estando en función de la frecuencia de transferencia y de la capacidad de transferencia interespecífica de los factores R que la portasen, afectando a las posibilidades clínicas del antibiótico.

Para el estudio de la aparición de resistencias a la fosfomicina elegimos dos especies bacterianas típicamente nosocomiales, *S. marcescens* y *Ps. aeruginosa*, que se caracterizan por presentar actualmente «in vitro» un elevado índice de resistencias frente a la mayoría de los antibióticos de uso frecuente en medio hospitalario. Calculamos los niveles y porcentajes de resistencia de 73 cepas de *S. marcescens* y 25 cepas de *Ps. aeruginosa* aisladas en el Servicio de Bacteriología de la Residencia de la S. S. Ntra. Sra. de Covadonga de Oviedo (cedidas por el

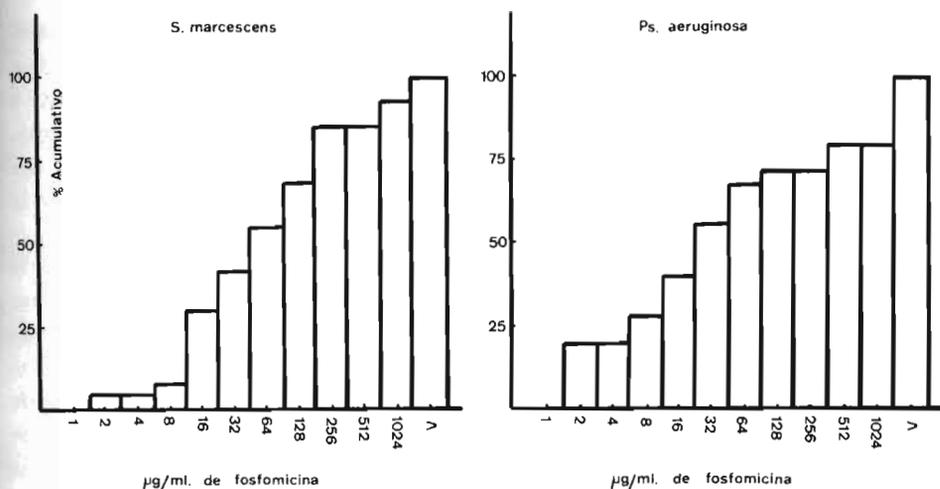


Fig. 4.-Porcentajes acumulativos de la «CIM» a fosfomicina.

doctor Martín Alvarez) a partir de 1974 fecha en la que se introdujo en el hospital la fosfomicina. Aplicando la metodología recomendada por la OMS tanto para el cálculo de la sensibilidad disco-placa como para las concentraciones inhibitorias mínimas de doce agentes quimioterápicos de uso en clínica (5). Los resultados obtenidos para la fosfomicina, Fig. 4, representados en porcentajes acumulativos indican que el 55 % de las cepas de *S. marcescens* y el 70 % de las de *Ps. aeruginosa* son resistentes a 64 µg/ml de fosfomicina, siendo de 100-200 mg/kg peso las dosis recomendadas en clínica para infecciones graves.

Para conocer si la resistencia que presentan estas cepas era debida a alteraciones en los sistemas de transporte del antibiótico se procedió a sembrarlas en medio mínimo M₉ (11) con glicerol (0,02 M), DL-α-glicerol-P (0,04 M), glucosa (0,01 M) o glucosa-6-P (0,04 M) como fuente de carbono, incubando durante 36 horas a 37°C y 200 g.p.m. Encontrando que las cepas resistentes a más de 256 µg/ml de fosfomicina de *Serratia* utilizan normalmente los cuatro nutrientes mientras las de *Pseudomonas* utilizan el glicerol, la glucosa y la glucosa-6-P pero no el DL-α-glicerofosfato de lo que se deduce que deben tener alterada esta vía de transporte. Por otro lado la CIM al antibiótico no es rebajada (no facilitándose el transporte de la fosfomicina) por la adición como inductor de glucosa-6-P (0,05 mM), al medio Mueller-Hinton en ninguna de las cepas de *Pseudomonas* ni en un 30 % de las cepas de *Serratia* estudiadas.

