

11261

11261

20
5

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD DE MEDICINA

**UTILIDAD DE 5 MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS EN EL ESTUDIO
DE CEPAS DE *KLEBSIELLA ozaenae* CAUSANTES DE UN BROTE
DE INFECCION NOSOCOMIAL**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(MICROBIOLOGIA)**

presenta

MARTHA GARCIA PEREZ

ASESOR ACADEMICO : ONOFRE MUNOZ H.

HOSPITAL DE PEDIATRIA, CMN, IMSS 1987

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

UTILIDAD DE 5 MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS EN EL ESTUDIO
DE CEPAS DE *KLEBSIELLA ozaenae* CAUSANTES DE UN BROTE
DE INFECCION NOSOCOMIAL

INDICE

	<u>página</u>
1.- RESUMEN	1
2.- ANTECEDENTES	2-12
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4.- OBJETIVOS	13
5.- HIPOTESIS	13-14
6.- MATERIAL Y METODOS	14-24
7.- RESULTADOS	24-46
8.- DISCUSION	47-58
9.- REFERENCIAS	59-70

RESUMEN

Se estudiaron 114 cepas de *Klebsiella ozaenae* distribuidas en tres grupos: I) 20 cepas causantes de un brote de infección nosocomial; II) 31 cepas aisladas del medio ambiente hospitalario y III) 63 cepas provenientes de niños sanos de la comunidad.

Se utilizaron 5 marcadores microbiológicos:

- 1) Determinación de Biotipo o Biovar, susceptibilidad a :
- 2) Antimicrobianos, 3) Metales pesados y 4) Bacteriocinas, así como 5) Perfil de Material Extracromosomal.

Fue posible caracterizar a las cepas de *Klebsiella ozaenae* causantes del brote de infección nosocomial y distinguirlas de las pertenecientes a los otros dos Grupos, con la excepción de 2 cepas del ambiente hospitalario que compartían características fenotípicas con las del brote y que pudieran ser consecuencia de la diseminación de éstas en el hospital. Los marcadores de mayor utilidad para el estudio de estas cepas fueron: Patrón de susceptibilidad a Antimicrobianos, identificación del Biotipo y descripción del Material Extracromosomal.

La aplicación de la Teoría de Descriptores Mínimos en un sistema computarizado, permitió clasificar (Brenner) 543 cepas de la Tribu *Klebsiellae* y proponer la utilidad de 14 sustratos bioquímicos para una identificación adecuada.

ANTECEDENTES

Infección nosocomial, es aquella que ocurre en un paciente hospitalizado y cuyo período de incubación se inicia dentro del hospital. En los casos en que este período no es bien conocido o el microorganismo no puede ser aislado, se considera como tal, aquella que se inició después de 72 horas de hospitalización. Por su origen estas infecciones se clasifican en: endógena, cuando el agente causal proviene de la flora normal del mismo paciente y exógena, la que se adquiere del ambiente hospitalario, ya sea que provenga del personal que labora en la institución o bien del medio ambiente del nosocomio (10, 123).

En los Estados Unidos aproximadamente un 5.5 % de los pacientes hospitalizados adquieren una infección nosocomial y esta frecuencia, combinada con el número de pacientes admitidos anualmente da aproximadamente 2 millones de infecciones nosocomiales (7, 114-123).

El tipo de pacientes que se colonizan y adquieren una infección intrahospitalaria, frecuentemente son enfermos que han sufrido manipulaciones quirúrgicas de "alto riesgo" o son pacientes inmunocomprometidos que han estado bajo tratamientos prolongados con inmunosupresores, con quimioterapia persistente o sometidos por tiempo prolongado a la acción de antimicrobianos. Los microorganismos que colonizan a estos enfermos provienen la mayor parte de las veces de la flora endógena, que debido a la presión selectiva a la que

se ven sujetos por la terapia utilizada, frecuentemente son resistentes a múltiples antimicrobianos, metales pesados y algunas sustancias quimioterápicas. Los pacientes se colonizan por alguna puerta de entrada como la piel, faringe posterior o intestino (1-59, 114-133, 144).

Los gérmenes involucrados en bacteremias nosocomiales son principalmente bacilos gram negativos de la Familia *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* y en segundo lugar gérmenes gram positivos (1-59, 114-133, 136, 141, 163). Las enterobacterias que con mayor frecuencia se asocian a infecciones nosocomiales son géneros de la Tribu *Klebsiellae* (1-59, 114-133, 135, 163) y *Escherichia coli* (152-154, 161, 162), con índices de letalidad aproximada de 25 a 50 %, lo cual revela la gravedad del problema (113-134, 163), y en ocasiones puede relacionarse con la diseminación de factores R dentro del hospital (114-133, 141, 150, 163).

La Familia *Enterobacteriaceae* esta constituida por bacilos gram negativos (94-111), aerobios facultativos, esporulados, que crecen bien en medios artificiales. En el manual de Bergey (105) se define a la Familia *Enterobacteriaceae* como: bacilos gram negativos cuyo contenido de Guanina + Citosina en ácido desoxirribonucleico (ADN) es de 38 a 60 %. Kauffman (94-96) trabajó con las enterobacterias y propuso una clasificación taxonómica que se fundamenta en el estudio de "grupos relacionados con serobiofagotipos en los que la serología o los serovares constituyen el

criterio taxonómico". Ewing y Edwards (97-99) basaron su clasificación en el análisis diferencial de pruebas morfológicas y bioquímicas, modificada posteriormente por Brenner (100-104, 108, 109) quien propuso cambios apoyado en estudios de hibridización de ADN.

