



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
U.N.A.M.
1997

11261

7
24

IDENTIFICACION DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE
***Serratia marcescens* AISLADAS DE INFECCIONES**
NOSOCOMIALES.

TESIS

QUE PARA OPTAR AL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(MICROBIOLOGIA)

PRESENTA

ESTRELLA CERVANTES GARCIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

IDENTIFICACION DE PROTEINAS
DE MEMBRANA EXTERNA DE

Serratia marcescens

AISLADA DE INFECCIONES
NOSOCOMIALES

ESTRELLA CERVANTES GARCÍA

MIRELLA

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 4 |
| INTRODUCCION | 6 |
| II.- IDENTIFICACION. | 21 |
| a) Características microbiológicas | 21 |
| b) Pruebas bioquímicas | 22 |
| c) Sensibilidad a los antibióticos | 22 |
| d) Composición química del pigmento | 23 |
| e) Composición de la membrana externa en las bacterias Gram-Negativas | 24 |
| III. CLASIFICACION | 26 |
| VI. HIPOTESIS | 32 |
| V. OBJETIVOS | 33 |
| VI. MATERIAL Y METODOS. | 34 |
| MATERIAL: | 34 |
| 1. Métodos bacteriológicos | 34 |
| 1.1 Cepas bacterianas utilizadas | 34 |
| 1.2 Cultivo de bacterias | 35 |
| 2. Aislamiento de las proteínas de la membrana externa (PME) de <i>Serratia marcescens</i> | 35 |
| 2.1 Número de bacterias utilizadas para inmunizar conejos | 36 |
| 2.2 Cuantificación de proteínas | 37 |
| 2.3 Obtención de sueros policlonales Anti-PME en conejos | 37 |
| 3. Métodos analíticos | 39 |
| 3.1 Separación de las PME de <i>S. marcescens</i> por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. | 39 |
| 3.2 Tinción de los geles de poliacrilamida | 40 |
| 3.3 Electroinmunotransferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa e inmunodetección | 40 |
| 3.4 Ensayo inmunoenzimático: ELISA | 41 |
| VII. RESULTADOS. | 44 |
| 1. Obtención de anticuerpos en animales infectados con <i>S. marcescens</i>. | 44 |
| 1.1 Susceptibilidad de los animales a la infección: | 44 |
| 1.2 Análisis electroforético de las PME de <i>S. marcescens</i> | 44 |
| 1.3 Reconocimiento de las PME de <i>S. marcescens</i> por inmunoelectrotransferencia con sueros de conejos y de pacientes hospitalizados. | 45 |
| 1.4 Reconocimiento de anticuerpos por el método de ELISA. | 46 |
| 1.5 Hemólisis | 47 |
| VIII. DISCUSION | 48 |
| IX. CONCLUSIONES | 54 |
| BIBLIOGRAFIA. | 57 |

RESUMEN

Serratia marcescens, es un bacilo Gram negativo, móvil perteneciente a la Familia Enterobacteriaceae, Tribu Klebsiellae, es considerado como un patógeno oportunista que puede causar infecciones graves cuando las defensas del huésped se encuentran alteradas. Su descripción inicial fue realizada por Bartolomeo Bizio en 1819 y hasta la década de los 50 fue considerada como un saprófito. Hasta 1964 fue reportado como el agente causal de infecciones graves. En la literatura médica únicamente se habían reportado 15 casos de bacteriemia debida a Serratia sp, y posteriormente descubrió su notable capacidad para desarrollar resistencia a gran número de antibióticos. Se le ha considerado una bacteria oportunista ya que infecta principalmente los pacientes inmunocomprometidos. Este microorganismo ha sido considerado como un patógeno importante, durante las últimas dos décadas por ser el agente causante de infecciones en el tracto urinario, neumonías, septicemias, meningitis, bacteriemias, endocarditis, peritonitis, osteomielitis entre otras; así como de graves epidemias intrahospitalarias. La mayoría de los estudios sobre esta bacteria han estado enfocados a la identificación de varios serotipos. Se han identificado 26 antígenos "O" y 24 antígenos flagelares "H," en algunas cepas se ha observado el antígeno capsular "K". Sin embargo, poco se conoce acerca de los antígenos de la membrana externa de S. marcescens, así como su relación con la patogenicidad. En este trabajo, se hace énfasis en el estudio de las proteínas de membrana externa de cepas aisladas durante una de las epidemias en uno de los hospitales de la Ciudad de México. Las cepas estudiadas fueron la 62-8-88 (aislada de líquido cefalorraquídeo) y la 112-HV-88 (aislada de hemocultivo). Las cuales fueron crecidas a temperaturas de 30 y 37°C, con el fin de establecer si había alguna diferencia en cuanto a su patrón de proteínas y al reconocimiento antigénico. El estudio se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), así como por el método de inmunoelectrotransferencia, utilizando sueros de conejos inmunizados con la bacteria entera y sueros de pacientes hospitalizados, utilizándose como controles sueros de voluntarios sanos, con el fin de identificar los

antigenos reconocidos por ambos . También se utilizó el método de ELISA, para cuantificación de la presencia de anticuerpos en contra de los antigenos estudiados.

INTRODUCCION

Las enfermedades nosocomiales son aquellas que son producidas por microorganismos que se adquieren dentro del hospital y se desarrollan dentro o fuera de él. Pueden involucrar no sólo a los pacientes, sino también a los individuos que hayan tenido algún contacto previo en el hospital, incluyendo miembros del mismo, voluntarios, visitantes, trabajadores, entre otros.

Aunque la mayoría de las enfermedades nosocomiales se manifiestan durante la hospitalización pueden presentarse después de que el paciente es dado de alta.

Se considera a la infección no nosocomial cuando la incubación de ésta se da en el tiempo en el que el paciente está en admisión.

Los microorganismos causantes de las infecciones nosocomiales pueden ser de dos fuentes:

- Endógena: cuando la infección es producida por la flora normal del individuo.
- Exógena: cuando la infección es causada por microorganismos adquiridos del medio hospitalario.

La prevención es un aspecto muy importante en el control de estas infecciones. Medidas tan simples como un cuidadoso lavado de manos después de que se tiene contacto con algún paciente muy infectado, puede prevenir dichas infecciones.

A menudo es imposible establecer el modo de infección de cada paciente, ya que más de una forma de microbio puede contribuir al desarrollo de la misma y no todas se pueden prevenir.

La enfermedad puede ocurrir a pesar de todas las precauciones, por ejemplo en el caso de los pacientes inmunosuprimidos, debido a que dentro su flora normal existe el microorganismo para que la enfermedad se desarrolle.

Para caracterizar a la enfermedad se debe tomar en cuenta el lugar, la persona y el tiempo.

Se puede clasificar en:

- Esporádica: aquéllos casos que ocurren irregularmente al margen de algún modelo específico.
- Endémica: cuando un número relativamente pequeño pero constante de casos se presentan en una determinada zona geográfica.
- Epidémica: cuando se presenta un incremento de la incidencia con respecto a los casos endémicos.
- Pandémica: cuando un número grande de casos afectan zonas geográficas muy extensas.

En su mayoría las enfermedades nosocomiales, tienen carácter de tipo endémico y sólo en algunos casos resultan epidémicos. Debido a su notable incremento sobre todo en los últimos diez años, estas han cobrado gran importancia (48).

El problema de las enfermedades intrahospitalarias antes de los años sesenta, mostraba un panorama en el que sólo ocasionalmente se informaba de casos aislados, en general causados por *Staphylococcus aureus*. Este panorama ha cambiado a raíz del incremento en el número de casos que se presentan, al conocimiento de los mismos y de los mecanismos de transmisión.

Este incremento, ha conducido a la creación de comités de infecciones nosocomiales cuyas actividades no sólo abarcan hospitales de segundo y tercer nivel del Sector Salud, sino también instituciones privadas (24).

Nuestro país, tiene como característica fundamental estar constituido por una población joven con alto índice de crecimiento, y un porcentaje elevado de mujeres se encuentran en etapa reproductora. Desafortunadamente el círculo vicioso entre la desnutrición e

infección es un problema que se inicia desde la etapa neonatal y que conduce a que una de las principales causas de morbilidad infantil sea infecciosa

Esto hace necesario conocer la frecuencia y el tipo de microorganismos causantes de las infecciones perinatales en nuestro país.

En 1986, en el Instituto Nacional de Pediatría se hizo un seguimiento por seis meses del número de ingresos por causas infecciosas. El resultado de dicha encuesta mostró, que el 29.3% de los ingresos mensuales se debió a esta causa. Esto indicó que más de la cuarta parte de los ingresados presentaron padecimientos potencialmente transmisibles al resto de la población interna. De estos estudios se concluyó que se deben instaurar medidas preventivas para evitar que otros pacientes contraigan infecciones durante su hospitalización (24).

Durante 1987, en esta misma entidad se registraron 337 casos de infecciones nosocomiales, las cuales, tuvieron un costo diario de 80,000 pesos.

En vista de la alta frecuencia de las enfermedades nosocomiales, se ha propuesto que se establezcan comités que regulen y propongan políticas con el fin de detectar tempranamente las infecciones nosocomiales y así evitar su progreso. Este comité debe de estar integrado por un representante de la Dirección Médica y Administrativa, un infectólogo, una enfermera por cada 250 camas, un epidemiólogo y el jefe de Bacteriología. El departamento de Bacteriología debe de informar una vez por semana de todos los cultivos que sean positivos, para que la enfermera y el infectólogo, analicen los candidatos a ser catalogados como infección intrahospitalaria.

Los objetivos de un comité de infecciones deben ser:

- i).- Conocer la incidencia de las enfermedades nosocomiales.
- ii).- Conocer con base a estudios epidemiológicos, los riesgos de que un paciente hospitalizado adquiera una infección por procedimientos diagnósticos que se empleen.
- iii).- Reducir la frecuencia de las infecciones intrahospitalarias.

Las funciones del comité deben consistir en:

- a).- Establecer políticas y mecanismos para observar y evaluar las enfermedades nosocomiales.
- b).- Determinar los procedimientos apropiados para prevenir y controlar éstas (aislamientos, egresos etc.)
- c).- Marcar las políticas y procedimientos de manejo de pacientes no infectados, que requieren aislamientos por alteraciones del sistema inmunológico.

Las enfermedades intrahospitalarias más frecuentes en los últimos años, se deben principalmente a las bacterias Gram Negativas. Hoy en día, el papel que desempeña el laboratorio es principalmente el de crear métodos que permitan detectar tempranamente las enfermedades nosocomiales.

Algunos laboratorios clínicos actualmente cuentan con manuales de procedimientos que incluyen información acerca de los microorganismos que prevalecen en el país así como de los agentes antimicrobianos comunes en la institución. Este material sirve entonces, no sólo para mejorar la atención de los pacientes, sino también para estar alerta cuando se presenta algún brote debido a algún agente nuevo.

Además de identificar adecuadamente al microorganismo causal de la infección intrahospitalaria es necesario ubicar el origen de la misma y hacer un planteamiento global que incluya un buen manejo de los casos. Se sabe que dentro de un hospital existen áreas de alto riesgo como son: salas de cirugía, ginecología y obstetricia, entre otras, que requieren una vigilancia más estrecha. Por otra parte la búsqueda de un microorganismo intrahospitalario incluye la identificación del agente específico, así como el estudio de los perfiles de plásmidos de la bacteria asociados a un patrón de resistencia así como su compatibilidad genética con otras bacterias. Todos estos aspectos son muy importantes para mantener una estrecha vigilancia en la aparición de nuevos brotes.

Las epidemias hospitalarias debidas a microorganismos multiresistentes se atribuye a la amplitud de la resistencia de la cepa, aunque algunas instituciones han observado un

incremento en la frecuencia de enfermedades causadas por varias cepas multirresistentes de uno ó de varios géneros (116).

En las últimas décadas se ha intensificado el estudio de las enfermedades causadas por agentes oportunistas con resistencia a los antibióticos. Se ha encontrado que son tres los agentes mas comunes entre los bacilos Gram negativos como son: Pseudomonas , sp, Eschenchia coli, y Serratia sp. Los mecanismos por los cuales estas bacterias causan enfermedades se han explicado en base a las exotoxinas de E. coli y Pseudomonas sp, pero no se han reportado exotoxinas específicas en la patogénesis de S. marcescens, sin embargo esta bacteria posee un buen arsenal de elementos de patogenicidad , dentro de los cuales se encuentran , su resistencia a los antimicrobianos mediados por enzimas, a las fimbrias, a la producción de hemolisinas asociadas a la membrana externa, así como la producción de proteasas extracelulares, dentro de esta una proteasa de 56kDa que activa el factor Hageman-kallicreína-quinina, lo cual permite un aumento de la permeabilidad vascular, dando como resultado la queratitis en el cobayo y en el conejo (44).

Por otra parte las estadísticas muestran que las infecciones intrahospitalarias causadas por otros microorganismos como S. marcescens van en aumento , este hecho aunado a lo anteriormente descrito nos ha llevado a plantear el objetivo de este trabajo que es el estudiar uno de los factores patogénicos de esta bacteria, que es el estudio de las proteínas de la membrana externa tomando como base los estudios realizados en: E. coli y Salmoella thipymunium, que han sido las bacterias entéricas más estudiadas.

ANTECEDENTES

La bacteria S. marcescens , es un bacilo Gram negativo perteneciente a la Familia Enterobacteriaceae, Tribu Klebselliae, que crece con facilidad en comestibles, especialmente en aquellos que contienen almidón y carbohidratos, donde las colonias pigmentadas que aparecen en los alimentos son fácilmente confundidas con gotas de sangre (106).

A principios del siglo VI antes de Cristo, fue Pitágoras quien por primera vez observó la presencia de una coloración semejante a la sangre en los alimentos. Once siglos después, Ehrenberg encontró casi cien referencias sobre la milagrosa aparición de sangre en los alimentos. Los primeros antecedentes registrados por los historiadores clásicos sobre este hecho se remontan al año 332 antes de Cristo. En Fenicia, Gaughran descubrió más de 35 escritos sobre la aparición de sangre en el pan Eucarístico "la Hostia", pues el ambiente húmedo de las Iglesias medievales proporcionaba un excelente medio de incubación para el crecimiento de S. marcescens (107). Debido a que el pan Eucarístico simbolizaba la conversión en el cuerpo de Cristo, la aparición de sangre sobre la Hostia representó un dramático testimonio de este dogma.

Desafortunadamente, muchos de estos episodios también sirvieron como base para la persecución de los judíos, quienes deshonraban la Hostia. Scheurten (14,107), afirmó que debido al fanatismo religioso de esos tiempos contribuyó con mas muertes causadas por este saprófito que las causadas por otras bacterias patógenas.

Fue hasta principios del siglo XIX que la aparición de esta sangre milagrosa se atribuyó a un microorganismo. En esta época, un campesino italiano observó una decoloración sanguinolenta en el alimento del maíz "polenta", lo cual se atribuyó a una venganza divina, porque había sido hecha del maíz que había sido negado al hambriento durante la carestía de 1817 (91).

Bartolomeo Bizio, un joven farmacéutico, demostró que el fenómeno era causado por microorganismos vivos a los cuales confundió con hongos. Bizio, llamó a este organismo con el nombre S. marcescens. Serratia en honor al físico italiano Serafino Serrati, (quien Bizio pensó que había sido menospreciado en favor de los americanos como los primeros inventores del buque de vapor) y Marcescens (del latín "decae") debido a que Bizio observó que el pigmento desaparecía rápidamente cambiando de un color rojo a un rosa pálido.

Los experimentos de Bizio fueron de interés histórico, porque además de las contribuciones mencionadas, fue el primero en usar medios sólidos, como la harina de maíz, para el cultivo de esta bacterias (108).

En 1848, Ehrenberg llamó a este microorganismo "Monas prodigiosus" o "la bacteria milagrosa", posteriormente le fue dado el nombre de "Bacilus prodigiosus". En 1920 , se realizaron estudios taxonómicos de la bacteria la cual condujo a la adopción del nombre que originalmente había propuesto Bartolomeo Bizio. En la nomenclatura bacteriana S. marcescens, es en edad uno de los microorganismos más antiguos, exceptuando los géneros de Vibrio cuyos datos existen desde 1771 y los del género Polyangium que son conocidos desde 1809.