RESISTENCIA PLASMIDICA A LA FOSFOMICINA

Al no presentar alterados los sistemas de transporte de la fosfomicina un 70 % de las cepas de *S. marcescens* Fos^r por nosotros estudiadas cabía la posibili-

dad de que la Fos^r fuese portada por un plásmido de resistencia conjugativo (factor R). Para comprobarlo nos planteamos su estudio aplicando tres criterios: 1.º Estudio de la transferencia por conjugación del carácter Fos^r conjuntamente a otras resistencias, seleccionando con antibióticos distintos a la fosfomicina, 2.º Curación del carácter Fos^r conjuntamente a las otras resistencias transferidas por conjugación, 3.º Estudio comparativo de los sistemas de transporte de la fosfomicina en cepas sensibles y resistentes.

1.º *Transferencia por conjugación del carácter Fos^r*: Para detectar la presencia de factores R que portasen y transfiriesen por conjugación el carácter Fos^r conjuntamente con otras resistencias a antibióticos utilizamos el método descrito previamente (9) modificando la proporción donador-receptor que fue 1 : 10 y realizando la incubación a 28°C y a 37°C durante seis horas. 24 cepas de aislados clínicos multirresistentes de *S. marcescens* seleccionadas entre las que presentaban una resistencia a fosfomicina superior a 256 µg/ml fueron utilizadas como donadores y *E. coli* K12 W3110 Rif^r como receptor, en un primer ciclo de conjugación. Las células exconjugantes fueron seleccionadas siempre con 100 µg/ml de rifampicina más uno de los siguientes antibióticos: 30 µg/ml de kanamicina, 10 µg/ml de ampicilina, 30 µg/ml de cloranfenicol, 30 µg/ml de gentamicina, 30 µg/ml de tetraciclina; en ningún caso se utilizó fosfomicina como agente selector para evitar la aparición de mutantes inducida por la presencia de este antibiótico en el medio. En la Tabla 1 están resumidos los resultados y puede observarse que aparecen cuatro modelos de transferencia, dos de los cuales portan el carácter Fos^r que es transferido por nueve de las 24 cepas estudiadas, tres de estas cepas transfieren ambos modelos, R1 y R2, con una frecuencia de transferencia relativamente elevada (10^{-3} - 10^{-5}).

Los dos tipos de exconjugantes Fos^r obtenidos por transferencia a *E. coli* K12 W3110 se utilizaron como cepas donadoras en un segundo ciclo y como receptoras tres especies distintas de enterobacterias resistentes al ácido nalidíxico. Encontrando que la Fos^r vuelve a transferirse conjuntamente con las otras resistencias (Tabla 2). Observándose además que a 28°C se transferían siempre cinco resistencias: Am Cb Sm Fos Tc, con independencia de que la cepa donadora portase R1 ó R2; la resistencia a la tetraciclina también debe ser portada por R2 aunque no se manifieste cuando el huésped que lo alberga es *E. coli* K12 W3110. Los niveles de resistencia transferidos están agrupados en la Tabla 3.

2.º *Curación del carácter Fos^r conjuntamente con las otras resistencias transferidas por conjugación*. Se aplicó este criterio para confirmar la evidencia de que la resistencia a la fosfomicina en las cepas de *Serratia* por nosotros estudiadas era mediatizada por un plásmido. Procedimos a curar por tratamiento con dodecil sulfato sódico (SDS), agente de elevada eficacia curante (9, 16), la cepa n.º 9 de *S. marcescens* y los dos exconjugantes Fos^r a que da lugar en *E. coli* K12 W3110; al mismo tiempo estudiamos la estabilidad del plásmido determinando la pérdida de la multirresistencia por almacenamiento a 4°C y a tempera-

TABLA 1: TRANSFERENCIA DE LA RESISTENCIA A LA FOSFOMICINA POR CONJUGACION DESDE AISLADOS CLINICOS DE *S. marcescens* MULTIRRESISTENTES A *E. coli* K12 W3110 Rif^r.