La incorporación de nueva tecnología y la aplicación de conocimientos en biología molecular, como estudios de hibridización de ADN, patrones de susceptibilidad a antimicrobianos, sensibilidad a metales pesados, producción de bacteriocinas, patrón lítico y la introducción del análisis computarizado aplicado en gran número de géneros y especies (99-111), ha permitido mejorar el conocimiento de diversos grupos microbianos, de tal forma que la formación de Biogrupos, Biovares, Fagovares y Serovares (111) se ha visto aumentada considerablemente si se compara con lo que se tenía reportado hasta hace algunos años (99-111). De 11 géneros y 26 especies que se tenían en 1972, se ha aumentado a 22 géneros y a más de 100 especies (158).

Farmer y colaboradores propusieron (109) cambios taxonómicos basados en estudios de genética, biología molecular, bioquímica y análisis computarizado. Esta última clasificación aún no es validada por el International Journal of Systematic Bacteriology; sin embargo, en la novena edición del Manual de Bergey (105) se hace mención de especies como *Enterobacter taylorae*, *Escherichia fergusonii*, que han sido reportadas como agentes causales en casos clíni

cos (110, 111).

Actualmente, todos los hospitales deben contar con un Comité de Control de Infecciones Nosocomiales y entre sus funciones se encuentra el de detectar, vigilar y fijar normas para su control (115; 142-145). Para el estudio de los brotes de infección hospitalaria se utilizan diferentes marcadores que puedan ayudar a diferenciar las poblaciones microbianas involucradas en este tipo de padecimientos. El patrón de susceptibilidad antimicrobiana se utiliza con mayor frecuencia como marcador epidemiológico y con esta base existe la tendencia a agrupar la información de las cepas multirresistentes por grupos de antimicrobianos (113-134, 142-145). Cuando se analizan los patrones de plásmidos y se trata de establecer una correlación con el patrón de susceptibilidad antimicrobiana, en ocasiones puede observarse una similitud en los patrones dados por los antibiogramas de la misma especie o serogrupos y el patrón plasmídico. La resistencia mostrada por los microorganismos no está codificada exclusivamente en el material extracromosomal, puede ser cromosómica y puede ser consecuencia de diferentes mecanismos genéticos o bioquímicos de expresión que daran la variación fenotípica de cada patrón (113-134). Los estudios de electroforesis de ADN, aplicados como marcadores epidemiológicos, así como el estudio del material extracromosomal pueden proporcionar datos de gran utilidad en situaciones epidémicas (113-125, 128-133).

Los patógenos que muestren patrones de resistencia antimicrobiana idénticos pueden ser diferentes en los patrones de electroforesis de ADN y de material extracromosomal o de otras cepas de la misma especie y no estar necesariamente relacionados con el brote o infección que motivó el estudio, por lo que sería necesario realizar estudios de hibridación de ADN con fragmentos de bases (genes) que pueden codificar para un fenotipo de reconocimiento (113-125, 152, 153, 160, 161). Los estudios de clonación y transformación también pueden ser útiles en el estudio del origen de las cepas causantes de la infección nosocomial.

La cepa portadora de la resistencia antimicrobiana, debe diferenciarse de la marca cromosomal, plasmídica o de ambas (113-123, 130, 132, 161-163). En el medio hospitalario un factor R puede estabilizarse eventualmente en una gran variedad de especies bacterianas, o puede permanecer durante periodos largos en una o varias áreas del hospital y constituirse en una fuente importante de infección nosocomial (1-10, 141-148).

El estudio de los microorganismos que ocasionan infecciones nosocomiales se lleva a cabo de diferentes formas:

- 1) Clínico-Epidemiológico. En los brotes o casos aislados de infecciones nosocomiales, en el que los agentes causales habitualmente son resistentes a múltiples antimicrobianos, se analizan los índices de morbilidad y letalidad, las diferen-

tes localizaciones infecciosas y las complicaciones que habitualmente son múltiples o con tasas elevadas (113-123, 130, 134, 140-147, 163). Algunas infecciones nosocomiales son causadas por microorganismos del ambiente hospitalario que colonizan a los pacientes, teniendo en ocasiones la posibilidad de establecer un origen común. El estudio de casos y testigos o el estudio longitudinal de los pacientes de alto riesgo, así como los sistemas de vigilancia epidemiológica, permiten la identificación temprana de los brotes de infección y la información inicial que sugiere el origen exógeno o endógeno de las cepas causantes del problema (113-133, 137, 140-149, 163).

2) Tipificación e Identificación de Marcadores. Los sistemas actuales de tipificación de los organismos involucrados en este tipo de padecimientos no son de fácil acceso a los laboratorios clínicos, ya que estos varían en grado de complejidad, requieren contar con personal capacitado, así como con equipo apropiado para el desarrollo de estas técnicas.

2a) Biotipo o Biovares. El uso de algunas características bioquímicas para identificar subgrupos de bacterias tanto aerobias como anaerobias, combinado con los patrones de susceptibilidad antimicrobiana usadas en los laboratorios clínicos, permite formar grupos afines, que en ocasiones ayuda a la discriminación de los microorganismos involucrados (34, 153-155). En caso contrario, es necesario incluir tanto

pruebas bioquímicas adicionales como un número cada vez mayor de pruebas de antimicrobianos.

2b) Susceptibilidad Antimicrobiana. Es una prueba *in vitro* que mide la capacidad de un microorganismo para sobrevivir a la acción de agentes farmacológicos (i.e., antimicrobianos) usualmente empleados en la terapéutica médica. La resistencia clínicamente significativa está mediada por material genético extracromosomal llamado plasmido, se encuentra también codificada en cromosoma o en unidades discretas de ADN que tienen la propiedad de transponerse a otras moléculas de ácido desoxirribonucleico (Tn), con lo que el grado de resistencia entre cepas bacterianas se ve incrementada notablemente.