El primer caso clínico atribuido a S. marcescens, fue debido a la presencia de su pigmento rojizo aislada en la orina de un paciente con problemas urinarios , esto fue reportado antes de que Woodward y Clarke en 1913 (109), dieran a conocer el aislamiento de la bacteria en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas y episodios repetitivos de expectoraciones teñidas de color rojo. Sin embargo, al examen microscópico no se encontraron células sanguíneas, un gran número de bacterias Gram negativas. En 1957 hubo reportes similares de Robinson y Woalley, quienes acuñaron el término de "pseudohemoptisis", para este síndrome (110).

En 1958 Waisman y Stone ,(111) , reportaron la aparición del "síndrome del pañal rojo" en un bebé del Hospital de la Universidad de Wisconsin. En ese tiempo ya era conocido el "síndrome del pañal azul", causado por el metabolismo anormal del triptofano. El padre del infante, un genetista, sospechó de un problema innato del metabolismo del bebé. Dedicados a resolver , el problema aislaron a la bacteria S. marcescens, de las evacuaciones del niño. La espectrofotometría de absorción verificó que la coloración en los pañales se originó del pigmento producido por la bacteria.

Posteriormente, los mismos investigadores descubrieron que una cepa pigmentada de S. marcescens, había sido usada como marcador biológico en estudios de aerosoles por la Armada de los Estados Unidos. Esta era antigénicamente idéntica a la cepa aparecida en el pañal del infante.

En 1906, Gordon realizó estudios en los miembros de una familia donde había aparecido una epidemia por influenza. Él recuperó colonias pigmentadas de S. marcescens, en placas de agar que había salpicado con esputo de la tos y estornudos (14).

En los años setenta estudiantes de Microbiología de un laboratorio de prácticas rociaron en sus guantes de cirugía una suspensión de S. marcescens, para demostrar que la bacteria podía esparcirse con solo agitar las manos.

Como marcador biológico S. marcescens, jugó un papel importante en muchos experimentos clásicos, permitiendo así un mejor entendimiento de los mecanismos de infección en el humano. Los experimentos llevados a cabo bajo control, realizados en 1920, probaron la hipótesis de que las infecciones del aparato respiratorio podían ser transmitidas a través de las manos contaminadas con la bacteria. Cuming, en un experimento realizado por su grupo, roció a un conjunto de soldados americanos en las gargantas, los labios y la boca, con una solución que contenía a la bacteria. Posteriormente aisló al microorganismo de las manos e incluso de utensilios y cavidades orales de otros soldados no infectados (113).

Tiempo después, Kass y Schneideman (117), documentaron ampliamente que la entrada del microorganismo en el tracto urinario ocurría por la introducción de catéteres en la vejiga. Esto lo demostraron introduciendo a la bacteria a través de catéteres por el epitelio perineal en tres pacientes con problemas urinarios. A los tres días, estos investigadores recolectaron de la orina de sus pacientes cantidades del organismo prueba. Laurenzi y colaboradores (118), aplicaron una suspensión que contenía a la bacteria en la boca y faringe de pacientes con infecciones en el tracto respiratorio bajo, para usarlo como marcador contaminante en la obtención de esputo por la boca.

El uso más controversial de S. marcescens fue su utilización como marcador biológico desarrollado en experimentos de aerolización llevados a cabo por las Fuerzas armadas de los Estados Unidos de Norteamérica, para estudiar la vulnerabilidad de una población a una guerra bacteriana en aquel país (113).

En los años de 1950-52, buques navieros lanzaron al océano suspensiones conteniendo S. marcescens, en forma aerosol. Estos fueron llevados por las olas hacia la Bahía de San Francisco. Las estaciones donde se estuvo monitoreando al microorganismo, aislaron la bacteria del aire en un área de aproximadamente 80 metros cuadrados. El interés público sobre estos experimentos fue iniciado por los informes publicados en diciembre de 1976, en los cuales se mencionaba que el hospital de San Francisco había experimentado un brote epidémico, el cual coincidía con los experimentos de la aerolización que habían sido realizados en 1950. Wheat y colaboradores (119), habían informado de once casos de infecciones del aparato urinario en el hospital de la Universidad de Stanford, San Francisco, uno de los pacientes falleció por endocarditis, este fue el primer caso conocido de infección causada infección por S. marcescens. En 1951, cuando se usó al microorganismo en experimentos de aerolización en el Condado de Alabama y Florida (113), el número de pacientes afectados por neumonía aumentó considerablemente debido a la contaminación por esta bacteria.

Como resultado de estos informes, la existencia de las pruebas biológicas se hicieron del dominio público. El subcomité del Senado de los Estados Unidos de Norteamérica inició en 1977 las investigaciones al respecto. Sin embargo los senadores decidieron mantener en secreto los resultados de los experimentos en los que participaban un gran número de personas que no tenían conocimiento de las pruebas. Por otra parte, el senador Richard Scheneiker reprochó a la armada de los Estados Unidos por continuar usando suspensiones que contenían a S. marcescens, como marcador biológico, ignorando el hecho de que a principios de 1952 el personal de la armada había sido informado de la epidemia ocurrida en el hospital de Stanford. Sin embargo, a pesar de estas notificaciones, se continuo usando a este organismo como marcador biológico hasta el año de 1968, año en el cual la administración del presidente Nixon, suspendió los experimentos.

Posteriormente, se planteo la duda de que los experimentos de aerolización, pudieron haber sido la causa de las infecciones, ya que el centro de control de enfermedades en Atlanta, Georgia, reportó que de 100 brotes causados por la bacteria S. marcescens

en ninguno se encontró el serotipo y biotipo como el usado por la armada de aquel país, en los experimentos realizados en años anteriores.

Los trabajos de Wheat son pioneros en la descripción e identificación de las enfermedades nosocomiales.

En 1973 Fisbach informó de un caso de osteomielitis causada por S. marcescens, en un adicto a la heroína, a este informe le siguieron muchos más que reportaban, enfermedades causadas por esta bacteria como: endocarditis, artritis, neumonía, estos diagnósticos fueron compartidos por todos los pacientes ya que eran también adictos a la droga. Posteriormente, Mills y Drew (121), describieron 19 casos de endocarditis causados por S. marcescens, que se presentaron en San Francisco entre 1963 a 1974. Hasta el año de 1976 en la literatura inglesa sólo habían reportado 12 casos de endocarditis por esta bacteria. En contraste a los reportados por la literatura, la mayoría de los casos de infecciones por S. marcescens diagnosticados en San Francisco, también estaban asociados a drogadictos, quienes presentaban una frecuencia alta con complicaciones de embolia y rechazo a los antibióticos.

En un principio se pensó que la posible vía de entrada de S. marcescens, al organismo probablemente era a través de la vía intravenosa, por lo observado en los adictos a las drogas. Sin embargo, esto no se pudo corroborar puesto que no se hicieron los estudios pertinentes. Mills y Drew, en sus investigaciones sugirieron la posibilidad de que el microorganismo responsable de las infecciones fuera la bacteria utilizada en los experimentos de aerolización realizados por la Armada de los Estados Unidos y que por lo tanto los individuos se infectaron a través de la vía aérea.

En oposición a esto, la Armada argumentó que, durante la realización de sus experimentos en el año de 1952, la bacteria moría rápidamente y no existía viabilidad después de 24 horas. Por lo tanto, ellos consideraron improbable que estos organismos pudieran ser viables después de tantos años, tomando en consideración el período que existía entre el primer caso de endocarditis provocada por S. marcescens y los experimentos realizados por ellos. Posteriormente se determinó que el serotipo de las cepas que fueron usadas en los experimentos de aerolización, fueron diferentes

de los múltiples serotipos de S. marcescens, aisladas de pacientes con endocarditis .

La reciente notoriedad de S. marcescens, es debido a su importancia como agente causal de serias infecciones intrahospitalarias. En reportes iniciales, se reconoció que existían cepas pigmentadas y no pigmentadas que estaban registradas en la literatura inglesa, involucradas en infecciones nosocomiales (102). Ewing y colaboradores (120), estudiaron un gran número de aislados provenientes de diferentes hospitales. Ellos observaron, que algunos serotipos predominaban en un determinado hospital, sugiriendo que estas infecciones eran el resultado de la infección cruzada entre los pacientes que se encontraban hospitalizados.

La primera descripción de infecciones causadas por S. marcescens en hospitales, fue realizada por Wheat, donde reportó once casos en un periodo de seis meses en 1951, en el Hospital de la Universidad de Stanford. En 1952, Rabinowitz y Scheffrin (116), reportaron el primer brote atribuido a un foco de diseminación; once de los casos fueron de meningitis y los otros debido a infecciones en heridas y artritis. La diseminación ocurrió en un hospital pediátrico, la infección se debió a la introducción por vía venosa ó local de solución contaminada por dicha bacteria .

En 1966, McCormack y Kunin, describieron una epidemia en los cuñeros donde estaban 27 recién nacidos. Se cree que el punto de infección fueron las tapaderas de las soluciones salinas con las que limpiaban los cordones umbilicales. Las soluciones contaminadas con S. marcescens, que habían sido causa de las otras epidemias incluyeron desinfectantes, el agua de los nebulizadores, los aparatos de presión, catéteres, soluciones intravenosas y las lociones de las manos.

Desde entonces se ha observado que dicha bacteria crece con facilidad en ambientes húmedos, incluyendo medicamentos en solución. El instrumental médico, que mas comúnmente contribuye a la dispersión de esta bacteria en epidemias intrahospitalarias son los respiradores, los aparatos de terapia de oxígeno y de presión, los nebulizadores ultrasónicos, los catéteres, las agujas, los monitores de presión arterial y aparatos para broncoscopias. Las cerdas de los cepillos de aseo también resultaron

ser una fuente constante de contaminación y causa de las epidemias ocurridas en la unidad de cuidados intensivos de un hospital donde dichos cepillos se utilizaban para el aseo de los pacientes. Igualmente se han reportado a grandes epidemias asociadas a dicha bacteria, cuando a través del personal médico manipula aparatos en el tracto genitourinario, en diálisis peritoneales, en hemodiálisis, en transfusiones sanguíneas y en punciones lumbares etc. Así como la transmisión mano a mano a través del personal hospitalario.

La infección del tracto genitourinario ocurre por la introducción de catéteres contaminados en la vejiga, mientras que la del tracto respiratorio ocurre principalmente en pacientes que han sufrido manipulaciones médicas.

El tracto gastrointestinal no es un importante reservorio de infección por S. marcescens, en los adultos, pero puede ser un reservorio primario en niños.

Otros factores importantes en la adquisición de la infección incluyen, pacientes inmunosuprimidos que han sido sometidos a cirugía, o que han tenido una terapia a base de corticoides. No se conoce bien si estos factores de riesgo son independientes o están asociados a una hospitalización prolongada, al uso de un gran espectro de antimicrobianos, o a la inadecuada manipulación de pacientes con problemas respiratorios y urinarios.

Una vigilancia adecuada a las infecciones hospitalarias ha sido importante para contrarrestar o combatir las infecciones por S. marcescens. La identificación de el punto de entrada del organismo infeccioso y su localización permitirá iniciar medidas de control. En las epidemias donde no se conoce la fuente de entrada de la bacteria, deberá implantarse de inmediato el control de la infección para restringir el área de localización y evitar la diseminación. Las infecciones por S. marcescens, podrán responder a las medidas de control siempre y cuando dichas medidas sean estrictamente cumplidas. Estas incluyen: el lavado de manos, la esterilización, un adecuado manejo de catéteres, el uso moderado de antisépticos y el aislamiento de los pacientes infectados.

El uso de antimicrobianos, es comúnmente aceptado como factor de riesgo para el desarrollo de las infecciones por S. marcescens (89). Se ha documentado que el uso indiscriminado de drogas antimicrobianas ha contribuido al surgimiento de infecciones por cepas resistentes de S. marcescens.

El brote infeccioso más dramático producido por las bacterias resistentes, ocurrió en Nashville, Tennessee (113), donde una cepa resistente a todos los antibióticos disponibles comercialmente, infectó a los pacientes de cuatro hospitales que se localizaban en diferentes áreas. En uno de los hospitales en abril de 1973 se aislaron cepas antibiótico-resistentes de la orina de un paciente con catéter urinario. A fines de 1974, las cuatro instituciones en esa área presentaron brotes de infecciones por el mismo organismo el cual fue identificado por el serotipo, la sensibilidad a los antimicrobianos y tipos de fagos. En un período de 21 meses hubo 210 pacientes infectados por dicha bacteria y 21 pacientes presentaron bacteriemia. Subsecuentemente uno de los cuatro hospitales experimentó una segunda epidemia por Klebsiella sp. multiresistente.

Con respecto a la resistencia a antibióticos de S. marcescens, se sabe que este organismo es sensible a la kanamicina y susceptible a la gentamicina (124). Sin embargo, actualmente se ha demostrado la existencia de cepas de S. marcescens, que son resistentes a múltiples antibióticos incluyendo los anteriores, esto reportado por Maderiros y O'Brien quienes descubren que la adquisición de plásmidos en S. marcescens, confieren dicha resistencia (114). Los organismos fueron invariablemente resistentes a: cefalotin, tetraciclina, penicilina, cloranfenicol, ácido nalidixico, trimetropin-sulfametaxol y algunos aminoglucósidos de la bacteria que llevaban a cabo la resistencia antimicrobiana a los cuales la cepa había sido previamente susceptible.

En México se ha reconocido la importancia de esta bacteria nosocomial. Existen publicaciones en las que se describen las epidemias de esta índole. La primera epidemia de septicemia y meningitis se describió en el Hospital Manuel Gea González en 1987 la cual se repitió en 1989. La otra epidemia fue reportada en el Instituto Nacional de Pediatría, en la Unidad de Terapia Intensiva y Neonatología en los meses de Marzo a Mayo de 1988 y 1990. El último brote epidémico ocurrió en 1996 en el

Centro Médico Siglo XXI en los meses de Junio y Julio. La transmisión intrahospitalaria de S. marcescens, probablemente ocurrió "vía pasiva", a través de las manos del personal del hospital. (2,5, 24).

Posteriormente, se realizaron diferentes experimentos para evidenciar cual era el posible factor de patogenicidad de la bacteria. Uno de éstos está relacionado con la hidrofobicidad de su membrana externa, la cual le permite al organismo adherirse a una gran variedad de superficies como son: el aceite, agua, sedimentos marinos, células epiteliales, fagocitos, plásticos entre otros. Se ha sugerido que la hidrofobicidad es dependiente de la temperatura de incubación, siendo menor el grado de hidrofobicidad a temperaturas mayores de 36 °C. La hidrofobicidad en S. marcescens es un mecanismo de supervivencia en el medio ambiente (9).

En estudios recientes se observaron las propiedades adherentes de las cepas de S. marcescens aisladas de pacientes hospitalizados, las cuales fueron capaces de adherirse a hidrocarburos y plásticos de poliestireno, sugiriendo con ello un posible papel de la hidrofobicidad de la superficie celular en la de la colonización. También se han sugerido que la capacidad hidrofóbica de las bacterias puede ser causada por proteínas de la superficie celular como la proteína de peso molecular de 70kDa, llamada Serrafobina (79).

Las proteasas y endonucleasas al parecer también juegan un papel importante en su patogenicidad, de estas, una proteína de 56kDa que activa el factor Hageman y consecuentemente la cascada Hageman-kallicreina-quinina, permite un aumento en la permeabilidad vascular, dando como resultado la queratitis en animales de experimentación. La otra proteasa estudiada es de 54kDa que parece tener efectos extracelulares (44).

La mayoría de los estudios sobre S. marcescens han estado encaminados a la tipificación por diferentes métodos como: tipificación por fagos, por bacteriocinas, antibiogramas y la serotipificación. Sin embargo, poco se conoce acerca de los componentes proteicos de esta bacteria y no se ha estudiado el papel que estos juegan durante la infección. En este trabajo se propone ahondar en el conocimiento de los

componentes proteicos de S. marcescens con énfasis en las proteínas de la membrana externa de cepas aisladas de pacientes hospitalizados durante una epidemia en el Instituto Nacional de Pediatría.

II.- IDENTIFICACION.

a) Características microbiológicas

i).-Características microscópicas

- Son bacilos Gram negativos en forma de varilla delgada con extremos redondeados.
- Móviles mediante flagelos peritricos.

ii).-Características macroscópicas

- Presentan colonias grandes, lisas de bordes irregulares, opacas, además producen pigmento rojo , pero pueden ser blancas o rosas.
- En medio de agar sangre producen hemólisis dependiente de la temperatura.
- Condiciones de cultivo:
- pH del cultivo puede ser de 5 a 9.
- Temperatura de incubación de 18 a 37°C.