Cepas donadoras	Resistencias transferidas exconjugantes-1	Modelo plásmido	Frecuencia de transferencia
5,7,8,9,19	Ap Cb Sm Fos Tc Nm Km Gm Cm Su	R 1	$3 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-4}$
5,6,9,19,32,35,55,57,58,70,76	Ap Cb Sm Fos	R 2	$1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-5}$
9,3	Ap Cb Tc Nm Km Gm Cm Su	R 3	$1 \cdot 10^{-6}$
8,10	Ap Cb Gm	R 4	$5 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-3}$
15,58	Ap Cb	R 5	$1 \cdot 10^{-5} - 1 \cdot 10^{-6}$

TABLA 2: SEGUNDO CICLO DE TRANSFERENCIA DE RESISTENCIA A LA FOSFOMICINA POR CONJUGACION.

Donador + plásmido	Receptor NA ^r	Resistencias en exconjugantes-2	Donad/ exconj.	Frecuencia de transferencia
<i>E. coli</i> K12 W3110 + R 1	<i>E. coli</i> [*]	Ap Cb Sm Fos Tc	5/4	$1 \cdot 10^{-2} - 3 \cdot 10^{-4}$
	<i>Sh. sonnei</i>	Ap Cb Sm Fos Tc	5/3	$1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-4}$
	<i>S. marcescens</i>	Ap Cb Sm Fos Tc	5/3	$3 \cdot 10^{-3}$
		Ap Cb Sm Fos Tc Nm Km Gm Cm Su	5/1	$1 \cdot 10^{-3}$
<i>E. coli</i> K12 W3110 + R 2	<i>E. coli</i> [*]	Ap Cb Sm Fos Tc	5/2	$1 \cdot 10^{-4} - 1 \cdot 10^{-5}$
	<i>Sh. sonnei</i>	Ap Cb Sm Fos Tc	5/1	$1 \cdot 10^{-3}$
	<i>S. marcescens</i>	Ap Cb Sm Fos Tc	5/4	$1 \cdot 10^{-3}$

**E. coli* NCIB 9482 lac⁻ Sm^r

tura ambiente. El método utilizado se describe en trabajos previos (8, 9). Los resultados (Tabla 4) indican que en la cepa de *Serratia* original la multirresistencia es muy estable mientras que en los exconjugantes de *E. coli* K12 W3110 se pierden, con una frecuencia variable y en bloque, las marcas transferidas por conjugación entre las que está Fos^r. Resultados similares respecto a la elevada estabilidad de otros factores R en aislados clínicos de *S. marcescens* y menor en *K. pneumoniae* y *E. coli* han sido descritos por COOKSEY et al (4) y por nosotros (9). Estas curaciones vienen a confirmar el carácter plasmídico de la resistencia a la fosfomicina.

3.º *Estudio comparativo de los sistemas de transporte de la fosfomicina en cepas sensibles y resistentes.* Partiendo de la premisa de que las cepas Fos^r mutantes espontáneas o inducidas tendrían alterados los sistemas de transporte del antibiótico y serían «glp T⁻» ó «uhp⁻», mientras que las cepas sensibles y las portadoras de plásmidos Fos^r no sufrirían este tipo de alteraciones, estudiamos la utilización de glucosa, glicerol, glucosa-6-P y DL- α -glicerol-P como única fuente de carbono y energía en el siguiente sistema de bacterias:

TABLA 3.- CIMs DE AGENTES ANTIMICROBIANOS PARA CEPAS DONADORAS, RECEPTORAS Y EXCONJUGANTES ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