2c) Susceptibilidad a Metales Pesados. La resistencia mostrada a metales pesados se asocia a factores R (e.g., β -lactamasa, Cu) o a transposones (Tn10, Hg). Existen diversas especies bacterianas que tienen tipos característicos de plasmidos que se pueden transferir a otras especies bacterianas por conjugación.

La resistencia a antimicrobianos y metales pesados es una respuesta a la presión selectiva de las sustancias utilizadas en el medio ambiente hospitalario; su origen plasmídico o cromosómico puede diferenciarse por pruebas genéticas y bioquímicas (113-133). Los resultados deben reportarse al clínico en la forma más simple posible, ya que algu

nos microorganismos se diferencian en grados relativos de susceptibilidad o resistencia antimicrobiana. El Comité de Antimicrobianos del nosocomio debe elegir la forma de reporte y el manejo de la información recabada (128-130, 132, 134, 140, 150), para su mejor utilización clínica.

2d) Fagotipia (determinación de fagotipos o fagovares). Es un marcador para un número limitado de bacterias. El fenómeno básico está dado por:

- 1) Ataque del fago a la superficie bacteriana
- 2) Entrada del fago a la bacteria.
- 3) Multiplicación del fago en la bacteria (para lo cual utiliza el material genético de la célula infectada).
- 4) Lisis de la célula bacteriana.

La fagotipia está basada en la propiedad lítica de los fagos; el fenotipo de reconocimiento es la formación de placas (34, 62, 134, 139).

2e) Serotipos o Serovares. Determina la variación natural de moléculas inmunogénicas de la superficie de los microorganismos. En esta técnica se efectúa una reacción específica antígeno-anticuerpo. La determinación del serotipo o serovar es una de las propiedades más estables; sin embargo, ésta se puede modificar por la presencia de fagos y plasmidos (27, 34, 134).

2f) Patrón de Bacteriocinas. Este método está limitado a

cierto tipo de bacterias: *E. coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*. Las bacteriocinas están formadas por un complejo proteínico: cloacina (59,293 d), proteína inmune (9,974 d) y proteína H (5,200 d). La cloacina y proteína inmune forman un complejo equimolecular (34).

Las bacteriocinas son sintetizadas por algunas bacterias y tienen la propiedad de destruir o inhibir a otras cepas bacterianas que pueden ser de la misma o diferente especie. Estas pruebas requieren controles adecuados, utilizan una gran variedad de patrones y no existe uniformidad en cuanto a como reportarlo. Se pueden utilizar sistemas mecánicos, diferentes combinaciones de sensible o resistente, así como la combinación con otros métodos, como fagotipia (14, 34, 57, 60-93, 139).

2g) Otros métodos de tipificación: Patrón de plasmidos (113-133, 140-145, 150, 152, 163); homología de ácidos nucleicos (112); producción de enzimas (65, 75, 126, 127, 136, 163); proteínas marcadas: beta lactamasa, fosfolipasa A, proteína responsable de la adhesividad (127; 128, 134, 162-164). Su utilidad depende del brote motivo del estudio, así como de la integración e interpretación adecuada de los resultados (8, 123, 134),

Los microorganismos que se encuentran como agentes causales de infecciones nosocomiales son motivo de estudio para genetistas y biólogos moleculares. Uno de los objetivos es el de probar que los organismos causantes de este

tipo de padecimientos son semejantes a los encontrados en el ambiente hospitalario o que provienen del mismo paciente.

Teoría de Descriptores Mínimos de Ruiz-Shüloper

Diversos géneros y especies de la familia *Enterobacteriaceae* están involucrados como agentes causales de múltiples padecimientos infecciosos. Es práctica común en la mayoría de los laboratorios de bacteriología, efectuar una serie de pruebas con el propósito de identificar una cepa particular de bacterias según alguna clasificación existente (Brenner, 1964); sin embargo, a la fecha no existen criterios uniformes para determinar con exactitud el grado de importancia relativa de cada una de las pruebas que se efectúa y poder establecer un número mínimo confiable de pruebas bioquímicas a realizar.

En este trabajo proponemos la metodología descrita por Ruiz-Shüloper, que da como resultado la ordenación de las pruebas bioquímicas en una escala relativa de importancia. Se utiliza para ello la teoría de descriptores mínimos, en la que un descriptor es un conjunto de pruebas que mantenga inequívoca la distinción entre cepas particulares, y un descriptor mínimo es aquel que describe sin ambigüedad las cepas estudiadas. El peso informativo p tendrá valores entre 1 y 0; las cepas que tengan un valor de $p = 1$ son pruebas indispensables para la descripción correcta del conjunto de ce

pas, por el contrario, cuando $p = 0$ se pueden eliminar estas pruebas sin temor a llegar a clasificar incorrectamente. La escala de valores entre 1 y 0 refleja la importancia relativa de cada una de las pruebas bioquímicas aplicadas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social, durante el período 1981-1985, de 66,000 egresos: 5,271 pacientes presentaron infección intrahospitalaria, con una tasa promedio de 8 infecciones por cada 100 egresos. Predominaron 4 diferentes tipos de infecciones: vías respiratorias, gastrointestinales, heridas quirúrgicas y bacteremias. Los microorganismos más frecuentemente aislados como agentes causales fueron enterobacterias: *E. coli* y *Klebsiella sp.*, así como cocos gram positivos: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (10).

Debido a la alta incidencia de infecciones intrahospitalarias causadas por géneros de la Tribu *Klebsiellae* en el Hospital de Pediatría, CMN. IMSS, fue necesario establecer métodos de tipificación bacteriana que permitiesen identificar y diferenciar a las poblaciones microbianas involucradas como agentes causales de estas infecciones, así como de los gérmenes que colonizan el medio hospitalario.