Se ha reconocido a S. marcescens en el laboratorio de diagnóstico bacteriológico por la capacidad de producir un pigmento rojo. Edward y Ewing (120), hicieron numerosos aislamientos, en los cuales comprobaron que únicamente el 27% de dichas cepas tenían esa característica. Magnuson y colaboradores (115), informaron de aislados de esta bacteria que no producía dicho pigmento cuando se sembraban en medios de tioglicolato, agar sangre y agar MacConkey incubadas a 37 °C, además observaron que en medio líquido, presentaba una turbidez con sedimento grisáceo.

Roemisch y col. (89) demostraron que las pruebas ideales para identificar a S. marcescens, aislada de especímenes clínicos en un laboratorio de rutina, incluyen : pruebas bioquímicas, identificación del serotipo, resistencia a los antibióticos, así como la tipificación de bacteriocinas que pueden ser de gran utilidad, ya que presentan variaciones con respecto a otras cepas.

b) Pruebas bioquímicas

Williams y col. (96), efectuaron las siguientes pruebas bioquímicas y encontraron que fueron positivas para el uso del citrato y la lisina descarboxilasa , presentaron movilidad positiva, y la reducción de nitratos a nitritos, además licúan la gelatina de 24 a 48 horas, no producen indol, no manifiestan actividad de ureasa en una semana, fermentan la dextrosa y sacarosa sin la producción de gas. La fermentación de la lactosa es variable, la prueba de rojo de metilo es negativa y las pruebas de Voges-Proskauer y catalasa son positivas.

Wiloswske C. J. (79), hizo pruebas bioquímicas con 176 cepas de S. marcescens, los resultados se muestran en la tabla 3, de la que se concluye que estas pruebas son útiles para la diferenciación de la S. marcescens. Con respecto a otras de la Familia de las Enterobacterias, ya que a diferencia de las otras producen Dnasa y licúan la gelatina, no utilizan el malonato y no fermentan arabinosa, rafinosa y rhamnosa.

c) Sensibilidad a los antibióticos

Sanders y colaboradores (123), demostraron en 80 aislamientos de S. marcescens, la resistencia a una gran variedad de antibióticos, 19 de los 80 aislamientos, aproximadamente un 15% fueron resistentes a cefalotina, tetraciclina, ampicilina, estreptomina, kanamicina, cloranfenicol, cefalosporina, sulfonamida. Posteriormente Meer y col., encontraron que la bacteria era sensible a la amikacina, ácido nalidixico y trimetropin. Se ha considerado también a la gentamicina como el antibiótico de elección, pero estudios recientes han demostrado que existen cepas resistentes a este antibiótico (1, 72).

d) Composición química del pigmento

Se le dio el nombre de PRODIGIOSINA, a la sustancia de color rojo que produce S. marcescens. Fue Kroft, quien aisló y caracterizó por primera vez este pigmento. El encontró que es una sustancia insoluble en agua, con una composición química de 2-metil-3 amyl-6 metoxy prodigiosina. Posteriormente se encontró que este pigmento rojizo poseía propiedades antibióticas, antigénicas y antitumorales. Otras características observadas y referidas en varias investigaciones indican que la "prodigiosina" es probablemente un complejo de componentes que están íntimamente relacionados y los cuales podrían separarse en fracciones con propiedades antibióticas (125).

Considerando la naturaleza antibiótica de la "prodigiosina", ésta ha llegado a utilizarse en el tratamiento de ciertas infecciones bacterianas. También se han reportado estudios acerca de factores de resistencia de S. marcescens, a diferentes antibióticos. Wedges y col, estudiaron en 166 cepas de S. marcescens, y observaron que eran resistentes a la polimixina B, esta resistencia pudo ser transferida a las cepas de E. coli K12 y K27 (84).

Existen publicaciones recientes acerca de la producción de bacteriocinas por S. marcescens, como son la MARCICINA A y la MARCICINA B. Estas moléculas son proteínas que producen acción letal sobre otras bacterias. La MARCICINA A es ligeramente más pesada que la MARCICINA B y son resistentes a la acción de la tripsina.

e) Composición de la membrana externa en las bacterias Gram-Negativas

En las bacterias Gram-negativas la envoltura celular es sumamente compleja por estar compuesta de múltiples capas. La membrana citoplasmática llamada así en las bacterias Gram positivas, denominada membrana interna en las bacterias Gram negativas; esta última se encuentra rodeada por una capa laminar sencilla de peptidoglucano a la cual está anclada una capa compleja llamada membrana externa. También existe una cápsula variable en composición que rodea al conjunto. El espacio que se encuentra entre ambas membranas se denomina espacio periplásmico. La membrana externa es una estructura de dos capas: una hoja externa contiene un componente único además de los fosfolípidos. Se trata del lipopolisacárido ó LPS y una hoja interna de fosfolípidos y proteínas. Como resultado las hojas de esta membrana son asimétricas y las propiedades de esta bicapa difieren considerablemente de la membrana interna. La figura 2 muestra las diferencias que existen entre las membranas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

La membrana externa es un mosaico que contiene un conjunto de proteínas específicas empotradas en una matriz de fosfolípidos (como se muestra en la figura 2), esta membrana impide la pérdida de las proteínas periplásmicas y protege a las células de la acción de las sales biliares y de las enzimas hidrolíticas del huésped.

Existen proteínas mayores que se encuentran en la membrana externa denominadas de acuerdo a los genes que las codifican y han sido clasificadas en varias categorías funcionales basándose en las bacterias mutantes que carecen de ellas. Un ejemplo de ello son las porinas que se encuentran en la matriz como son: OmpC, OmpD, OmpE, OmpF, de E. coli, S. typhimurium. En S. marcescens, se han encontrado algunas de ellas, las cuales son proteínas triméricas que penetran ambas superficies de la membrana externa.

Las proteínas forman poros que permiten la libre difusión de pequeños solutos hidrofílicos a través de esta membrana. Existen también otras proteínas que sirven

como receptores de bacteriófagos y otras que ayudan en el anclaje de la membrana externa a la capa de peptidoglucano y son también receptoras del pili sexual.

La membrana exterior también contiene proteínas pero en menor cantidad llamadas proteínas menores, algunas de las cuales participan en el transporte de pequeñas moléculas específicas. Al igual que otros organismos entéricos donde se han estudiado las características antigénicas, S. marcescens, poseen el antígeno "O" en la superficie del soma bacteriano y el antígeno "H" el cual participa en la movilidad de la bacteria. En investigaciones recientes, se ha encontrado que el antígeno "O", esta compuesto por una serie de polisacáridos al igual que en otras Enterobacterias (6, 7). En la figura 1 se observa una Enterobacteria típica., la figura 2 muestra las diferencias que existen entre la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas y las bacterias Gram negativas. La figura 3 muestra la organización molecular de la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

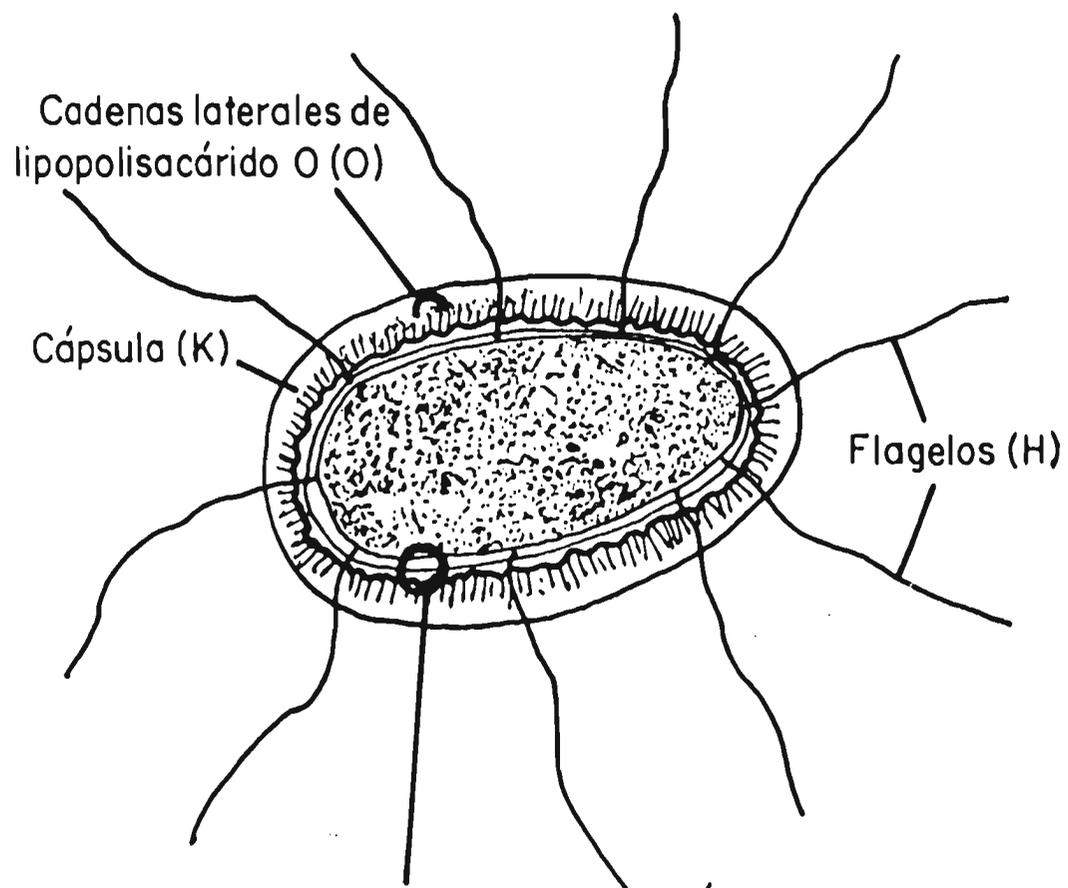


Fig.1-Cubierta celular (membrana citoplásmica, peptidoglucano, membrana exterior)

FIG. No.2

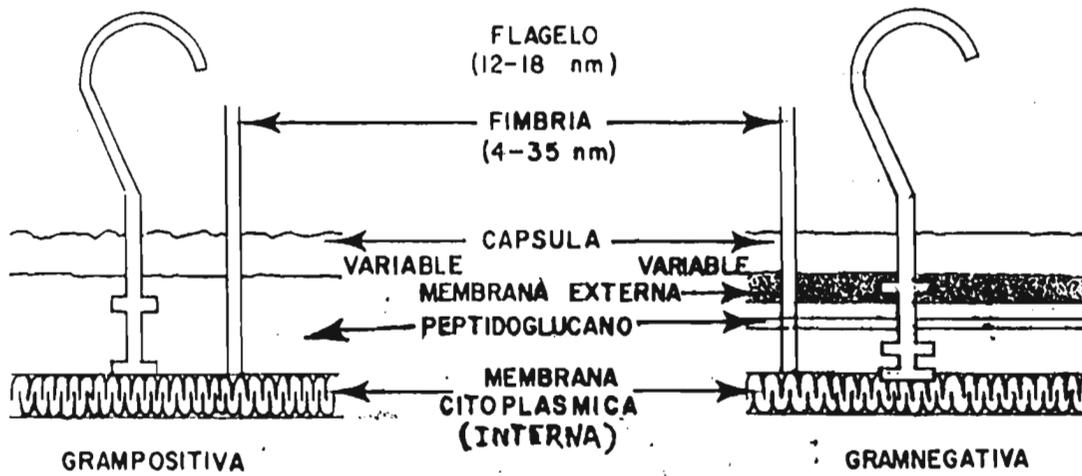


FIG. No. 3

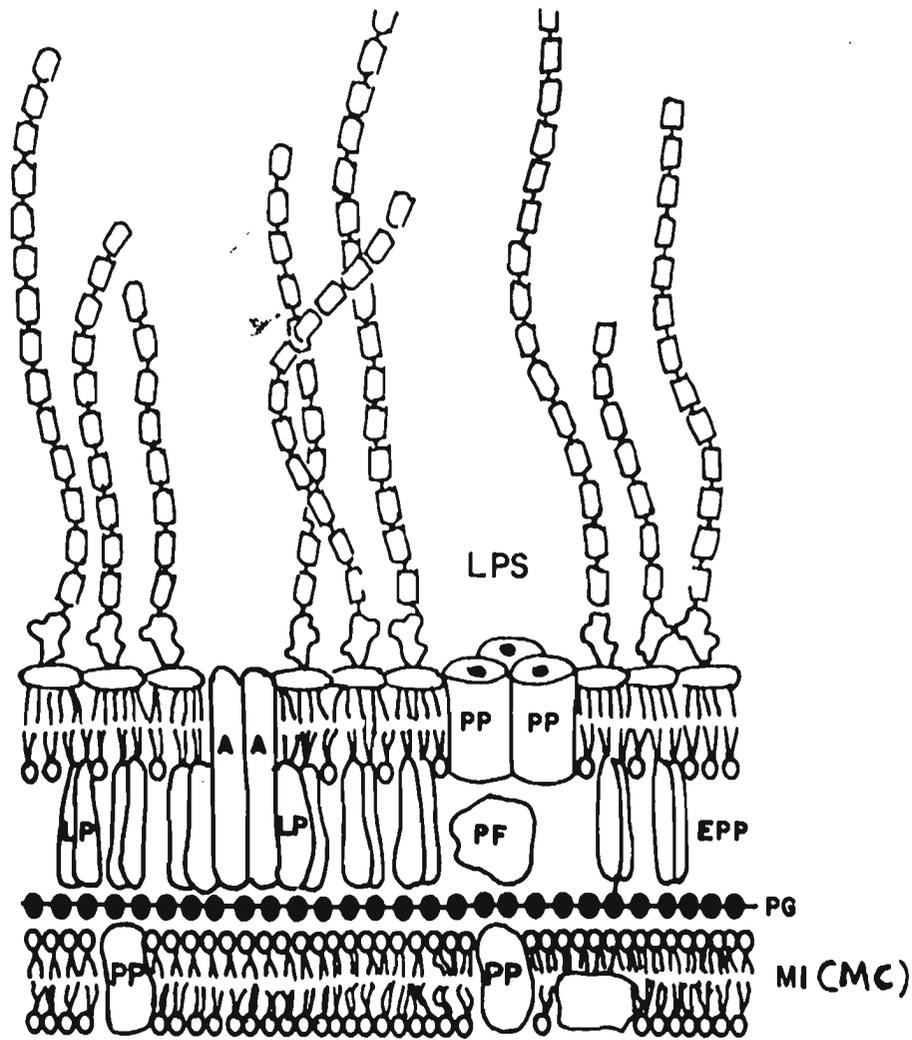


Fig.2 - ORGANIZACION MOLECULAR DE LA MEMBRANA EXTERNA

PP=PROTEINA DE PORO, LPS=LIPOPOLISACARIDO,
PF=PROTEINA FIJADORA, LP=LIPOPROTEINA, CM=MI
MEMBRANA CITOPLASMATICA, PG=PEPTIDOGUCANO,
A=PROTEINA OmpA.

III. CLASIFICACION

La bacteria S. marcescens es un bacilo Gram negativo, aerobio perteneciente a la Familia **Enterobacteriaceae**, Tribu **Klebsiella**, Genero **Serratia**. La taxonomía de este género ha sido muy confusa. Cerca de 42 especies han sido asociadas al género **Serratia sp** desde 1903, en que Hefferan clasificó a este género basándose en que el organismo producía pigmento rojo.

En 1971 Bascomb y col. , transfirieron a Enterobacter liquefasciens al género Serratia. Los últimos trabajos efectuados sobre la taxonomía de este género los han realizado Grimont y Grimont en 1977 . Ellos llevaron a cabo estudios comparativos con otros grupos, sometiendo las diferentes cepas a pruebas específicas como las que se muestran en el Cuadro 1. Posteriormente se hizo la separación de las especies de Serratia , Cuadro No.2, realizándose a la vez pruebas de crecimiento en diferentes medios y temperaturas (115).

Así tenemos la siguiente clasificación:

- Serratia marcescens
- Serratia plymuthica
- Serratia marnorubra o rubidaea
- Serratia liquefasciens
- Serratia ficaria

Tres de estas enterobacterias produjeron el color rojo llamado "Prodigiosina":

- Serratia marcescens
- Serratia plymutica
- Serratia rubidaea

S. liquefasciens fue identificada por producir un pigmento rojo de menor intensidad. También se identificaron cepas de S. marcescens, que no produjeron el pigmento rojo y que son generalmente diferenciadas de las cepas pigmentadas por otras características.