		PRIMER CICLO				SEGUNDO CICLO			
Modelo	Donador	Receptor	Exconj-1	Receptor	Exconj-2	Receptor	Exconj-2	Receptor	Exconj-2
	<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i> [✱]		<i>E. coli</i> ^{✱✱}		<i>Sh. sonnei</i>		<i>S. marcescens</i>	
R-1									
	Ap	1024	2	1024	1	256-1024	8	64	256
	Cb	1024	4	1024	4	1024	8	2	128
	Sm	128-1024	2	64	1024	1024	8	2	32
	Nm	128-1024	1	128	1	8	2	2	2
	Km	512-1024	1	512	1	32	2	1	1
	Gm	256	1	128	1	2	1	2	2
	Tc	512	1	128-256	1	64-128	2	32	64
	Cm	512	4	32-128	2	1	2	1	1
	Su	1024	8	1024	2	4	4	16	4
	Fos	256-1024	32	1024	16	128-1024	2	32	1024
R-2									
	Ap	1024	2	1024	1	256	8	64	256
	Cb	1024	4	1024	4	256	8	2	128
	Sm	128-1024	2	32	1024	1024	8	2	32
	Tc	512	1	1	1	64	2	32	64
	Fos	1024	32	1024	16	1024	2	32	1024

En el segundo ciclo las cepas donadoras son Exconjugantes-1

 (✱) *E. coli* W3110 R1^r

 (✱✱) *E. coli* NCIB 9482 lac⁻ NA^r Sm^r

TABLA 4.- CURACIONES DEBIDAS AL ALMACENAMIENTO Y TRATAMIENTO CON SDS DE PLASMIDOS FOSFOMICIN-RESISTENTES.

Cepa	Resistencias	Almacenamiento		Tratamiento SDS (24 horas)		
		Ta	colonias/colonias curadas/ensayadas	concentr. %	colonias/colonias curadas/ensayadas	Modelo curación
<u>S. marcescens</u> nº 9	(Ap Cb Cr Sm Km Nm Cm Tc Cm Su Fos)	4°C (30 días)	0/200	0	0/500	
		ambiente (30 días) (60 días)	0/200 0/200	0.1 1 10	0/500 0/500 0/500	
<u>E. coli W3110</u> + R-1	(Ap Cb Sm Km Nm Cm Tc Cm Su Fos)	4°C (30 días)	0/200	0	3/600	R-1
		ambiente (30 días) (60 días)	2/200 0/200 0/200	0.1 1 10	3/600 3/600 4/400	R-1 R-1 R-1
<u>E. coli W3110</u> + R-2	(Ap Cb Sm Fos)	4°C (30 días)	10/200	0	42/600	R-2
		ambiente (30 días) (60 días)	12/200 2/200 6/200	0.1 1 10	62/600 64/600 65/500	R-2 R-2 R-2

Antibióticos selectores: 30 µg/ml Km; 10 µg/ml Ap

Modelos de curación: R-1: Ap Cb Sm Km Nm Cm Tc Cm Su Fos
R-2: Ap Cb Sm Fos
R-3: Ap Cb Km Nm Cm Tc Cm Su

TABLA 5: CRECIMIENTO EN MEDIO M₉ CON DISTINTAS FUENTES DE CARBONO. (D.O. medida a 580 nm).

	GLUCOSA			GLICEROL			GLU-6-P			DL- α -GLI-P		
	-0,01M	0,02M	0,04M	0,02M	0,04M	0,08M	0,04M	0,08M	0,16M	0,04M	0,08M	0,16M
E.coli W3110 recep. Fos ^S	1,10	0,80	0,90	0,80	0,90	0,55	1,45	1,12	1,31	1,40	1,40	1,40
E.coli W3110 induc. Fos ^R	0,04	0,03	1,05	0,03	1,05	0,04	1,68	0,03	1,39	0,09	0,09	0,09
S. marcescens 9 Fos ^R	1,05	0,75	1,25	0,75	1,25	0,25	1,20	0,84	1,54	1,26	1,26	1,26
E.coli W3110 R1 Fos ^R	1,15	0,60	0,90	0,60	0,90	0,45	1,55	1,10	1,26	1,34	1,34	1,34
E.coli W3110 R2 Fos ^R	1,15	0,60	0,95	0,60	0,95	0,45	1,48	1,12	1,28	1,38	1,38	1,38
S. marcescens 3 Fos ^R	0,94	0,85	0,85	0,85	0,85	0,35	1,15	1,05	1,28	1,25	1,25	1,25
S. marcescens CECT 159	0,90	0,75	1,35	0,75	1,35	0,90	1,05	0,85	1,53	1,25	1,25	1,25
Tiempo de incubación	24 horas						36 horas					

TABLA 6: EFECTO DE LA GLUCOSA-6-P SOBRE LA "CIM" A FOSFOMICINA.