OBJETIVOS:

I) Evaluar la utilidad de cinco diferentes métodos de tipificación:

- 1) Determinación del Biotipo o Biovar
- 2) Susceptibilidad Antimicrobianos
- 3) Susceptibilidad a Metales pesados
- 4) Susceptibilidad a Klebocinas
- 5) Patrón de Material Genético Extracromosomal

Para diferenciar las poblaciones microbianas involucradas en un brote de infección nosocomial causada por *Klebsiella ozaenae*.

II) Utilizar la Teoría de Descriptores Mínimos de Ruíz-Shülloper en un sistema computarizado, para evaluar el peso relativo de las pruebas bioquímicas propuestas por Brenner, Farmer, y Hickman en 1977 y establecer un número mínimo confiable de pruebas bioquímicas para la identificación de la Tribu *Klebsiellae*.

HIPOTESIS:

1) De los cinco marcadores epidemiológicos utilizados, la descripción de la presencia o ausencia de material extracromosómico de las cepas de *Klebsiella ozaenae*, proporcionará la información más confiable para diferenciar a las po-

blaciones microbianas involucradas como agentes etiológicos en este brote de infección nosocomial.

2) La aplicación de la Teoría de Descriptores Mínimos de Ruiz-Shiloper permitirá establecer el peso relativo de las diferentes pruebas bioquímicas y determinar el número mínimo de pruebas útiles confiables, para una identificación bioquímica microbiana adecuada.

MATERIAL Y METODOS:

Descripción del brote epidémico. La frecuencia de infecciones intrahospitalarias del Hospital de Pediatría de CMN, IMSS; se vió incrementada debido a un brote que ocurrió durante los meses de marzo a septiembre de 1983 en la sala de Neonatología, causado por *Klebsiella ozaenae*. El servicio de Neonatología estaba dividido en cuatro secciones:

- 1) Terapia Intensiva Sección Infectados. Ocupada por neonatos hospitalizados por procesos infecciosos graves.
- 2) Terapia Intensiva Sección no Infectados. En esta sección se encontraban pacientes con patología pulmonar, cardiovascular y neurológica de etiología no infecciosa.
- 3) Incubadoras. Recién nacidos pretérmino sin patología.
- 4) Cunas. Pacientes egresados de cualquiera de las secciones

descritas anteriormente, estos pacientes se mantenían hospitalizados de 24 a 48 horas previas a su alta hospitalaria.

El 80 % (20 / 25 pacientes) adquirieron la infección al ser colonizados por *Klebsiella ozaenae* y estuvieron localizados sólo en la segunda sección de la sala; es decir, que eran pacientes hospitalizados con procesos no infecciosos.

Cepas de *Klebsiella ozaenae* estudiadas. Se estudiaron un total de 114 cepas de *Klebsiella ozaenae*, las cuales de acuerdo a su procedencia se clasificaron en tres grupos:

Grupo I. Brote epidémico: 18 cepas aisladas de hemocultivo y 2 cepas de líquido cefalorraquídeo.

Grupo II. 31 cepas aisladas del medio ambiente hospitalario (provenían de manos, ropa, del personal médico, paramédico y superficies de objetos inanimados) que no pertenecían a la sala de Neonatología.

Grupo III: 63 cepas: 30 correspondieron a aislamientos de cocultivos de niños sanos de una población preescolar del Sur de la ciudad de México y las 33 restantes provenían de niños sanos de una comunidad rural de Cadereyta, Qro.

Las 114 cepas de *Klebsiella ozaenae* se estudiaron al mismo tiempo utilizando 5 parámetros para nuestro primer objetivo: Determinación de Biotipo, Susceptibilidad a : Antimicrobianos, Metales Pesados y Bacteriocinas, así como

Patrón de Material Extracromosomal.

1) Determinación del Biotipo o Biovar: Todas las cepas se resembraron en: agar Mac Conckey, agar F Tergitol, se incubaron a 37° C por 18-24 horas, se corroboró morfología colonial, se hicieron las mismas pruebas bioquímicas que se utilizan en el laboratorio clínico para validar o no su identificación primaria. Una vez confirmada su identificación, las cepas bacterianas se crecieron en caldo infusión cerebro-cq razón por una noche a 37°C, se hicieron 2 diluciones seriadas para tener una concentración bacteriana de 3×10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) / ml, esta suspensión diluida se utilizó como inóculo en todas las pruebas bioquímicas. Las pruebas de Indol, Movilidad y Acido Sulfhídrico (medio de SIM) se realizaron por picadura y se incubó a 37° C por 18-24 horas. Los sustratos por probar (líquidos) una vez estériles se depositaron en microplacas estériles de poliestireno, teniendo por pozo un volumen variable de 250-300 μ l. Las microplacas con los sustratos por probar se inocularon con 10 μ l de la suspensión bacteriana diluida; una vez inoculadas se cubrieron con una envoltura transparente estéril (cuando se requirió de un medio reducido, el sustrato se cubrió con aceite mineral estéril) se incubaron a 37°C por el tiempo requerido para la prueba. La adición de los reactivos, así como la lectura e interpretación de las pruebas se hizo de acuerdo al criterio establecido para todos los sus-

tratos (97-111, 155).