CUADRO 1Diferenciación del Género *Serratia* de otros grupos.

| Fuente de utilización del carbono | G e n e r o s | | | |
|--------------------------------------|-----------------|----------------|---------------------|-------------------|
| | <i>Serratia</i> | <i>Erwinia</i> | <i>Enterobacter</i> | <i>Klebsiella</i> |
| 1. L-rhamnosa | — | + | + | + |
| 2. D-glucosamina | + ó (+) | + | V | — |
| 3. D-glucuronato | + ó (+) | + | + | + |
| 4. Maltosa | + | + | + | + |
| 5. L y D-alanina | + ó (+) | V | (+) | + |
| 6. Caprilato | + | — | — | — |
| 7. 4-aminobutirato | + ó (+) | — (+) | (V) | (V) |
| 8. L-prolina | + | + | + | + |
| 9. L-tirosina | + ó (+) | — | — | (+) |
| 10. Pigmento amarillo | — | + | V | — |
| 11. Prueba del gluconato | — + | — | + | + |
| 12. Prueba del iodoacetato | + | + | (+) | (+) |

| <u>Fuente de utilización</u> <u>del</u> <u>carbano</u> | Serr atia | Erwini a | Enterobac ter | Klebsie lla |
|--|----------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 13. Arginina descarboxilasa | — | — | + | — |
| 14. Hidrólisis de la gelatina | + | — | — | — |
| 15. Hidrólisis de la tributirina | + ó (+) | — | — | — |
| 16. Dnasa | + ó (+) | — | — | — |
| 17. Hidrólisis de la pectina | — | — | — | — |

1. + : 90% de las cepas probadas tuvieron una reacción rápida
2. (+) : 90% de las cepas tuvieron una reacción tardía
3. - : menos del 10% de las cepas probadas tuvieron una reacción tardía.

30

CUADRO 2

CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DE LAS ESPECIES DE
SERRATIA

| <u>Fuente de utilización de carbono</u> | <i>marcescens</i> | <i>marinorubra</i> | <i>liquefasciens</i> | <i>plymuthica</i> |
|---|-------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| 1. L-arabinosa | — | + | + | + |
| 2. D-arabitol | — | + | — | — |
| 3. adonitol | + | + | — | — |
| 4. D-xilosa | — | + | (+) | + |
| 5. mucato | — | + | — | V |
| 6. D-sorbitol | + | — | + | V |
| 7. Celobiosa | — | + | (+) | + |
| 8. lactosa | — | + | V | (+) |
| 9. melobiosa | — | + | + | + |
| 10. rafinosa | — | + | + | + |
| 11. aconitato | + | (+) | — | V |
| 12. propionato | (+) | — | — | (V) |
| 13. B-alanina | (+) | — | (V) | (V) |

| | | | | |
|---------------------------------|---|---|---|---|
| 14. Producción de pigmento rojo | V | + | — | V |
| 15. Crecimiento a 5 °C | — | — | + | + |
| 16. Crecimiento a 40 °C | + | V | — | — |
| 17. Crecimiento en NaCl 8.5% | V | + | V | — |
| 18. Reducción del tetrionato | V | — | + | — |

VI. HIPOTESIS

Las proteínas de la membrana externa de Serratia marcescens, están asociadas a la patogenicidad de esta bacterias.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Caracterizar las proteínas de membrana externa (PME) en dos cepas de S. marcescens, aisladas de infecciones nosocomiales.

Objetivos particulares

- a) Estudiar y comparar el perfil proteico por electroforésis de S. marcescens dependiente de la temperatura de crecimiento a 30 y 37 °C .
- b) Identificar los antígenos de la membrana externa de esta bacteria por el método de inmunoelectrotransferencia.
- c) Determinar la presencia de anticuerpos anti-PME por la técnica de ELISA.

VI. MATERIAL Y METODOS.

MATERIAL:

1. Dos cepas de S. marcescens, aisladas de pacientes hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría donadas por el Dr. Rafael Garcia.

1.2 Se utilizaron 4 conejos de Nueva Zelanda para la obtención del sueros Anti-PME, así como ratones Balb C, un lote de 10 ratones por cada cepa .

1. Métodos bacteriológicos

1.1 Cepas bacterianas utilizadas

| <u>Cepas</u> | <u>Tiempo de</u> <u>Crecimiento</u> | <u>Temperatu</u> <u>ra</u> | <u>Fuen</u> <u>te</u> | <u>Or</u> <u>ig</u> <u>en</u> |
|-----------------|--|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| • 62-&- 88 | 8 horas | 30 y 37°C | LCR 1 | IN P ³ |
| • 112- HV-88 | 8 horas | 30 y 37°C | HMO .C ² | IN P ³ |

1.

Extraída de liquido cefaloraquideo

2. Extraída de hemocultivo

3. INP- Instituto Nacional de Pediatría.

1.2 Cultivo de bacterias

Las bacterias se cultivaron en agar soya tripticasa, e incubadas a las temperaturas de 30 y 37°C, y cada mes se hacían pases para conservar viables a las bacterias, después de su crecimiento se mantenían en refrigeración, y de ahí se iban tomando colonias de la bacteria, para los estudios posteriores.

Las bacterias empleadas en la obtención de las PME fueron crecidas durante 8 horas a 30 y 37°C, utilizando el medio de cultivo de caldo soya tripticasa. Posteriormente las bacterias se cosecharon en fase de crecimiento logarítmico por centrifugación a 4500 r.p.m. durante 15 minutos a 5°C. La pastilla bacteriana se resuspendió en amortiguador Hepes 0.01M a un pH= 7.2, se hicieron alícuotas para congelarse para su posterior utilización.

2. Aislamiento de las proteínas de la membrana externa (PME) de Serratia marcescens

Para la obtención de las PME de S. marcescens, de las cepas (62-&-88 y 112-HV-88), estas se incubaron a las temperaturas de 30 y 37°C, su extracción se realizó de acuerdo a los métodos de Schnaitman y Filip. Para ello, las bacterias cosechadas en fase logarítmica se ajustaron a una densidad óptica de 1.0 leídas a 660nm en un espectrofotómetro. Después de este paso se procedió al rompimiento de las células mediante sonicación a 120W por un periodo de 2 minutos dando tres pulsaciones cada 30 segundos en baño de hielo (Lab.line labsonic system) hasta disminuir la absorbancia a 0.3. Para eliminar las bacterias enteras de la suspensión sonicada, ésta se centrifugó a 7000 xg durante 15 min. El sobrenadante de el sedimento que corresponde a la envoltura celular se centrifugó a 200,000 xg durante 45 min., a 4°C (L8 60 ultracentrifuge Beckman Instruments Inc.), la envoltura celular se solubilizó con Tritón X-100 al 2% en Hepes 0.01 M pH 7.4. La fracción insoluble en Tritón X-100 (membrana externa y peptidoglucano), se sedimentó por

ultracentrifugación en las condiciones antes mencionadas, para lograr la extracción de las PME se resuspendió en Tris-HCl pH 7.2 que contenía Tritón X-100 al 2% y 5mM de EDTA, añadiéndose Mg_2 en forma de $MgCl_2$ para proteger a las PME de la solubilización, se incubó durante 10 min., a 37°C. Las PME se recuperaron en el sobrenadante y se mantuvieron a -70°C, hasta que se utilizaron. El mismo procedimiento se utilizó por el método de Filip excepto que aquí se utilizó el detergente Sarkosyl al 2% (launil sarcosinato de sodio), sin necesidad de agregar $MgCl_2$ donde observamos que es mejor este método ya que no solubiliza a las PME obteniéndose intactas (10,57,97).

2.1 Número de bacterias utilizadas para Inmunizar conejos

Para calcular el número de bacterias que se utilizaron para inmunizar a los animales, se realizó la comparación con el Tubo 3 de MacFarland con el extracto de PME observando la turbidez y leídas en un nefelómetro.

Normas de Sulfato de Bario del Nefelómetro de McFarland:

I. Propósito:

1.1 Permite medir la turbidez de un líquido o efectuar el recuento bacteriano de una suspensión.

1.2 Preparación de los reactivos.

Preparar soluciones al 1% de cloruro de bario acuoso y ácido sulfúrico acuoso al 1%.

Agregar las cantidades indicadas en el siguiente cuadro, a tubos que tengan la misma medida de diámetro y tamaño, los cuales deben de estar limpios y secos para se usados en determinaciones subsiguientes (31).

PREPARACION DE ESTANDAR DE SULFATO DE BARIO
EN EL NEFELÓMETRO DE McFARLAND

| tubo | cloruro de bario 1% _{mL} | ácido sulfúrico 1% _{mL} | densidad de bacterias que corresponden aprox. a millones/ _{mL} |
|------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | 0.1 | 9.9 | 300 |
| 2 | 0.2 | 9.8 | 600 |
| 3 | 0.3 | 9.7 | 900* (fue el utilizado) |
| 4 | 0.4 | 9.6 | 1,200 |
| 5 | 0.5 | 9.5 | 1,500 |
| 6 | 0.6 | 9.4 | 1,800 |
| 7 | 0.7 | 9.3 | 2,100 |
| 8 | 0.8 | 9.2 | 2,400 |
| 9 | 0.9 | 9.1 | 2,700 |
| 10 | 1.0 | 9.0 | 3,000 |

2.2 *Cuantificación de proteínas*

La cuantificación del contenido de PME obtenidas por el método de Schnaitman, se realizó por el método de Lowry y col. Este método consiste en hacer reaccionar a las proteínas con el cobre en medio alcalino, en el cual se forma un complejo colorido cuya intensidad se incrementa al agregarse el reactivo Folin-Ciocalteau. Como proteína de referencia se empleó albúmina sérica bovina (Sigma Co) (61).

2.3 *Obtención de sueros policlonales Anti-PME en conejos*

Con el objeto de obtener anticuerpos anti-PME se inmunizaron 4 conejos de Nueva Zelanda de aproximadamente 2.5 Kg., de peso y de 3 meses de edad.. Estos animales (4) fueron inmunizados dos veces por semana (Lunes y Viernes) durante un mes con el

extracto crudo que contenía las bacterias incubadas a 30 y 37°C. Se utilizó un conejo por cada cepa y por cada temperatura. (2 para la cepa 62-&-88 incubada a 30 y 37°C), y (2 para la cepa 112-HV-88 incubada a 30 y 37°C),, como se señala en el esquema de inmunizaciones.

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

| <u>Lunes</u> | <u>Viernes</u> |
|----------------|----------------|
| 0.5- 0.5 ml. * | 0.25 ml. |
| 0.75 ml. | 1.0 ml. |
| 1.5 ml. | 2.0 ml. |

*. 0.5 ml- 0.5ml (refuerzo).

- Se dejaron descansar una semana sangrando del viernes.
- Se inmunizó vol/vol. de muestra y adyuvante incompleto de Freud.

Las inmunizaciones se llevaron a cabo en diferentes partes del lomo utilizando pequeñas cantidades de la muestra. Estas partes del cuerpo del conejo fueron previamente rasuradas y limpiadas escrupulosamente. Los animales fueron inmunizados dos veces por semana las dosis se aplicaron vía subcutánea. A la semana siguiente de la última inmunización los animales se sangraron por unción intracardiaca, obteniéndose aproximadamente 20 ml. de suero por conejo. Este se alicuotó y se almacenó en congelación hasta uso. A la semana siguiente, los animales recibieron un refuerzo en las mismas condiciones que la primera inmunización, volviéndose a sangrar a blanco a los ocho días.

Sueros humanos:

Se obtuvieron sueros provenientes de enfermos hospitalizados en el INP. Los pacientes presentaban infecciones de diversos tipos, se utilizaron 11 sueros de enfermos. Como controles se utilizaron 4 provenientes de voluntarios (sanos).

3. Métodos analíticos

3.1 Separación de las PME de S. marcescens por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

La separación de los extractos antigénicos por peso molecular se realizó por electroforesis en geles homogéneos de poliacrilamida al 10% con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se siguió en términos generales el método descrito originalmente por Laemmli en 1970 (92). Se utilizó un equipo Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad*). Las proteínas se separaron a un voltaje constante de 100 volts durante aproximadamente dos horas con una fuente de poder Bio-Rad Modelo 200/2.0. Se usó amortiguador de comimiento constituido por 0.025 M, Trizma-base (Tris hidroximetil aminometano), 0.192M de glicina y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1%, pH 8.3. Las muestras fueron preparadas separadamente en una dilución 1:1 en un amortiguador constituido por 3.125 ml, de Trizma-base 1 M, pH 6.8, 5 ml, de glicerol, 1.25 ml, de SDS al 10% , 2.5 ml de & mercaptoetanol, 2.5 mg de azul de bromofenol y agua desionizada para aforar a 25 ml y se sometieron junto con los marcadores de pesos moleculares a ebullición en baño maría durante 5 minutos. También se hicieron comimientos sin poner a ebullición la muestra . 10-15 ug de proteína fueron cargados por carril. Los marcadores de peso molecular utilizados tenían un rango de 19,400 a 105,000 Da (Bio-Rad). Después de la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 (Sigma).

* Todos los reactivos y equipos de Bio-Rad provienen de Bio-Rad Laboratories, Hércules, CA. USA.

3.2 Tinción de los geles de poliacrilamida

La tinción de los geles se llevó a cabo durante 2 horas en una solución de Azul de Coomassie (Sigma Co, USA,) y la solución para desteñir se preparó como sigue: se usó metanol al 30%, ácido acético al 10% y 600 mL de agua destilada. El exceso de colorante se removió con varios cambios con la solución para desteñir geles hasta que pudieron observarse las bandas de proteínas.

3.3 Electroinmunotransferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa e inmunodetección

Para determinar la presencia de anticuerpos en contra de extractos antigénicos se utilizaron sueros provenientes de pacientes del hospital (INP) y de los obtenidos en los conejos inmunizados, la reactividad de los sueros se estudió por inmuno-electrotransferencia, siguiendo en términos generales los lineamientos descritos por Towbin en 1979 (67); una vez realizada la corrida electroforética, el gel se transfirió en papel de nitrocelulosa con poro 0.45 μm (Bio-Rad). La transferencia se hizo en un aparato Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) con voltaje constante de 100 volts durante 60 min. con amortiguador de transferencia constituido por Tris-Base 0.025 M, glicina 0.192 M y metanol 20%, pH 8.3. Después de concluida la transferencia, el papel de nitrocelulosa se bloqueó con albúmina al 3% en PBS durante 2 horas a 4 °C, se agregó el suero de referencia en dilución 1:200 y se incubó toda la noche a 4 °C con agitación ligera. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 20 al 0.1% y posteriormente se colocó el conjugado anti-IgG de conejo obtenido en cabra unido a peroxidasa (Sigma) en dilución 1:2000 durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron otros tres lavados y se colocó como sustrato una solución de Tris HCl-NaCl 10mM y 0.14 mM respectivamente pH 7.5 (8.5 ml) y 4 cloro 1 naftol 5.1 mg en 1.7 ml de metanol (1.7 ml), con 5 μL de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción se detuvo con agua destilada. A fin de verificar la transferencia de las proteínas, se cortaron dos

tiras de papel de nitrocelulosa, una tenía los pesos moleculares (marcadores) y otra una muestra de las proteínas problema, las tiras se tiñeron con 5mL de solución de negro de amido al 0.1%, con ligera agitación. Cuando las bandas fueron evidentes (aproximadamente 5 minutos), se removió el exceso de colorante con solución de metanol al 15% y ácido acético al 10% en agua destilada, durante 15 minutos en agitación. Después de secar las tiras a temperatura ambiente se comparó con el perfil electroforético de las tiras del gel con el propósito de evaluar la transferencia.

3.4 Ensayo Inmunoenzimático: ELISA

Para comprobar la presencia de anticuerpos en contra de las proteínas de membrana externa en los sueros de los conejos inmunizados con la bacteria entera, se empleó el método de ELISA. Se utilizaron placas para microtitulación de poliestireno de 96 pozos (Inmulon Y Dynatech, Labs Inc.), los cuales fueron recubiertos con 50uL, del extracto de PME, en amortiguador de carbonatos, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron dos veces con PBS-Tween 20, los pozos se bloquearon con una solución de albúmina sérica bovina al 0.5% por una hora a temperatura ambiente. Después de esto se agregaron 100uL de las diluciones del antisuero hechas en PBS-Tween, incubándose por una hora a 37°C. Después de este tiempo se lavaron cuatro veces con PBS-Tween y se añadieron 100uL, de la dilución óptima del conjugado anti-inmunoglobulinas de conejo conjugadas a peroxidasa (Sigma, Co.). La placa se incubó durante 1.5 horas a 37 °C y posteriormente se lavó tres veces con la solución de PBS-Tween. La peroxidasa se reveló por adición de 100uL de la solución de sustrato (o-fenilendiamina, H₂O₂ al 3% en amortiguador de citratos pH 5.0 y a los 20 minutos, se detiene la reacción con 30 uL. de ácido sulfúrico 2.5M. Las placas se leyeron a 490 nm, en un lector de Elisa (Behring, Germany).