CEPA	MUELLER HINTON			M. H + GLU-6-P 0,5 mM			MEDIO M ₉ + GLU-6-P 0,02 M					
	32	64	128	256	512	1024	32	64	128	256	512	1024
E.coli W3110 Fos ^S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E.coli W3110 Fos ^R (1)	+	+	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-
E.coli W3110 + R1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E.coli W3110 + R2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S.marcescens 9 Fos ^R	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S.marcescens 3 Fos ^R	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
S.marcescens CECT 159	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1): Fos^R por mutación inducida. (-): no crecimiento. (±): crecimiento inferior al testigo sin antibiótico.

(+): crecimiento análogo al testigo sin antibiótico.

E. coli K12 W3110 Fos^s

E. coli K12 W3110 Fos^r resistencia inducida por subcultivos en medio con 100 µg/ml de fosfomicina.

E. coli K12 W3110 + R1 resistencia portada en un plásmido.

E. coli K12 W3110 + R2 resistencia portada en un plásmido.

S. marcescens n.º 9 Fos^r transfiere la Fos^r por conjugación.

S. marcescens n.º 3 Fos^r no transfiere la Fos^r por conjugación.

S. marcescens CECT 159 Fos^s

Cultivándolas en medio M9 a 37°C y en agitación a 200 g.p.m.

En la Tabla 5 se exponen los resultados obtenidos observándose que la cepa de *E. coli* que obtuvo la resistencia por mutación inducida es la única que no utiliza el DL- α -glicerol-P. En la Fig. 5 se representa la cinética de utilización del DL- α -glicerol-P y en la Tabla 6 se recogen los datos sobre la facilitación del transporte de la fosfomicina (se rebaja la CIM) cuando se adiciona al medio glucosa-6-P, (0,5 mM) como inductor o glucosa-6-P (0,02 M) como fuente de carbono. En este caso se observa que solamente en la cepa de *E. coli* Fos^r por mutación inducida y en la cepa de *S. marcescens* n.º 3 Fos^r, que no transfiere la resistencia por conjugación, disminuye la CIM; en las demás cepas los niveles de resistencia permanecen estables. Por tanto la cepa original de *S. marcescens* n.º 9 multirresistente y los exconjugantes de *E. coli* portadores de plásmidos Fos^r no presentan alterados ninguno de estos dos sistemas de transporte del antibiótico,

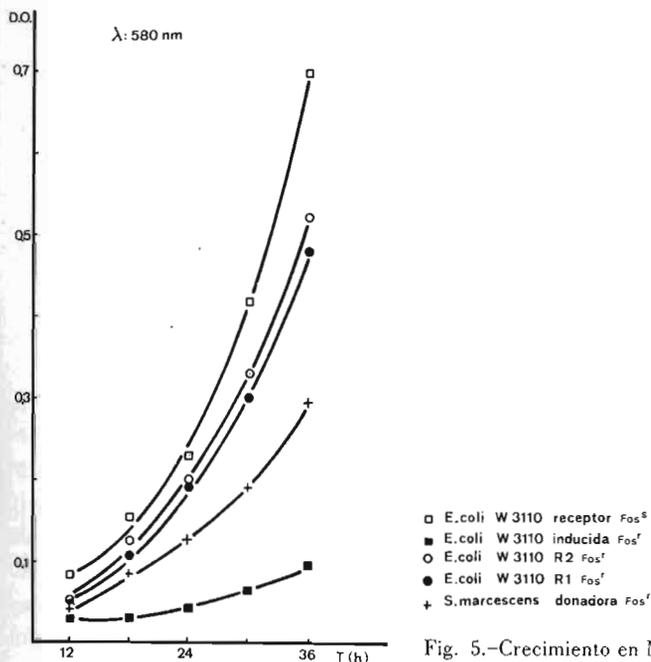


Fig. 5.-Crecimiento en M₉ con DL- α -glicerol-P 0,04M.