2) Susceptibilidad a Anticribianos. El método utilizado fue el de dilución seriada en placa (159, 160). Los antimicrobianos utilizados y el valor de corte fueron:

ANTIMICROBIANO		CONCENTRACION VALOR DE CORTE µg/ml
Ampicilina	-AM	32
Carbenicilina	-CB	128
Cefotaxima	-CE	4
Estreptomicina	-SM	30
Kanamicina	-KM	20
Gentamicina	-GM	16
Sulfadiazina	-SA	40
Trimetoprim-Sulfametoxazol	-TMP/SMZ	1.6/32
Furazolidona	-F	1
Cloramfenicol	-CM	16
Tetraciclina	-TC	4

Las placas preparadas con el antimicrobiano se inocularon con el replicador de Steers, la concentración bacteriana inoculada fue de 3×10^3 UFC/ml, las placas se incubaron a 37 C por 18-24 horas. Se determinó el grado de susceptibilidad o resistencia del germen por presencia (resistente) o ausencia (susceptibilidad) del crecimiento bacteriano en la placa del antimicrobiano por probar.

3) Susceptibilidad a Metales Pesados. Se utilizó el método de dilución en placa; las sales utilizadas y las concentraciones fueron:

METAL PESADO		CONCENTRACION VALOR DE CORTE µg/ ml
Cloruro férrico	- Fe	1,600
Nitrato de plata	- Ag	128
Cloruro mercurico	- Hg	10
Sulfato de cobre	- Cu	1,600
Nitrato de cobalto	- Co	16
Acetato de plomo	- Pb	3,200
Cromato de potasio	- Cr	1,600
Sulfato de cinc	- Zn	1,600
Cloruro de litio	- Li	1,600
Arseniato de sodio	- As	12,800

Una vez preparadas las soluciones de los metales pesados se esterilizaron por filtración, se añadieron al medio de agar Mueller-Hinton, se inocularon con una concentración bacteriana de 3×10^5 UFC/ml, incubándose a 37°C por 18-24 horas. La lectura e interpretación se hizo en base a la presencia (resistente) o ausencia (susceptible) de crecimiento bacteriano en la placa del metal pesado por probar (52).

4) Susceptibilidad a Bacteriocinas. El método utilizado fue el descrito por Buffenmayer (72). Las cepas productoras fueron donadas por el Dr. S. Slopek del Institute of Immunology and Experimental Therapy Polish Academy of Sciences, Poland, (77) a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, se describen por los siguientes números y letras: 114, 902, L4, K6, D33, D40, 823 y 525, así como la cepa indicadora 9C la cual es sensible a las 8 cepas productoras, se utiliza en la titulación de éstas y como testigo positivo de tipificación. La cepa problema se inoculó en 2 ml de caldo nutritivo y se incubó a 37°C por 6 horas. De este cultivo se sembró con un a-

plicador en forma masiva en agar nutritivo al 2 %, se adicionaron 25 µl de cada uno de los extractos de klebocinas de la dilución inhibitoria que se obtuvo en la titulación de estas bacteriocinas (las cepas productoras tuvieron un título de 1: 256, excepto para D33 que tuvo un título con un rango de 1:4 a 1:128) incubándose a 22°C durante la noche. La lectura de las placas se hizo de acuerdo al criterio de Farmer (64). Los extractos de klebocinas de las cepas productoras se agruparon en pares: 114-902, L4-K6, D33-D40 y 823-525. A la sensibilidad del crecimiento de la cepa problema por los dos extractos se les asignó el número 1; a la sensibilidad al primer extracto y resistencia al segundo se le dió el número 2; la resistencia al primero y sensibilidad al segundo se le asignó el número 3, la resistencia a los dos extractos el número 4, se asignó de esta forma un tipo klebocínico descrito por 4 dígitos. Ejemplo:

Extracto klebocínico:	114-902	L4-K6	D33-D40	823-525
Cepa problema	S-S	R-R	R-S	S-R
Tipo Klebocínico	1	4	3	2

5) Patrón de Material Genético Extracromosomal. El método utilizado fue el de lisis alcalina (166).

Descripción del método: La cepa problema se conservó en medio de Dorset; se tomó una asada, se inoculó en una placa de agar Luria, y se incubó por 18 a 24 horas a 37 C; del crecimiento obtenido se sembró una sola colonia en 5 ml de caldo

Luria, incubándose a 37°C por una noche.

Se colocaron 1.5 ml del cultivo en tubos para microcentrifuga, se centrifugó por 2 minutos, se quitó el sobrenadante dejando el paquete celular lo más seco posible; se resuspendió el paquete celular. Se añadieron 100 µl de la solución 1; se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos, transcurrido este tiempo se añadieron 200 µl de la solución 2 recientemente preparada. Se mezcló el tubo en forma invertida de 2 a 3 veces. Se dejó el tubo en hielo por 5 minutos; se agregaron 150 µl de la solución 3, agitando suavemente en posición invertida durante 10 segundos. Una vez terminado el proceso descrito, se mantuvieron en hielo durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 4°C; transfiriendo el sobrenadante a un tubo limpio, añadiendo volúmenes iguales de una mezcla fenol-cloroformo. Se mezcló con agitador mecánico; centrifugando por 2 minutos; se pasó el sobrenadante a otro tubo. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto a temperatura ambiente. Mezclando con agitador mecánico y se dejó a temperatura ambiente por 2 minutos. Se centrifugó por 5 minutos a temperatura ambiente; quitando el sobrenadante y dejando el tubo en posición invertida sobre una toalla de papel hasta la evaporación del alcohol remanente; se añadió un ml de etanol al 70 %, agitando suavemente, centrifugando nuevamente. El precipitado se dejó lo más seco posible. Se añadieron 50 µl de una solución amortiguadora de Tris pH 8.0 y 10 µl de azul de bromofenol en glicerol al 5 %