Cuadro 3:

**Títulos de Anticuerpos en conejos inmunizados con S. Marcescens
(62 -&-88 y 112-HV-88) cuantificados por ELISA**

Promedio de Densidad Óptica 490

| <u>Suero</u> de <u>conejos</u> | 1º Semana | 2º Semana | 3º Semana |
|--------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Normales (1) | 0.110 | 0.102 | 0.092 |
| Normales (1) | 0.096 | 0.087 | 0.083 |
| <i>Inmunizado</i> | | | |
| 62- & - 88 30 °C | 0.680 | 0.673 | 0.575 |
| 62- & - 88 37 °C | 0.686 | 0.670 | 0.588 |
| 112- HV -88 30 °C | 0.710 | 0.690 | 0.636 |
| 112- HV -88 37 °C | 0.696 | 0.685 | 0.633 |

* Normales (no infectados)

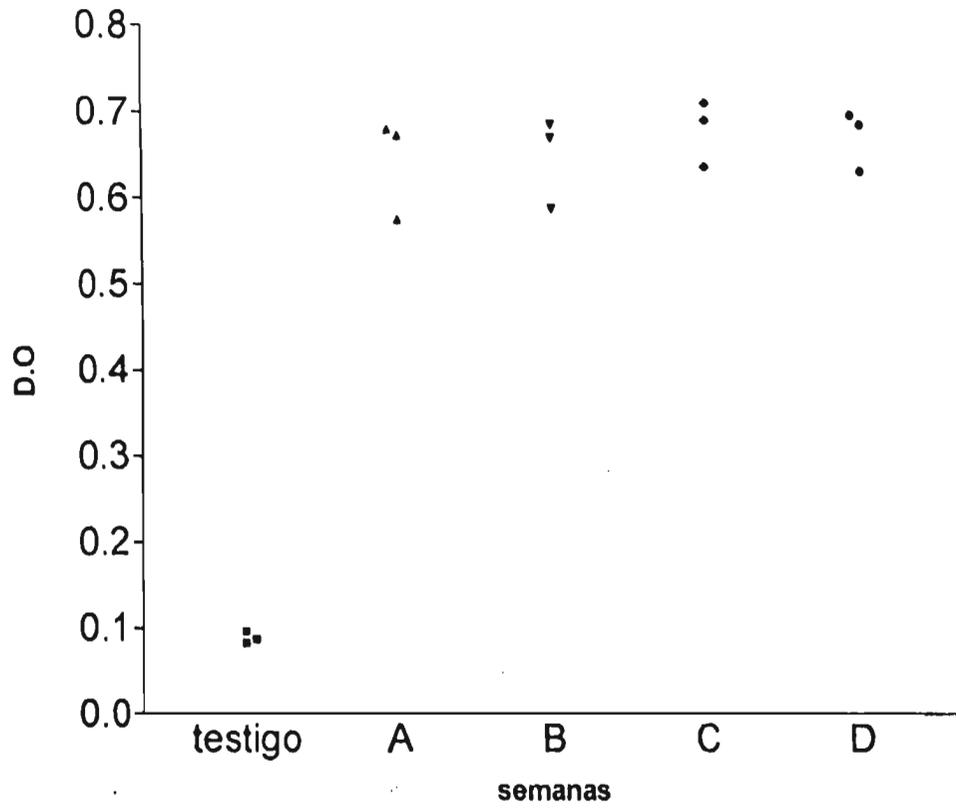
3.5 Determinación del criterio de positividad en la prueba de ELISA

El criterio de positividad de una muestra individual se determinó cuando su valor de absorbancia fue igual o mayor al punto de corte del ensayo. El punto de corte se obtuvo al sumar la media más tres veces la desviación estándar de los valores de absorbancia en los controles.

3.6 Verificación de la hemólisis

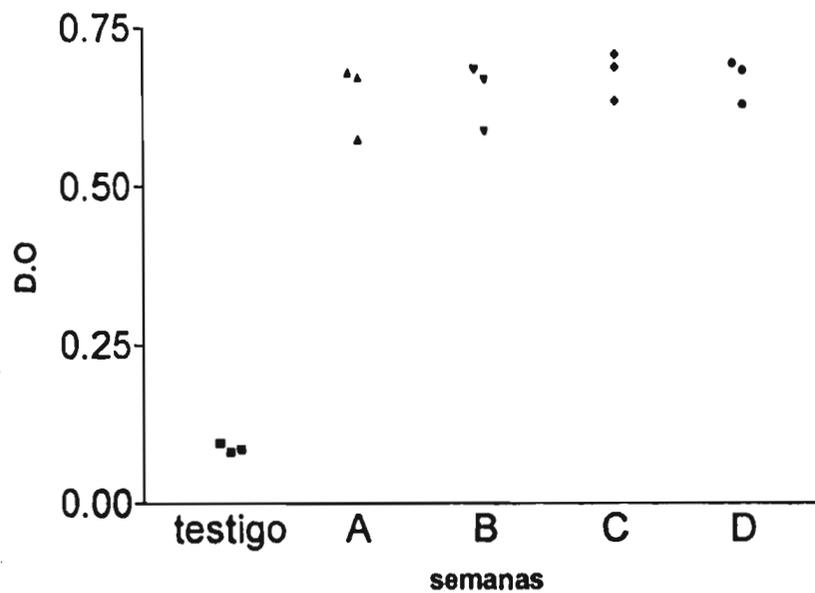
Con el fin de determinar el tipo de hemólisis que producen las cepas mencionadas anteriormente, estas fueron crecidas de medio de agar sangre de camero y en agar sangre de humano (tipo A) , fueron incubadas a temperaturas de 30 y 37°C.

Valores de absorbancia, en ELISA, de sueros de conejos hiperinmunes infectados con *Serratia marcescens* vs sueros de conejos testigos.



- testigo (1)
- ▲ A = 62- α -88 (30°C)
- ▼ B = 62- α -88 (37°C)
- C = 112-HV-88 (30°C)
- D = 112-HV-88 (37°C)

Valores de absorbancia, en ELISA, de sueros de conejos hiperinmunes infectados con *Serratia marcescens* vs sueros de conejos testigos.



- testigo (2)
- A = 62- α -88 (30°C)
- B = 62- α -88 (37°C)
- C = 112-HV-88 (30°C)
- D = 112-HV-88 (37°C)

VII. RESULTADOS.

1. Obtención de anticuerpos en animales infectados con *S.marcescens*.

1.1 *Susceptibilidad de los animales a la infección:*

La infección fue provocada tanto en ratones como en conejos de Nueva Zelanda. En el inicio de los experimentos se utilizaron conejos machos, pero se observó que estos no resistían a la infección, ya que morían a la semana, semana y media. El experimento se repitió varias veces observándose el mismo fenómeno. Se decidió entonces utilizar conejos hembras de 2.5 a 3 Kg. de peso, en las cuales se realizaron todos los experimentos ya que resistieron bastante bien la infección por *S. marcescens*, sin embargo se observa que después de varias inmunizaciones su conducta cambiaba volviéndose muy agresivas. La dosis de bacteria no letal se estableció probando diferentes dosis hasta llegar a la que utilizamos que fue la comparada con el Tubo No.3 de McFarland. Al igual que los conejos, los ratones hembras Balb C fueron mas resistentes a la infección y también presentaron diferencias en la conducta ya después de varias inmunizaciones estos presentaban canibalismo

1.2 *Análisis electroforético de las PME de S. marcescens*

El análisis de PME, se realizó por electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente continuo 10,8%. Con el propósito de estandarizar la electroforesis se probaron comimientos con diferentes tamaños de geles y concentraciones de proteínas.

En los perfiles electroforéticos se detectaron aproximadamente 12 bandas de proteínas para ambas cepas incubadas a las diferentes temperaturas (30 y 37°C). Aparentemente no se observó ninguna diferencia entre ellas. Algunas de las bandas se observan fuertemente mientras que otras se ven muy tenues. Se observó que estas bandas de proteínas se encontraban entre los rangos de pesos moleculares de 25 a 75kDa.

La figura No. 4 muestra el gel donde se utilizaron 20 ug. de PME, donde se pueden observar perfectamente las bandas, esto mismo fue observado en geles de mayor tamaño como lo muestra la Figura No.5, donde se utilizaron 50ug, de las muestras problema obteniéndose el mismo resultado que en los geles pequeños para verificar lo anterior y como se sabe es un sistema de alta resolución Phast-Gel, Figura 6 donde se utilizaron 3ug. de PME, es un sistema rápido de realizar y no se gasta mucho material, confirmando los resultados obtenidos en los experimentos anteriores.

También pudimos observar que cuando se ponían a calentar las muestras podía observarse que una banda de peso molecular de aproximadamente de 45kDa se dividía en otras dos bandas, esto lo pudimos corroborar no calentando dichas muestras donde sólo se observaba con mayor densidad dicha banda (no se anexa figura).

1.3 Reconocimiento de las PME de *S. marcescens* por inmunoelectrotransferencia con sueros de conejos y de pacientes hospitalizados.

a) Después de realizar la separación de las bandas proteínicas de la muestra problema por PAGE- SDS, de gradiente continuo, se realizó la transferencia de las proteínas a papel de nitrocelulosa. Posteriormente el papel fue secado y dividido en tiras e incubado con los diferentes sueros de pacientes hospitalizados. Observándose que con la dilución 1:100 se obtuvo un mejor patrón de reconocimiento. Como se observa en la Figura 6, los sueros de los enfermos reconocen las mismas bandas de PME con los extractos obtenidos a 30 y 37°C, los carriles 1 a 6 y 8 a 11. Básicamente los sueros reconocieron 3 bandas de 45, 18 y 71 kDa. La banda el carril 7 muestra los pesos moleculares utilizados teñidos con azul de Coomassie con el fin de observar en

que rango se encontraban dichas bandas. Los sueros de los voluntarios no reconocieron ninguna banda de las PME (resultado no mostrado).

b) Los sueros hiperimunes de los conejos incubados con el extracto de las PME incubadas a 30 y 37°C, utilizamos las mismas diluciones que en los sueros de los enfermos de 1:100 y 1:200, dando un mejor resultado la primera dilución. Observándose que, reconocen las mismas cuatro bandas de proteínas una con mayor intensidad como la de 45kDa, y otras con menor intensidad como las de 71, 28 y 18 kDa, al igual que en los sueros humanos se puede observar que reconocen la banda de 45kDa. Como lo muestra la Figura 8 en los carriles 1 y 2, las PME de la cepa de 62-8-88 incubada a 30°C y el carril 3 y 4 la misma cepa pero incubada a 37°C., los carriles 5 y 6 muestran las PME de la cepa 112-HV-88 incubada a 30°C y los carriles 7 y 8 la misma cepa pero incubada a 37°C. donde se observa el mismo reconocimiento de bandas de proteínas para ambas temperaturas.

c) La posibilidad de adsorción inespecífica del conjugado se descartó ya que el papel de nitrocelulosa sin el suero no presentó bandas de reacción. También se hizo la incubación del papel de nitrocelulosa con sueros de conejos no infectados (normales), donde no se observó ningún reconocimiento de las PME.

1.4 Reconocimiento de anticuerpos por el método de ELISA.

Para probar la especificidad del análisis inmunoenzimático se utilizaron sueros de conejos no infectados (sanos) y los sueros de los conejos inmunizados con la bacteria. Se observó que los sueros de los conejos inmunizados dieron valores promedios de 0.936, 0.986, 0.985 y 0.998 de absorbancia y los sueros de los conejos sanos dieron promedios de 0.112 y 0.110. En los ensayos posteriores se obtuvo una disminución de la densidad óptica, con respecto a los primeros valores, esto puede deberse a que se congelaban y descongelaban un mínimo de 6 veces. Ver Tabla No. 4.

1.5 Hemolisis

puesto que en S. marcescens produce hemólisis se verificó la capacidad hemolítica de estas dos cepas. Se observó que a la temperatura de 30°C se aparece un halo transparente dando como resultado una beta hemólisis (hemólisis total , como la que se observa en el Grupo de Estreptococos beta hemolíticos) y que va aumentando a medida que baja la temperatura., sin embargo cuando las cepas fueron incubadas a 37°C se observó que la hemólisis disminuye presentándose una alfa hemólisis donde puede verse un halo verdoso (hemólisis parcial). Esto se observó en ambos tipos de sangre utilizados.

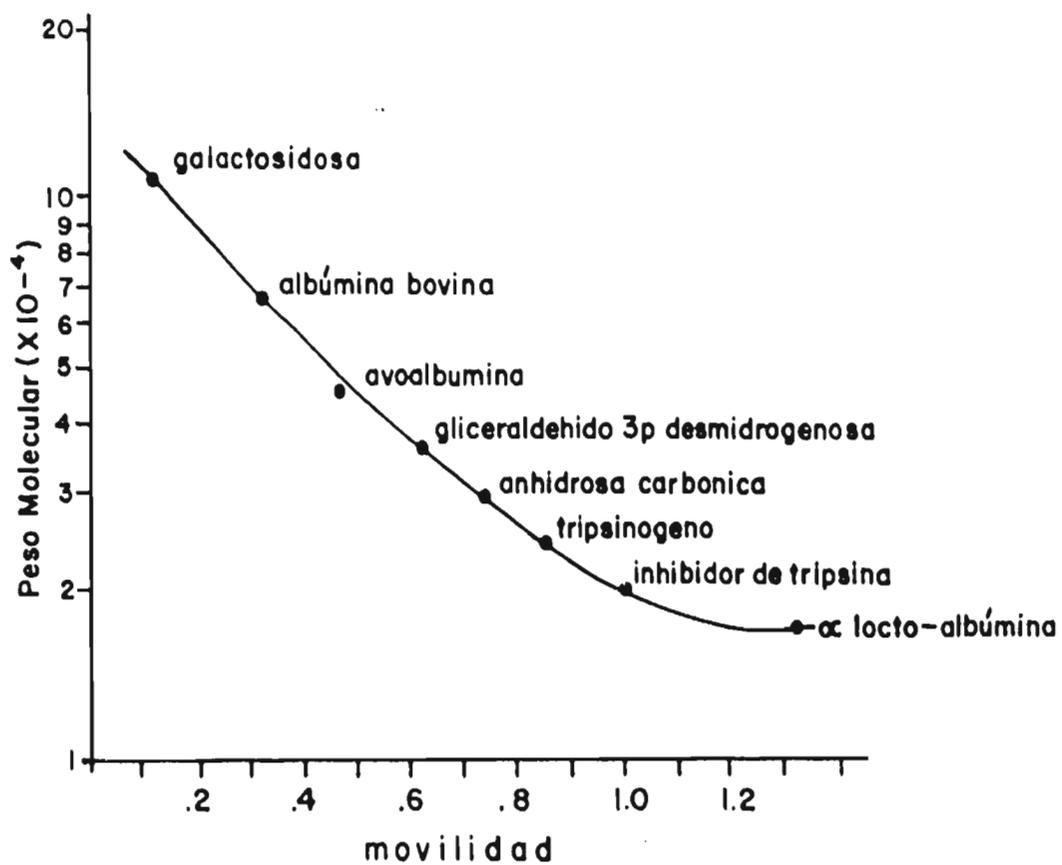
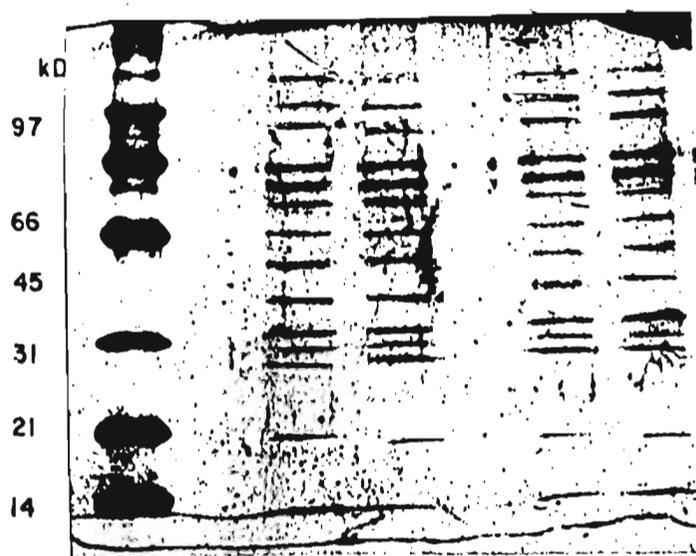


Fig. II. Curva de los estandares de peso moleculares que se utilizó para estimar el Peso Molecula de las proteínas contenidas en el extracto de PME de S. marcescens.