siendo otro el origen de la fosfomicin-resistencia. Los resultados obtenidos aportan pruebas evidentes de la aparición de plásmidos conjugativos que portan el carácter Fos^r, conjuntamente a otras resistencias, en aislados clínicos de *S. marcescens* y que esta resistencia no es debida a alteraciones en los sistemas de transporte del antibiótico.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor F. Uruburu por las cepas de la C.E.C.T. Al profesor M. H. Richmond por la cepa *E. coli* K12 W3110 Rif^r. Al doctor R. Martín por los aislados clínicos de *S. marcescens* y *Ps aeruginosa*. A la CEPA por el antibiótico fosfomicina.

BIBLIOGRAFIA

- (1) BAQUERO, F., LÓPEZ BREA, M., VALLS, A. y CANEDO, T. (1977).-Chemoterapy vol. 23.
- (2) CEPA. «III MESA REDONDA SOBRE FOSFOMICINA» (1976).-Farmaes vol. 4, n.º 134.
- (3) CHRISTENSEN, B. G., LEANZA, W. J., BEATTIE, T. R., PATCHETT, A. A., ARINSON, B. H., ORMOND, R. E., KUEHL, F. A., ALBERS-SCHONBERG, G. JARDETZKY, O. (1969).-Science, 166, 123-125.
- (4) COOKSEY, R. C., THORNE, G. M. and BARRAR, W. E. (1976).-Antimicrob. Ag. Chemoter., 10, 123-127.
- (5) DAGUET, G. L. and CHABBERT, Y. A. (1972).-Techniques in bacteriologie, vol. 3. Ed. Flammarion Medicine Sciences. Paris.
- (6) GÓMEZ-LUS, R., and CISTERNA, R. (1974).-Future Trends in Chemoterapy. Med. Act. Drugs of Today, vol. 10.
- (7) KAHAN, F. M., KAHAN, J. S., CASSIDY, P. J., KROPP, H. (1974).-Ann. N. Y. Acad. Sc., 235, 364-386.
- (8) HARDISSON, C., MÉNDEZ, F. J. y LLANEZA, J. (1977).-Farmaes, vol. IV, n.º 134.
- (9) LLANEZA, J., MÉNDEZ, F. J., MENDOZA, M. C. y HARDISSON, C. (1978).-Arch. Fac. Med. Oviedo, vol. 1, n.º 5.
- (10) LOUNATMAA, K., MAKELA, H. P. y SARVAS, H. (1976).-J. Bacteriol., 127, 1.400-1.407.
- (11) MILLER, J. H. (1972).-«Experiments in Molecular Genetics». Cold Spring Harbor Lab.
- (12) PEREA, E. J., DAZA, R. M. y MENDAZA, M. P. (1977).-Chemotherapy, vol. 23.
- (13) PÉREZ-UREÑA, M. T., ESPINOSA, M., BARASOEIN, I., PORTOLES, A. (1974).-Microbiol. Españ., 27, 235-255.
- (14) RODICIO, M. R., MANZANAL, M. B. y HARDISSON, C. (1978).-Arch. Microbiol., 118, 219-221.
- (15) STAPLEY, E. O., HENDLIN, D., MATA, J. M., JACKSON, M., WALLICK, M., HERNÁNDEZ, S., MOCHALES, S., CURRIE, S. A., MILLER, R. M. (1969).-Antimicrob. Ag. Chemoter., 284-290.
- (16) TOMOEDA, M., INUZUKA, M., KUBO, N., NAKAMURA, S. (1968).-J. Bacteriol., vol. 95, n.º 3, 1.078-1.089.
- (17) WIEDEMANN, B. (1977).-Current Chemoter., vol. 1. Am. Soc. Microbiol.