(p/v). Una vez obtenido y purificado el ADN de los lisados bacterianos, se depositaron 20 µl de la muestra por analizar en un gel de agarosa al 1 % en una solución amortiguadora de acetatos a pH 8.15, se corrió en una cámara de electroforesis vertical a 60-70 V por 2 a 3 horas, se tñó con bromuro de etidio al 0.0001 % , observándose con un transiluminador de luz ultravioleta. Se usaron como plasmidos de referencia:

PLASMIDO	VECTOR	PESO MOLECULAR MDa
pRSD1	<i>E. coli</i> C600	30,000
pEWD299	<i>E. coli</i> C600	5.2

Para el segundo objetivo, el de la aplicación del método de Ruiz-Shüloper, a fin de establecer un número mínimo de pruebas bioquímicas para la identificación de los géneros y especies de la Tribu *Klebsiellae* que son los que con mayor frecuencia se aíslan como productos biológicos de los pacientes hospitalizados así como al hecho de estar colonizando el medio ambiente hospitalario, se estudiaron 653 cepas de *Enterobacterias*.

Se tuvieron en consideración los lineamientos dados por Edwards y Ewing (97-99).

Este estudio se basó en patrones morfológicos y bioquímicos los cuales se redujeron a 34 caracteres bioquímicos que para fines prácticos se dividieron en azúcares y no azúcares:

AZUCARES

1. *Glucosa
2. *Lactosa
3. Gas de glucosa
10. Rojo de metilo
11. Voges-Proskawer
25. *Sacarosa
26. *Salicina
27. *Sorbitol
28. *Glicerol
29. *Manitol
30. *Ramnosa
31. *Xilosa
32. *Arabinosa
33. *Celobiosa
34. *Esculina

NO AZUCARES

4. Producción de ácido sulfhídrico
5. Movilidad
6. Gelatina
7. DNAasa
8. Lipasa
9. Indol
12. Citrato de Simmons
13. Urea de Christensen
14. @Arginina
15. @Lisina
16. @Ornitina
17. Malonato
18. Caldo KCN (0.5 %)
19. Caldo de Koser
20. Pigmento en agar de soya tripticas
21. Reducción de nitratos
22. Fenil alanina
23. Mucato
24. Tartrato de Jordan y Harmon

* La determinación de la fermentación de glucosa, lactosa y gas de glucosa se hizo en el medio de agar triple azúcar, la fermentación para el resto de los azúcares se probó en caldo base rojo de fenol pH 7.4, la concentración de los azúcares probados fue de 0,1 %.

@ Base caldo de Mueller al 0.5 % del aminoácido por probar.

La metodología es igual a la descrita para la de terminación del Biotipo o Biovar en el brote de infección intrahospitalaria en la sala de Neonatología causada por *Klebsiella ozaenae* así como la lectura e interpretación de las pruebas (155).

Método de descriptores mínimos.

Para comprender este estudio es necesario dar algunas definiciones: si se consideran n cepas ($C_i = 1 \dots n$), a cada una de las cuales se les somete a m pruebas ($P_i =$

1...m) diferentes con respuesta binaria de 1 y 0, se obtiene una serie de columnas y renglones y se define una matriz T.

Definición 1: 'A' un subconjunto de 'K' columnas (pruebas de la matriz T, se le llama descriptor; si las submatrices resultantes de eliminar de T todas las 'K' columnas iguales, y dejar aquellas con diferencia de una sola prueba, se tienen todos los renglones diferentes. La intención de la definición es clara: un descriptor será un conjunto de pruebas que mantiene inequívoca la distinción entre cepas particulares.

Definición 2: Un descriptor es mínimo si no contiene un subconjunto propio, es decir, es el conjunto mínimo de pruebas que describe sin ambigüedad las cepas estudiadas (164).

Definición 3: p_i = "peso informativo" de la prueba i , cuando $p_i = 1$ son pruebas indispensables; por el contrario, las cepas que tengan $p_i = 0$ son prescindibles y se pueden eliminar sin temor a llegar a clasificar incorrectamente. La escala de valores entre 0 y 1 refleja la importancia relativa de cada una de las pruebas.

$$p_i = \frac{\text{número de descriptores que contiene la prueba } i}{\text{número total de descriptores mínimos}}$$

Definición de Terminos utilizados en el Cuadro 10 para el método estadístico.

Sensibilidad: probabilidad de que una prueba resulte positiva, cuando la cepa estudiada fue *K. ozaenae* causante del bro

te de infección nosocomial.

Especificidad: probabilidad de que una prueba resulte negativa, cuando la cepa estudiada fue *K. ozaenae* no relacionada con el brote de infección nosocomial.

Valor predictivo positivo: probabilidad de que siendo la prueba positiva, la cepa de *K. ozaenae* estudiada, estuviese relacionada con el brote de infección nosocomial.

Valor predictivo negativo: probabilidad de que siendo la prueba negativa, la cepa de *K. ozaenae* estudiada no tuviera relación con el brote de infección nosocomial.

Eficiencia: probabilidad de que una prueba resulte cierta, siendo positiva en las cepas de *K. ozaenae* causantes del brote de infección y negativa en las cepas de *K. ozaenae* no relacionadas con el brote.

RESULTADOS

El origen de las cepas estudiadas de *Klebsiella ozaenae* se muestran en el Cuadro 1 (20 cepas del brote epidémico, 31 cepas del ambiente hospitalario y 63 de niños sanos de comunidades extrahospitalarias).

Biotipificación.

Los resultados de biotipificación se agruparon en los cuatro perfiles bioquímicos más frecuentes (Cuadro 2). El 95 % de

las cepas del brote epidémico fueron lactosa (+), Citrato de Simmons (+), y lisina (-) (perfil 'a'); mientras que el 5 % restante fue lactosa (+), Citrato de Simmons (-), y lisina (-) (perfil 'b').