FIG. No. 4



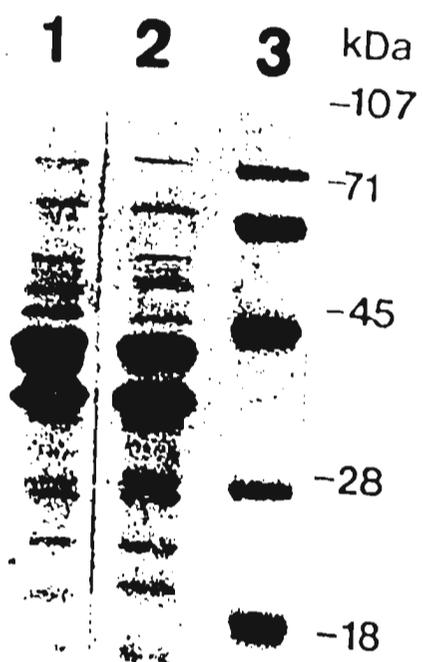
ELÉCTROFORESIS EN GELES DE PAGE-SDS (PME), DE
S. marcescens, AISLADAS POR EL MÉTODO DE SCHNAIMAN.

CARRIL 1 PESOS MOLECULARES (MARCADORES)

CARRILES 2 y 3 MUESTRAS DE LA CEPA 62-88 (30 y 37°C)

CARRILES 4 y 5 MUESTRAS DE LA CEPA 12-HV-88 (30 y 37°C)

FIG. No.5

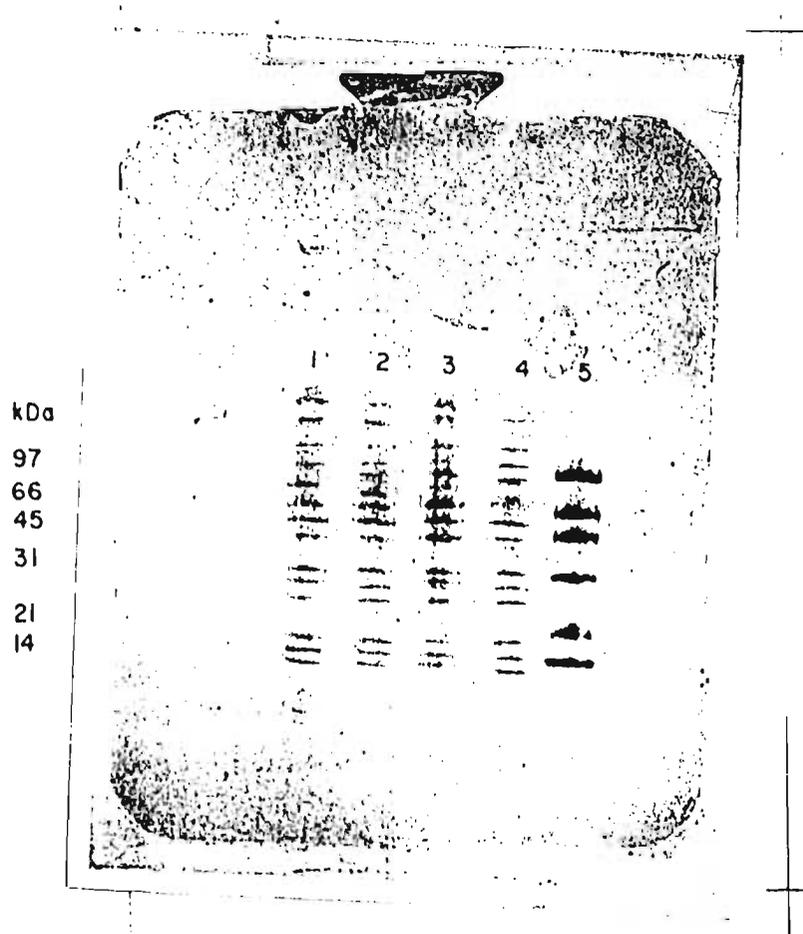


CEPA 112-HV-88

ELECTROFORESIS REALIZADA POR PAGE-SDS.

CARRIL 1: LA CEPA INCUBADA A 30°C
CARRIL 2: LA CEPA INCUBADA A 37°C
CARRIL 3: MARCADORES MOLECULARES

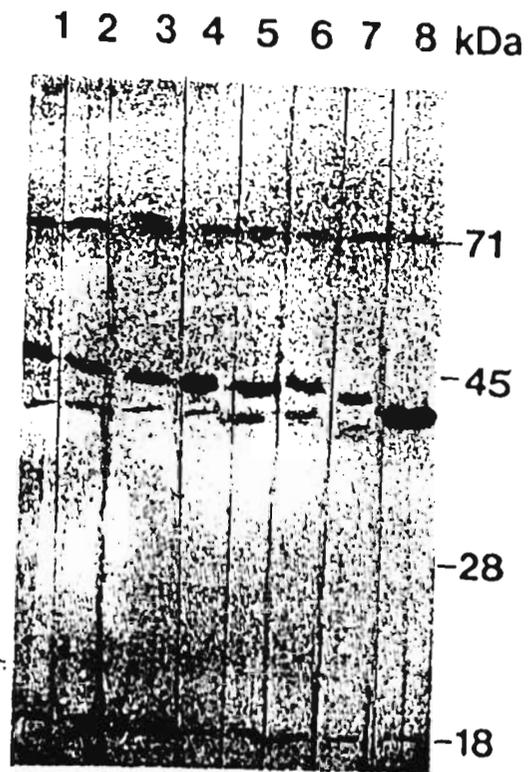
FIG. No. 6



ELECTROFÓRESIS DE LAS MUESTRAS PROBLEMA EN EL SISTEMA DE PHAST-GEL TEÑIDAS CON AZUL DE COOMASSIE

CARRIL 1. CEPA 62-8-88 INCUBADA A 30°C
CARRIL 2. CEPA 62-8-88 INCUBADA A 37°C
CARRIL 3. CEPA 112-HV-88 INCUBADA A 30°C
CARRIL 4. CEPA 112-HV-88 INCUBADA A 37°C
CARRIL 5. MARCADORES MOLECULARES

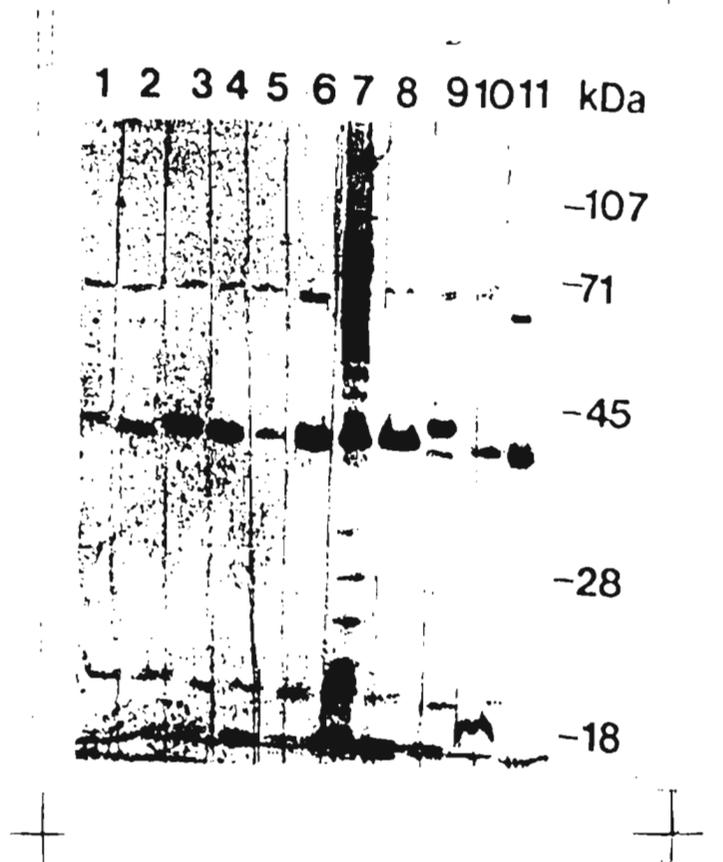
FIG. No.7



INMUNOTRANSFERENCIA CON SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CON PMS.

CARRIL 1 Y 2 LA CEPA 62-8-88 INCUBADA A 30°C
CARRIL 3 Y 4 LA CEPA 62-8-88 INCUBADA A 37°C
CARRIL 5 Y 6 LA CEPA 112-HV-88 INCUBADA A 30°C
CARRIL 7 Y 8 LA CEPA 112-HV-88 INCUBADA A 37°C

FIG. No. 8



INMUNOTRANSFERENCIA CON SUEROS DE PACIENTES
HOSPITALIZADOS

LÍNEA 1 A 3: CEPA 62-8-88 INCUBADA A 30°C.

LÍNEA 4 A 6: CEPA 62-8-88 INCUBADA A 37°C

LÍNEA 7. MARCADORES MOLECULARES AL FINAL
PESOS MOLECULARES TEÑIDOS CON AZUL
DE COOMASIE

LÍNEA 8 Y 9: CEPA 112-HV-88 INCUBADA A 30°C

LÍNEA 10 Y 11: CEPA 112-HV-88 INCUBADA A 37°C

VIII. DISCUSION

En los últimos años, las proteínas de membrana externa de las bacterias Gram negativas han sido objeto de numerosos estudios encaminados a determinar el papel que estos juegan en la relación huésped-parásito. Los estudios de la composición química de la estructura y función de la membrana externa se iniciaron a finales de la década de los sesenta (1968) cuando por primera vez Miura y Mizushima lograron separar la membrana citoplásmica de la membrana externa en E. coli. El análisis de ésta membrana demostró que la composición química de estas dos membranas era diferente. Ellos observaron que la membrana citoplásmica (membrana interna en los microorganismos Gram negativos), estaba compuesta de fosfolípidos y proteínas y la membrana externa además de estos compuestos contenía el lipopolisacárido un componente específico de las bacterias Gram negativas y que se localiza exclusivamente en la membrana externa. Estos estudios demostraron que su composición y función eran totalmente diferente. Los trabajos que siguieron a los de Miura y Mizushima (27), estaban encaminados a estudiar con mayor detalle la estructura de la membrana externa. En 1969, Braum y Rehn reportaron la presencia de una proteína de naturaleza lipoproteica en la membrana externa de E. coli, la cual se encontraba unida covalentemente a la capa de péptidos (49). En 1970, Schnaitman estudió el patrón electroforético en PAGE- SDS de las PME en E. coli, encontrando una banda proteica principal de 40kDa, que constituía el 70% de las proteínas totales de la membrana y demostró que la misma banda proteica estaba constituida por 4 proteínas diferentes a las que nombró 1a, 1b, 3a y 3b. Por este mismo método nosotros encontramos una banda proteica de aproximadamente 45kDa parecida a la que describe Schnaitman. Estas mismas proteínas fueron estudiadas por diferentes investigadores (Inouye en 1973, Bragg 1972, Henning en 1976, Mizushima en 1975 y Lugtemberg en 1975) y cada uno de ellos las han denominado en forma diferente de acuerdo a su criterio (37,40). Todo esto motivó a Rienzo, Nakamura e Inouye en 1978 a proponer un sistema de nomenclatura único que consistió en definir en base a su composición química y a su movilidad electroforética en PAGE- SDS. Así, las 4

proteínas descrita por Schnaitman constituyeron el grupo de proteínas principales de la membrana externa de E. coli (94). En 1980, Osborn y Wu reclasificaron estas proteínas en 3 grupos diferentes en base a su estructura y función como sigue: 1). Proteínas matrices o porinas, 2). Proteínas modificables por el calor, y 3). Lipoproteína de Braum. Nakae y Nikaido en 1975 demostraron que la función de estas proteínas era la de formar poros de difusión pasiva a la que denominaron porinas y a la proteína modificable por el calor Rienzo, Nakamura e Inouye la nombraron TolG (1978), esto se debe a que al separarla por PAGE - SDS, se modificaba su peso molecular., esto lo pudimos observar en este trabajo con S. marcescens, donde poníamos a calentar las muestras problema y veíamos que una proteína podía dividirse en otras como fue la que esta dentro del rango de 45kDa. Se sabe que esta proteína actúa como receptora de fagos y colicinias, además se le ha relacionado con procesos de conjugación bacteriana., que bien podría tener este mismo papel en S. marcescens. Hirashina y Col, (1973) demostraron que la lipoproteína unida covalentemente a la capa de peptidoglucano también podía encontrarse libre en la membrana de E. coli. Osborn y Wu (1980) propusieron que la función de esta lipoproteína era mantener la integridad estructural y la función de la membrana. Junto a este grupo de proteínas principales se encuentran en membrana externa 10 proteínas menores llamadas así por estar en menor cantidad (99). En S. marcescens, pudieran ser estas proteínas las cuales se pueden ver mas tenues que otras, tal vez por encontrarse en menor cantidad como lo mencionas los autores anteriores. Estas proteínas pueden funcionar como acarreadoras, receptoras de fagos y colicinias y se han relacionado con la replicación del DNA, y en la división celular.

En los últimos años varios grupos de investigadores han enfocado sus estudios hacia los componentes de las proteínas de la membrana externa a fin de dilucidar su participación en la relación huésped - parásito, puesto que se considera que por su localización, son elementos de patogenicidad. Como resultado de algunas investigaciones se han asociado estas proteínas, con fenómenos de adhesión e invasión bacteriana como se observó en S. marcescens, que puede adherirse a diferentes superficies, lo mismo puede ocurrir en el humano y así provocar infecciones graves. También han sido relacionadas con la resistencia que presentan ciertas bacterias al efecto bactericida del suero humano normal.

Lambden y col, en (1979) asociaron una proteína de la membrana externa de Neisseria gonorrhoeae (proteína II) con la adherencia de esta bacteria a células epiteliales bucales demostrando que este fenómeno era independiente de la presencia de pilis y a las fimbrias de algunas bacterias (63). Posteriormente Buchanan y col. en el mismo año propusieron que la fosfolipasa A₂ (la única proteína que se ha demostrado que tiene actividad enzimática), tenía actividad invasiva (98). Hilderbrant y col., asociaron la resistencia que presentaban algunas cepas de N. gonorrhoeae al efecto bactericida del suero humano normal, con una proteína de la membrana externa. Ellos encontraron que las cepas de esta bacteria producían infecciones gonocócica diseminada. Resultados semejantes fueron obtenidos por Moll y col. en 1980, ellos encontraron que una nueva proteína de la membrana externa en cepas de E. coli, eran resistentes a la acción bactericida del suero, esto podría presentarse también en S. marcescens, por pertenecer al grupo de las Enterobacterias bien podría presentar el mismo resultado, pero para comprobarlo tendríamos que realizar mayores estudios, como lo que se observó de que esta proteína era codificada por un plásmido relacionado con la resistencia a los antibióticos (108). Esto también podría observarse en S. marcescens, debido al problema que presenta por su alta resistencia a los antibióticos, también codificada por plásmidos.

Los estudios de Moll y col. sugirieron que estas proteínas podrían proteger a las bacterias de diferentes formas ya sea cubriendo sus superficies antigénicas de tal forma que los componentes de la membrana no puedan reaccionar con los anticuerpos para fijar complemento o bien cubriendo al porción de la molécula de LPS responsable de la activación del complemento por la vía alterna (99).

A pesar de todos estos trabajos relacionados a las proteínas de la membrana externa aún no se tienen suficientes conocimientos en cuanto a su patogenicidad. Frasch, Buchanan y Arko, fueron los primeros en estudiar la efectividad de estas proteínas como inmunógenos protectores. En sus trabajos demostraron que el antígeno capaz de inducir protección específica contra la uretritis gonocócica en chimpancés, se encontraba en la membrana externa. Posteriormente evidenciaron que las proteínas de

esta membrana eran las que le conferían protección específica en cobayos a los que se había inducido una infección gonocócica experimental. (64).

En S. marcescens, también podrían tratarse de inmunógenos las proteínas reconocidas tanto con los sueros de los pacientes, como con los conejos infectados por la bacteria.