El 16.1 % de las cepas del hospital y el 22.4 de las cepas de la comunidad mostraron también perfil 'a'. El perfil 'b' se encontró en el 35.5 % de las cepas del ambiente hospitalario y en el 38.1 de las cepas de la comunidad.

El perfil bioquímico 'c' (Cuadro 2) que se caracterizó por ser lactosa (-), Citrato de Simmons (-), y lisina (+), fue encontrado en un 38.7 % de las cepas del hospital y en el 30.1 % de las cepas comunitarias. El perfil bioquímico 'd' fue lactosa (-), Citrato de Simmons (+), y lisina (+) y se encontró únicamente en las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad. Ninguna cepa del brote epidémico correspondió a estos dos perfiles bioquímicos.

Susceptibilidad a Antimicrobianos.

Los patrones de resistencia múltiple más frecuentes a antimicrobianos fueron 4 (Cuadro 3). Las cepas del brote epidémico se agruparon en dos patrones de resistencia antibiótica múltiple (8 a 10 antibióticos). Solamente dos cepas del medio ambiente hospitalario compartieron este patrón de resistencia. Todas las demás cepas tuvieron patrones de resistencia diversos pero a un máximo de cinco antibióticos diferentes. Se encontró una menor frecuencia de resistencia antibiótica pero una mayor heterogeneidad en los patrones de resistencia en

las cepas provenientes de la comunidad extrahospitalaria.

Susceptibilidad a Metales Pesados.

El 100 % de las cepas del brote epidémico mostró un patrón de resistencia a Fe, Pb, Zn, Li, y As (Cuadro 4). Este patrón sólo fue compartido por el 45.1 % de las cepas del ambiente hospitalario y el 39.6 % de las cepas de la comunidad.

Susceptibilidad a Klebocinas.

El 95 % de las cepas del brote epidémico correspondieron al patrón 4444 (no fueron sensibles), que también se encontró en el 25.8 % de las cepas del ambiente hospitalario y en el 30.1 % de las cepas de la comunidad. Una cepa del brote epidémico correspondió al patrón 1311 que solamente se encontró en tres cepas de la comunidad (Cuadro 5).

Patrón de Material Genético Extracromosomal.

En este método se utilizaron dos plásmidos de referencia: pRSD1 en *E. coli* (C600) con un peso molecular de 30 MDa, y el pEWD299 también en *E. coli* (C600) con un peso molecular de 5.2 MDa; con las distancias de migración se hizo una gráfica de peso molecular en función de la distancia migrada; al tener sólo 2 puntos se obtuvo una línea recta en la que se hizo la extrapolación para obtener los pesos moleculares relativos de cada una de las cepas en los tres grupos estudiados.

Grupo I (Cuadro 6). Todas las cepas de la población del bro

te epidémico presentaron de uno a cuatro fragmentos de ADN. Los pesos moleculares relativos variaron de 2.3 a 30.5 MDa. Las cepas que presentaron el mayor número de fragmentos fueron: ocho cepas tuvieron un patrón de cuatro bandas; en dos de éstas el patrón de bandas fue semejante (cepas 9 y 10) con pesos moleculares relativos de 15, 14, 9.5 y 2.5 MDa. Las 6 cepas restantes fueron diferentes entre sí.

Grupo II (Cuadro 7). Solamente se estudiaron 20 cepas seleccionadas al azar, de las 31 que se aislaron del medio ambiente hospitalario. Nueve de las 20 cepas (45%) probadas no presentaron bandas de material extracromosomal. Ninguna presentó 4 bandas de ADN y solamente la cepa 32 tuvo 3 bandas con pesos moleculares relativos de 23.5, 8.3 y 1.95 MDa. Las cepas restantes presentaron de una a dos bandas cuyos pesos moleculares aproximados fueron de 1.95 a 8.3 MDa.

Grupo III (Cuadro 8). Solamente se estudiaron 20 cepas seleccionadas al azar, de las 63 obtenidas de la comunidad. Once de las 20 cepas (55 %) no presentaron bandas de material extracromosomal. Solamente dos cepas dieron 3 bandas diferentes con pesos moleculares relativos de 29, 16.5, y 9.5 MDa para una de ellas (52) y 24, 14 y 5.4 MDa para la otra (70). Las otras siete cepas presentaron de 1 a 2 bandas, cuyos pesos moleculares relativos fueron de 4.75 a 26 MDa.

En el Cuadro 9 se puede observar la frecuencia de los diferentes pesos moleculares relativos del material

extracromosómico obtenido de las cepas de *Klebsiella ozaenae* de las tres diferentes poblaciones estudiadas.

Queremos destacar que en las cepas del brote epidémico hubo una gran dispersión de pesos moleculares, pero predominaron aquellas bandas que corresponden a los siguientes pesos moleculares relativos: de 15.0, 14.5, 14.0, 9.5 y 2.5 MDa. En las cepas del ambiente hospitalario los fragmentos más frecuentes son los que tienen pesos moleculares relativos de 8.3 y 2.2 MDa; mientras que en las cepas de la comunidad los pesos moleculares relativos más frecuentes fueron 24.0 y 14.0 MDa.

Las Figuras 1, 3 y 5 corresponden a las gráficas de los pesos moleculares relativos en función de la distancia de migración de cada uno de los Grupos estudiados; en tanto que las Figuras 2, 4 y 6 son las fotografías de las electroforesis del material genético extracromosómico de los grupos mencionados anteriormente.

Como puede observarse, sólo dos cepas del medio ambiente hospitalario (cepas 23, 33) comparten fenotipos de reconocimiento con la mayoría de las del Grupo I (brote nosocomial).