Frasch y col. (110 y 111), encontraron que las proteínas de Neisseria meningitidis, grupo B eran buenos inmunógenos cuando se inoculaban a conejos, ya que inducían la producción de altos títulos de anticuerpos, esto lo pudimos observar en nuestros experimentos donde por el método de ELISA, vimos la producción alta de anticuerpos que podrían corresponder a los de estos investigadores. En estudios posteriores haciendo una separación de las diferentes proteínas, encontraron que la proteína I (proteína principal de la membrana externa) de esta bacteria era capaz de inducir protección en cobayos infectados experimentalmente con dicha bacteria. (108).

Resultados similares han sido encontrados en estudios con otras bacterias como , S. typhimurium por Kussi y col (111) ,demostrando que los anticuerpos producidos contra sus porinas protegían a los ratones contra una salmonelosis murina.

Adamus y col, en 1980 reportaron que la inmunización activa con proteínas de la membrana externa de Shigella flexneri y Shigella sonnei , protegían a los conejos de la queratoconjuntivitis shigellosa. (112).

En México, Hernández, Isibasi y Kumate encontraron que las proteínas de la membrana externa de S. thypi protegían a los ratones contra la exposición a la bacteria.

Debido al problema de brotes epidémicos y como causa de una gran variedad de infecciones, en años recientes S. marcescens, se ha convertido en un patógeno oportunista de gran importancia, esto se debe a las infecciones graves que puede causar cuando las defensas del huésped están alteradas. La mayoría de los estudios han estado dirigidos a la identificación de varios serotipos de Serratia sp. se ha encontrado que posee 24 antígenos "O" diferentes y 26 antígenos flagelares (6 , 41). También se han realizado tipificaciones por fagos, bacteriocinas y resistencia a los antibióticos. Sin embargo poco se conoce acerca de los componentes antigénicos de

su membrana externa, así como la relación que tienen en su patogenicidad. En este trabajo nosotros pudimos observar los componentes antigénicos en las PME, que bien podrían utilizarse para el diagnóstico de futuras enfermedades. Ya que nuestros resultados fueron de gran importancia al trabajar con sueros de pacientes enfermos como con sueros de conejos infectados con la bacteria entera y su reconocimiento de algunas bandas del extracto de PME, que podrían en un futuro servir como extractos de detección temprana de infecciones por esta bacteria.

Por lo anteriormente descrito y debido a la creciente importancia de S. marcescens, como agente causal de infecciones intrahospitalarias, en este trabajo nos hemos enfocado a estudiar las PME.

Un primer paso en nuestra investigación fue analizar la composición antigénica de las PME de esta bacteria en las cepas: 62-&-88 y 112-HV-88, obtenidas de muestras clínicas durante un brote epidémico en unidades de cuidado intensivo y de neonatología del IPN.

Con el fin de definir antígenos potencialmente significativos estudiamos la respuesta inmune humoral, por Elisa e inmunotransferencia, utilizando sueros de conejos infectados con diferentes dosis de la bacteria entera de S. marcescens, así como sueros de pacientes hospitalizados por infecciones de diferente índole.

Los resultados de estos estudios nos muestran:

- 1) Las PME, cultivadas a 30 y 37°C, incubadas con los sueros de los conejos inmunizados reconocieron las mismas cuatro bandas que están dentro de los rangos de pesos moleculares 10 a 40kDa. Esto se verificó con sueros de conejos sanos donde no reconocieron ninguna banda. Lo que pudiéramos decir que podrían tratarse de inmunógenos.
- 2) Con los sueros de los pacientes se obtuvieron los mismos resultados con las PME incubadas a las temperaturas de 30 y 37°C, donde 3 bandas proteicas una de gran intensidad que coincide con el peso molecular de 45kDa, como la de los conejos, y otras de 18 y 71kDa. Que bien pudieran tratarse de buenos inmunógenos que protegieran contra las infecciones por esta bacteria, lo que serviría en un futuro para elaborar un

inmunógeno que protegiera a la gente hospitalizada a futuras infecciones por esta bacteria. Uno de los principales problemas para poder resolver este problema es que sólo se presenta en brotes epidémicos en diferentes meses del año, lo que hace necesario plantear modelos que nos sirvan para analizar más profundamente cuales antígenos son buenos inmunógenos.

También podría estandarizarse un método de Elisa con extractos de PME, para un diagnóstico rápido, y reconocer la infección a tiempo evitando brotes futuros

podimos observar en nuestro trabajo cuando poníamos a calentar las muestras se observaba que una proteína similar se dividía en varias.

3) No encontramos cambios significativos en el perfil proteico en ambas cepas sembradas a las temperaturas de 30 y 37°C. Lo que concuerda con resultados obtenidos en los trabajos de Puig y col, en 1992, donde hicieron estudios similares a los aquí presentados (139).

En nuestro trabajo encontramos bandas en las PME con pesos moleculares similares a los descritos por Malouin y col en 1990. Como la proteína de 41 kDa. Igualmente observamos una banda de 71kDa que podría corresponder a la descrita por Bar- Ness (11) en sus estudios, ellos mencionan que esta proteína es una porina por la homología que presenta con la de E. coli.

Estudios realizados por Hutsul y col. en 1992 , Hofstra y col. en 1990, muestran que las bacterias de la Familia de las Enterobacterias, poseen PME de 41 y 30 kDa, que reaccionan cruzadamente. Ellos realizaron estudios comparando las bacterias: E. coli, S. flexneri, S.typhimurium, S.marcescens, P.vulgaris, P.mirabalis, (65, 76).

Como lo mencionan diferentes investigadores que han estudiado las PME en diferentes enterobacterias como: E. coli, S. thypimurium, etc. Las similitudes encontradas entre estas proteínas sugiere que existe una gran homología entre las especies de esta familia, como lo menciona Hofstra en sus Investigaciones, así como en otras bacterias

4) Con los sueros de los pacientes se obtuvieron los mismos resultados que con las PME cultivadas a 30°C y a 37°C, donde reconocieron 3 bandas proteicas una de gran intensidad que coincide con el peso molecular de 45kDa., y otras de 18 y 71kDa, observadas tenuemente. Diferentes investigadores han demostrado que las proteínas de la membrana externa son buenos inmunógenos en pacientes y en animales que han sido infectados con diferentes enterobacterias como: Salmonella thypi, Salmonella typhimurium, Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, etc. observando que la respuesta humoral hacia estas proteínas durante la enfermedad pudiera relacionarse con algunos mecanismos de protección en el inicio de la infección; lo cual también podría ubicarse para S. marcescens , donde se tendría que analizar en detalle las bandas proteínicas reconocidas en la inmunolectrotransferencia, ya que bien podría tratarse de inmunógenos que protegen en gran proporción contra la infección por esta bacteria.

Uno de los principales problemas para el estudio de las infecciones por S. marcescens es que solo se presenta en brotes epidémicos, por lo que hay que idear modelos que nos sirvan para analizar esta bacteria y esclarecer cual es el factor que influye en la infección, así como analizar más profundamente cuales antígenos son buenos inmunógenos para que en un futuro tratar de obtener una vacuna ó para tener mayores conocimientos y evitar las infecciones por esta bacteria.

CONCLUSIONES.

1. Para las proteínas de membrana externa de *Serratia marcescens* el uso del Sarkosyl mostró la presencia de un mayor número de componentes en el patrón electroforético debido a que solubiliza los componentes de la membrana interna, conservando los de la externa.
2. El perfil electroforético observado por PAGE-SDS, mostró 12 componentes proteícos, con pesos moleculares dentro del rango de 20 a 75 kDa, siendo las más aparentes las de 45, 41 y 71 kDa.
3. El perfil proteico no mostró cambios significativos al haber sido incubadas a 30 y 37°C.
4. La inmunización de los animales de experimentación con la célula bacteriana completa, mostró en la inmunoelectrotransferencia reactividad hacia 4 componentes de 45, 71, 18 y 28 kDa.
5. En los sueros humanos, utilizando el extracto antigénico de proteínas de membrana externa, el patrón de reconocimiento en la inmunoelectrotransferencia presentó reactividad hacia los componentes de 45, 18 y 71 kDa.
6. Por lo anterior se demuestra que el componente de 28 kDa no proviene de la membrana externa.
7. Debido a las reactividades mostradas por estos extractos antigénicos, en la inmunoelectrotransferencia y en el inmunoensayo-enzimático, se proponen como potenciales candidatos con fines inmunodiagnósticos o inmunogénicos para la enfermedad producida por *Serratia marcescens*.

BIBLIOGRAFIA.

1. Dang P, L.Gutman, C.Quenti, (1988). Some properties of *Serratia marcescens*, *Salmonella paratyphiA* and *Enterobacter cloacae* with Non Enzyme dependent multiple resistance to & Lactam antibiotics,aminoglycosides and quinolones, *Reviews of Infectious Diseases*. 10 : 899-904,
2. Pleites E.B, Castaño P, Hernandez Gutierrez P, (1988). Meningitis por *S. marcescens*, en el I.N.P. de México. *Mundo médico* 1:227-232.
3. Clegg, S.; Gerlach, G., (1987). Enterobacterial Fimbriae;*Journal of Bacteriology*; 169: 934-938.
4. Nichols, W., Clegg, S., Brown, M., (1990). Characterization of the type 1 fimbrial subunit gene (*fimA*) of *Serratia marcescens*; *Molecular Microbiology*, 4 : 2119-2126.
5. Flores-Calderón, J.; Escobedo-Chávez, E.; Franco-del Río, G.; Ortega-Guzmán, S.; Lavalle-Villalobos, A. Moncada-Barrón, D., (1988). Brote epidémico por *Serratia marcescens* en un servicio de neonatología; *Bol Med Hosp Ingant Mex*; 45: 512-516.
6. Gaston, M.; Pitt, T.; (1989); O- Antigen Specificities of the Serotype Strains of *Serratia marcescens*; *Journal of Clinical Microbiology*; 27: 2697-2701.
7. Gaston, M.; Pitt, T.; (1989); Improved O-Serotyping Method for *Serratia Marcescens*; *Journal of Clinical Microbiology*; 27: 2702-2705.

8. Avrahamy, N.; Matsuyama, T.; Rosenberg, M.; Bar-Ness, R.; (1988); Increased Cell Surface Hydrophobicity of a *Serratia Marcescens* NS 38 Mutant Lacking Wetting Activity; *Journal of Bacteriology*; 170: 4361-4364.
9. Rosenberg, M.; Khelleberg, S.; (); Hydrophobic Interactions: Role in Bacterial Adhesion; *J. Bacteriol*; 148: 382-391.
10. Schnaitman, C.; (1971); Solubilization of the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100; *Journal of Bacteriology*; 108: 545-552.
11. Bar-Ness, R.; Rosenberg, M.; (1989); Putative Role of a 70kDa Outer-surface Protein in Promoting Cell-surface Hydrophobicity of *Serratia Marcescens* RZ; *Journal of General Microbiology*; 135: 2277-2281.
12. Sawai, T.; Matsuba, K.; Tamura, A.; Yamagishi, S.; (1978); The Bacterial Outer-Membrane Permeability of β -Lactam Antibiotics; *The Journal of Antibiotics*; 32: 59-65.
13. Adegbola, R.; Old, D.; (1982); New Fimbrial Hemagglutinin in *Serratia* Species; *Infection and Immunity*; 38: 306-315.
14. Yu, V.; (1979); *Serratia marcescens*: Historical Perspective and Clinical Review; *The New England Journal of Medicine* ; 300 : 887-893.
15. Schönherr, R.; Hilger, M.; Broer, S.; Bens, R.; Braun, V.; (1994); Interaction of *Serratia marcescens* hemolysin (ShIA) with artificial and erythrocyte membranes; *Eur. J. Biochem*; 223: 655-663.
16. Tada Y.; Yamaguchi, J.; (1990); A major outer membrane protein of *Serratia Marcescens* which was easily solubilized and had a capacity to bind to calcium; *FEMS Microbiology Letters*; 70: 115-118.
17. Amako, K.; Yasunaka, K.; Ohshima, H.; Kono, K.; (1981); Pili Mediated Agglutination of *Serratia marcescens* in Human Urine; *Microbiol. Immunol.*; 25: 981-992.

18. Hilger, M.; Braun, V.; (1995); Superlytic Hemolysin Mutants of *Serratia marcescens*; *Journal of Bacteriology*; 177: 7202-7209.
19. Ruan Y, Braun V., (1990) Hemolysin as a marker for *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* 154: 221-225 .
20. Hamadeh, R.M., Mandrell, R.E, Griffiss S., (1990). Immunophysical characterization of human isolates of *Serratia marcescens*, *J. Microbiol.* 28:20-28.
21. Madduri S, Mauriello, D. Smith, L., Seebode, J: (1976), *Serratia marcescens* and the urologist. *J. of Urology*, 116 : 613- 615.
22. Maki, D., Hennekens C., Phillips, C., Shaww, C. Bennett, J, (1973), Nosocomial urinary tract infection with *Serratia marcescens*, an epidemiologic study, *J. infection diseases*, 128: 579-587.
23. Miller, L.; Beebe, J.; Butler, J.; Martin, W.; Benson, R.; Hoffman, R.; Fields, B.; (1993); Use of Polymerase Chain Reaction in an Epidemiologic Investigation of Pontiac Fever; *The Journal of Infectious Diseases*; 168: 769-772.
24. Bennett J.V. (1979). *Hospital infections* . 1a. Edition, Little Brown Co.
25. Ball, T.; Wasmuth, C.; Braunagel, S.; Benedik, M.; (1990); Expression of *Serratia marcescens* Extracellular Proteins Requires *recA*; *Journal of Bacteriology*; 172: 342-349.
26. McGeer, A.; Low, D.; Penner, J.; NG, J.; Goldman, C.; Simor, A.; (1990); Use of Molecular Typing to Study the Epidemiology of *Serratia marcescens*; *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 55-58.
27. Miura T, Mizushima, (1969); Separation and properties of outer membrane cytoplasmic membranes in *Escherichia coli*. *Biochemica, Biophysica Acta.* 193: 268.

28. Schaberg, D.; Alford R.; Anderson, R.; Famer III; (1976); An outbreak of nosocomial infection due to multiply resistant *Serratia marcescens* evidence of interhospital spread; *J. of infectious diseases*. 134: 181-187.
29. Saito, H.; Elting, L.; Bodey, G.; Berkey, P.; (1989); *Serratia* Bacteremia: Review of 118 Cases; *Reviews of Infectious Diseases*. 2: 912-920.
30. Watanakunakom, C.; (1989); *Serratia* Bacteremia: A Review of 44 Episodes; *Scand J Infect Dis*; 21: 477-483.
31. Lennete E, H; Balows A; Truant J.P; (1982); *Manual de Microbiologia Clinica*: 3a. De. Editorial Panamericana.
32. Larsson, A.; Nilsson, B.; (1988); Immunization with Nanogram Quantities of Nitrocellulose-Bound Antigen, Electrobotted from Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gels; *Scand. J. Immunol.*; 27:305-309.
33. Challacombe, S.; (1988); Application of ELISA to Microbiology; *ELISA and Other Solid Phase Immunoassays*; 319-355.
34. Rumelt, S.; Metzger, ZVI; Kariv, N.; Rosenberg, M.; (1988); Clearance of *Serratia marcescens* from Blood in Mice: Role of Hydrophobic Versus Mannose-Sensitive Interactions; *Infection and Immunity*; 58: 1167-1170.
35. Poole, K.; Schiebel, E.; Braun, V.; (1988); Molecular Characterization of the Hemolysin Determinant of *Serratia marcescens*; *Journal of Bacteriology*; 170: 3177-3188.
36. Jepsen, P.; Riise, E.; Biedermann, K.; Kristensen, P.; Emborg, C.; (1987); Two-Level Factorial Screening for Influence of Temperature, pH, and Aeration on Production of *Serratia marcescens* Nuclease; *Applied and Environmental Microbiology*; 53: 2593-2596.

37. Inouye M; (1989); Bacterial outer biogenesis and functions; John Wiley and Sons. Ed. New York.

38. König, W.; Faltin, Y.; Scheffer, J.; Schöffler, H.; Braun, V.; (1987); Role of Cell-Bound Hemolysin as a Pathogenicity Factor for *Serratia* Infections; *Infection and Immunity*; 55: 2554-2561.

39. Nakashima, A.; McCarthy, M.; Martone, W.; Anderson, R.; (1987); Epidemic Septic Arthritis Caused by *Serratia marcescens* and Associated with a Benzalkonium Chloride Antiseptic; *Journal of Clinical Microbiology*; 25: 1014-1018.

40. Lutenberg B., Meijers, J., Joek, P., Alphen, L., (1975): Electrophoretic resolution of the major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12 into four bands; *FEBS Letters*, 58: 254-258.

41. Sifuentes-Osornio, J.; Ruiz-Palacios, G.; Gröschel D.; (1986); Analysis of Epidemiologic Markers of Nosocomial *Serratia marcescens* Isolates with Special Reference to the Grimont Biotyping System; *Journal of Clinical Microbiology*; 23: 230-234.

42. Molla, A.; Matsumoto, K.; Oyamada, Y.; Katsuki, T.; Maeda, H.; (1986); Degradation of Protease Inhibitors, Immunoglobulins, and Other Serum Proteins by *Serratia* Protease and Its Toxicity to Fibroblasts in Culture; *Infection and Immunity*; 53: 522-529.

43. Yamamoto, T.; Aniyoshi, A.; Amako, K.; (1985); Fimbria-Mediated Adherence of *Serratia marcescens* Strain US5 to Human Urinary Bladder Surface; *Microbiol. Immunol.*; 29: 677-681.

44. Kamata, R.; Yamamoto, T.; Matsumoto, K.; Maeda, H.; (1985); A *Serratia* Protease Causes Vascular Permeability Reaction by Activation of the Hageman Factor-Dependent Pathway in Guinea Pigs; *Infection and Immunity*; 48: 747-753.

45. Kamio, Y; Nikaido, H; (1977): The outer membrane of *Salmonella typhimurium* identification of proteins exposed cell surface. *Biochem Biophys Acta*: 464: 589-601.
46. Doyle, R.; Lee, N.; (1985); *Microbes, warfare, religion, and human institutions*; *Can. J. Microbiol.*; 32: 193-200.
47. Zaidi, M.; Sifuentes, J.; Bobadilla, M.; Moncada, D.; Ponce de León, S.; (1989); Epidemic of *Serratia marcescens* Bacteremia and Meningitis in a Neonatal Unit in Mexico City; *Infect Control Hosp Epidemiol*; 10:14-20.
48. Castañeda Narvaez E; (1988); Control de enfermedades intrahospitalarias; *Rev.Enf.Infec. Ped*; 1:4-125.
49. Braun V; Rhen K; (1969); Chemical characterization spatial distribution and function of lipoprotein on membrane structure of *Escherichia coli*; *Eur.J. Biochem*; 10:426.
50. Kamata, R.; Takata, K.; Matsumoto, L.; Maeda, H.; Okamura, R.; (1984); Purification and Characterization of Four Proteases from a Clinical Isolate of *Serratia marcescens* kums 3958; *Journal of Bacteriology*; 157: 225-232.
51. Kohno, K.; Yamamoto, T.; Kuroiwa, A.; Amako, K.; (1984); Purification and Characterization of *Serratia marcescens* US5 Pili; *Infection and Immunity*; 46: 295-300.
52. Godfrey, A.; Hatlelid, L.; Bryan, L.; (1984); Correlation Between Lipopolysaccharide Structure and Permeability Resistance in β -Lactam-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; 26: 181-186.
53. Rosenberg, M.; (1984); Isolation of Pigmented and Nonpigmented Mutants of *Serratia marcescens* with Reduced Cell Surface Hydrophobicity; *Journal of Bacteriology*; 160: 480-482.
54. Smitages, C., Henning, U., (1975): The major proteins of *Escherichia coli* outer cell-envelope membrane; *J. Biochem*: 63: 47-52.

55. Giulian, G.; Moss, R.; Greaser, G.; (1983); Improved Methodology for Analysis and Quantitation of Proteins on One-Dimensional Silver-Stained Slab Gels; *Analytical Biochemistry*; 129: 277-287.

56. Lyerly, D.; Kreger, A.; (1983); Importance of *Serratia* Protease in the Pathogenesis of Experimental *Serratia marcescens* Pneumonia; *Infection and Immunity*; 40: 113-119.

57. Filip, C. Fletcher, J., (1973); Solubilization of cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by ionic detergent sodium lauryl sarcosinate (Sarkosyl). *J. Bacteriol.* 115: 717-722.

58. Genco, R.; Linzer, R.; Evans, R.T.; (1983); Effect of Adjuvants on Orally Administered Antigens; 650-668.

59. Giono Cerezo S; (1989). Identificación de nuevos microorganismos en infecciones intrahospitalarias. *Mundo Médico*; 177-179.

60. Skjold Bo; Biederman K; (1993); Isolation and characterization of outer membrane protein of *Serratia marcescens* W225. *Analytical Biochemistry*; 214: 212-221.

61. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, L., (1951); Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 163: 265-275.

62. Lyerly, D.; Gray, L.; Kreger, A.; (1981); Characterization of Rabbit Corneal Damage Produced by *Serratia* Keratitis and by a *Serratia* Protease; *Infection and Immunity*; 33: 927-932.

63. Lambden, P.R., Heckles, J., James, L.T., (1979); Variation in surface proteins composition associated with virulence properties in opacity types of *Neisseria gonorrhoea*; *J. Gen. Microbiol.* 114: 305-310.

64. Buchanan, Tm., Arko, R.J., (1977); Immunity to Gonococcal infections induced by vaccinations with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in Guinea pigs. *J. Infect. Dis.* 135 : 879- 887.
65. Hofstra, K.; Dankert, J.; (1980); Preparation and Quantitative Determination of Antibodies Against Major Outer Membrane Proteins of *Escherichia coli* O26K60; *Journal of General Microbiology*; 117: 437-447.
66. Helenius, A.; McCaslin, D.; Fries, E.; Tanford, C.; (1979); Properties of Detergents; *Methods in Enzymology*; 56: 734-749.
67. Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J.; (1979); Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and som applications; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 76: 4350-4354.
68. de la Cruz G., R.; (1982); Consevación de microorganismos; *Infectología*; 8:519-522.
69. Hustus J; Worobec E; (1992); Comparative analyses of *Serratia* spp. outer membrane porins proteins; *Can.J.Microbiol*; 39: 442-447.
70. Higgins, R; Dahmus, M; (1978); Rapid Visualization of Protein Bands in Preparative SDS-Polyacrylamide Gels; *Analytical Biochemistry*; 93: 257-260.
71. Puig M; Fuste C; ViñasM; (1992); Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*; *Can.J. Microbiol*; 39:108-111.
72. Osborn M.J; W C.P; (1980); Proteins of the outer membrane of Gram negative bacteria. *Ann.Rev.Microbiol*; 26: 369-378.
73. Gangarosa, E; (1978); Epidemiology of *Escherichia coli* in the United States; *The Journal of Infectious Diseases*; 137: 634-638.

74. Tada, Y; Yamaguchi, J; (1987); Spheroplast Induction in Clinical Isolates of *Serratia marcescens* in the Presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} ; *Journal of Clinical Microbiology*; 25: 2154-2158.

75. Jessop, H; Lambert, P; (1985); Immunochemical Characterization of the Outer Membrane Complex of *Serratia marcescens* and Identification of the Antigens Accessible to Antibodies on the Cell Surface; *Journal of General Microbiology*; 131: 2343-2348.

76. Hofstra, H; Van Tol, M; Dankert, J; (1990); Cross-Reactivity of Major Outer Membrane Proteins of Enterobacteriaceae, Studied by Crossed Immunoelectrophoresis; *Journal of Bacteriology*; 143: 328-337.

77. Guasch, J; Ferrer, S; Enfedaque, J; Viejo, M; Regué, M; (1995); A 17kDa outer-membrane protein (Omp4) from *Serratia marcescens* confers partial resistance to bacteriocin 28b when expressed in *Escherichia coli*; *Microbiology*; 141: 2535-2542.

78. Arzese, A; Botta, G; Gesu, G; Schito, G; (1988); Evaluation of a computer-assisted method of analysing SDS-PAGE protein profiles in tracing a hospital outbreak of *Serratia marcescens*; *Journal of Infection*; 17: 35-42.

79. Wilkouske C. J; Wasington C.A; (1970); *Serratia marcescens* biochemical characteristics antibiotic susceptibility patterns and clinical significance; *JAMA*. 214: 2157-2332.

80. Padilla, C; Brevis, P; Padilla, R; (1989); *Serratia marcescens* uropatógenicas de origen Hospitalario. Análisis del mecanismo adherente de dos cepas; *Rev. Med* ; 117: 629.635.

81. Braun, V; Schönherr, R; Hobbie, S; (1993); Enterobacterial hemolysins: activation, secretion and pore formation; *Trends in Microbiology*; 1: 211-216.

82. Larsen, B; Biedermann, K; (1993); Isolation and Characterization of the Outer Membrane Proteins of *Serratia Marcescens* W225; *Analytical Biochemistry*; 214: 212-221.

83. Holmes, B; Costas, M; Sloss, L; (1990); Numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns of *Serratia marcescens*: a comparison with other typing methods; *Epidemiol. Infect*; 105: 107-117.
84. Gargallo-Viola, D; (1989); Enzyme Polymorphism, Prodigiosin Production, and Plasmid Fingerprints in Clinical and Naturally Occurring Isolates of *Serratia marcescens*; *Journal of Clinical Microbiology*; 27: 860-868.
85. Gargallo-Viola D; López, D; (1990); Numerical Analysis of Electrophoretic Periplasmic Protein Patterns, a Possible Marker System for Epidemiologic Studies; *Journal of Clinical Microbiology*; 28:136-139.
86. Braun, V; Günther H; Neub B; Tautz, C; (1985); Hemolytic activity of *Serratia marcescens*; *Arch Microbiol*; 141: 371-376.
87. Poole, K; Braun, V; (1988); Influence of Growth Temperature and Lipopolysaccharide on Hemolytic Activity of *Serratia marcescens*; *Journal of Bacteriology*; 170: 5146-5152.
88. Pleite Sandoval, E.; Palau Castaño, J.; Hernández Porras, M.; Gutiérrez, B.; (1988); Meningitis por *Serratia marcescens* en el Instituto Nacional de Pediatría de México (enero de 1980-julio de 1988); *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*; 1:227-232.
89. Wilfert J; Barrett F; Ewing W; Finland, M; Kass E; (1970); *Serratia marcescens*: Biochemical, Serological, and Epidemiological Characteristics and Antibiotic Susceptibility of Strains Isolated at Boston City Hospital; *Applied Microbiology*; 19: 345-352.
90. Breed R ; Breed M; (1924); The Type Species of the Genus *Serratia*, Commonly Known as *Bacillus Prodigiosus*; *Journal of Bacteriology*; 9: 545-557.

91. Gaughran E; (1969); From Superstition to Science: The History of a Bacterium; Transaction New York Academic of Sciences; 31:1-18.
92. Laemmli U; (1970); Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4; Nature ; 227: 680-685.
93. Bollmann R; Halle E; Sokolowska-Köhler W; Grauel E; Buchholz P; Klare Y; Tschäpe, H; Witte W; (1989); Nosocomial Infections Due to *Serratia marcescens* Clinical Findings, Antibiotic Susceptibility Patterns and Fine Typing; Infection ; 17: 294-299.
94. Schnaitman C; (1970); Examination of the Protein Composition of the Cell Envelope of *Escherichia coli* by Polyacrylamide Gel Electrophoresis; Journal of Bacteriology; 104: 882-889.
95. Schnaitman C; (1971); Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid, Triton X-100, and Lysozyme on the Morphology and Chemical Composition of Isolated Cell Walls of *Escherichia coli*; Journal of Bacteriology; 108: 553-563.
96. Williams R; Goot C; Hussain Qadri S; Scott R.; (1971); Influence of Temperature of Incubation and Type of Growth Medium on Pigmentation in *Serratia marcescens*; Journal of Bacteriology; 106: 438-443.
97. Bragg, P ; Hot, C; (1972); Organization of Proteins in the Native and Reformed Outer Membrane of *Escherichia Coli*; Biochimica et Biophysica Acta; 274 : 478-488.
98. Buchanan T,M; Arko, R, J; (1977); Immunity to gonococcal infections induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoeae* in Guinea pigs; J, Infect, Dis; 135: 879-887.
99. Moll A; Manning, P.A; Timmis K, N; (1980); Plasmid resistance to serum bactericidal activity, a major outer membrane protein the Tra T gene product is responsible for plasmid specified serum resistance in *Escherichia coli*; Infect. Immun; 28: 359-367.

100.Frasch C.E; Parkes R.M; McNeilis G; (1976); Protection against group B meningococcal disease Y: comparison of group specific and tupe specific protection in the chick embryo model; J. Exp. Med. 144: 319-325.

101.Frasch, C.E; Robbins J. D; (1978) ; Protection against group B meningococcal disease II, infection and resulting immunity in Guinea Pigs model; J. Exp. Med; 147: 619-624.

102.Thobum R; Fekety Y, R; Cluff, L,C; (1990); Infections acquired by hospitalized patients; Arch. Intern. Med; 121: 40-4.

103.Stain,W.E; WeinsteinR.A; (1981); Comparation to endemic and epidemic nosocomial infections; Am.J.Med; 70: 393-397.

104.Petersen, K.P; (1981); Bacterial surface components and the pathogenesis of infectious disease; An. Rev. Med; 32: 29-43.

105.Bergey' s Manual of Sistemic Bacteriology (1984) ; 8a. edition, Baltimor, London.

106.Klein E; (1984); On an infection foods-stuffs by Bacillus prodigiosus; J.Pathol Bacteriol; 2: 217-218.

107.Gaughran E.R.L; (1969); From superstition to science the history of Bacterium; Trans N.Y.Acad. Sci; 31:3 -24.

108.Merlino C.P; (1924); Bartolomeo Bizio's letter to the most eminent priest Angelo Bellani concerning the phenomeon of the red colored polenta; J. Bacteriol ; 9: 527-543.

109.Woodward H.M; Clarke K.B; (1913); A case of infection in man by bacterium prodigiosum; Lancet; 1: 314-315.

110.Robinson W; Wooley P.B; (1957); Pseudohaemoptysis due to chromobacterium prodigiosum; Lancet ; 1: 819.

111. Waisman H.A; Stone W.H; (1958); The presence of *Serratia marcescens* as the predominating organisms in the intestinal tract of newborn, the occurrence of the "red diaper syndrome"; *Pediatric*; 21:8-12.
112. Yu V.L; (1969); *Serratia* septicemia; *Br. Med. Jor*; 4: 756-757.
113. Biological testing involving human subjects by the department of defense; (1977); Hearing before Subcomitee, Washington, D.C.
114. Madeiros A; O'Brien ; (1969); Contribution of R factors to antibiotics resistance of hospital isolates of *Serratia*; *Antimicrobial agents Chemother* ; 15: 30-35
115. Grimont and Grimont ; (1977); The genus *Serratia*; *J.Gen Microbiol*; 72: 215-248.
116. Rabinowitz K; Schiffrin R; (1952); A ward contamination *Serratia marcescens*; *Acta Med. Orient*; 11: 181- 184.
117. Kass E.H; Shneiderman L.J; (1957); Entry of Bacteria into de urinary tracts of patients with involving catheters; *N.Engel. J. Med*; 256: 556-557.
118. Laurenzi G.A; Potter R.T; Kass E.H.; (1977); Bacterial flora of the lower respiratory tract; *N. Engl. J. Med*; 265:1273-1278.
119. Wheat R.P; Zuckerman A; (1951); Infection due to chromobacteria report of eleven cases. *Arch. Intern. Med*; 88:461-466.
120. Edward P.R; Ewing W.H; (1972); Identification of Enterobacteriaceae. 3ed.Ed. Burgers Publications.
121. Mills J; Drew D; (1976); *Serratia marcescens* endocarditis associated with intravenosus drug abuse; *Ann.Intern. Med*; 84: 116-122.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

122. Williams R.P; Quadri M.H; (1967); The prodigiosin; Goltleb and P.P. Shaw de. Antibiotics II Biosynthesis.

123. Sanders C.V; Luby J.P; (1970); Serratia marcescens infections from inhalations therapy medications nosocomial outbreak; Ann. Intern. Med; 73: 15-21.

124. Yu V.L; Rhame F.S; Pesati E.L; (1977); Amikacin therapy: use against infections caused by gentamicin, tobramycin resistant organisms; JAMA; 238: 943-947.

125. Rapaport H; (1962); The synthesis of prodigiosin; J. Am. Chem. Soc; 84: 635-642.
1a. Edition, Little Brown Co. Washintong D.C.

126.