Clasificación Bioquímica. Para la aplicación de la Teoría de Descriptores Mínimos de Ruiz-Shüloper, se utilizó como referencia la cepa de *Klebsiella ozaenae* ATTC 11296. Se compararon tres métodos de clasificación para *Klebsiella ozaenae*:

- a) Clasificación de Brenner (104).
- b) Prueba de descriptores mínimos de Ruiz-Shüloper (164).
- c) Utilización de 34 caracteres bioquímicos de *Klebsiella ozaenae* (99-108).

Se estableció el índice de concordancia (165) entre los tres métodos, comparando en cada caso dos de ellos: Brenner y Descriptores mínimos, Brenner y 34 caracteres bioquímicos, finalmente 27 Descriptores Mínimos y 34 caracteres bioquímicos; encontrando el mejor índice de concordancia ($K_a = 0.6025$) con el método de Brenner y 27 Descriptores Mínimos. Se tuvo menor índice de concordancia con Brenner y 34 caracteres bioquímicos con un valor de $K_a = 0.50$, el valor de $K_a = 0.6025$, según Ladis y Koch corresponde a una concordancia moderada; el índice de concordancia de 27 Descriptores Mínimos y 34 caracteres bioquímicos tuvo un valor de $K_a < 0.50$.

Mínimo de Pruebas Bioquímicas para Identificar una Cepa.

La aplicación del método de Descriptores Mínimos propuesta por Ruiz-Shüloper (164) permitió establecer 14 Pruebas Bioquímicas como el Mínimo para identificar las especies de la Tribu *Klebsiellae* (Cuadro 11). Los resultados del estudio de 653 cepas de *Enterobacterias* con este método mostraron que solamente 543 cepas pertenecieron a la Tribu *Klebsiellae*.

CUADRO 1

ORIGEN DE LAS 114 CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE ESTUDIADAS

<u>G R U P O I</u> CEPAS CAUSANTES DEL BROTE		<u>G R U P O II</u> CEPAS AISLADAS DEL AMBIENTE HOSPITALARIO		<u>G R U P O III</u> CEPAS AISLADAS DE LA COMUNIDAD EXTRAHOSPITALARIA	
<u>PRODUCTO BIOLOGICO</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>	<u>PRODUCTO BIOLOGICO</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>	<u>PRODUCTO BIOLOGICO</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>
HEMOCULTIVO	18	CULTIVO DE: ropa, manos de personal médico, para médico y superficies de objetos inanimados de sa las diferentes a la Sala de Neonatología.	31	* COPROCULTIVOS DE: (preescolares del Distrito Federal)	30
LIQUIDO CEFALORRAQUIDEO	2			° COPROCULTIVOS (de niños sanos de una comunidad rural de Querétaro)	33

- * De niños preescolares sanos del sur de la ciudad de México.
- ° De niños sanos de una comunidad rural de Cadereyta, Querétaro.

ORIGEN DE LAS 114 CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE ESTUDIADAS

<u>G R U P O I</u> CEPAS CAUSANTES DEL BROTE		<u>G R U P O II</u> CEPAS AISLADAS DEL AMBIENTE HOSPITALARIO		<u>G R U P O III</u> CEPAS AISLADAS DE LA COMUNIDAD EXTRAHOSPITALARIA	
<u>PRODUCTO BIOLÓGICO</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>	<u>PRODUCTO BIOLÓGICO</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>	<u>PRODUCTO BIOLÓGICO</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>
HEMOCULTIVO	18	CULTIVO DE: ropa, manos de personal médico, para médico y superficies de objetos inanimados de sa las diferentes a la Sala de Neonatología.	31	* COPROCULTIVOS DE: (preescolares del Distrito Federal)	30
LIQUIDO CEPALORRAQUIDEO	2			° COPROCULTIVOS (de niños sanos de una comunidad rural de Querétaro)	33

- * De niños preescolares sanos del sur de la ciudad de México.
- ° De niños sanos de una comunidad rural de Cadereyta, Querétaro.

UTILIDAD DE DIFERENTES METODOS DE TIPIFICACION DE 114 CEPAS KLEBSIELLA OZAENAE
 Frecuencia relativa de los perfiles bioquímicos más comunes de acuerdo al origen de las cepas

IDENTIFICACION BIOQUIMICA (SUSTRATOS)

GRUPO I (n=20)		NUMERO DE CEPAS Y FRECUENCIA	
PATRON BIOQUIMICO			
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34		
a	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 16	19/20
b	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	17	1/20
c.p.	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +		
GRUPO II (n=31)		NUMERO DE CEPAS Y FRECUENCIA	
PATRON BIOQUIMICO			
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34		
a	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	21, 25, 27, 29, 30, 32, 34, 35, 38, 42, 44, 49	12/31
b	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	24, 26, 28, 31, 36, 40, 41, 43, 47, 48, 50	11/31
c	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	23, 23, 39, 45, 51	5/31
d	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	28, 37, 46	3/31
c.p.	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +		
GRUPO III (n=43)		NUMERO DE CEPAS Y FRECUENCIA	
PATRON BIOQUIMICO			
	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34		
a	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	82, 84, 89, 90, 94, 94, 97, 72, 75, 79, 80, 81, 82, 86, 84, 86, 87, 100, 101, 102, 104, 107, 109, 113, 114,	24/43
b	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	83, 84, 89, 91, 93, 94, 99, 70, 73, 74, 74, 80, 91, 83, 98, 102, 104, 108, 110	19/43
c	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	85, 87, 82, 85, 86, 71, 84, 85, 86, 80, 82, 80, 105, 111	14/43
d	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +	77, 78, 81, 87, 93, 112	6/43
c.p.	+ ⊕ + - - - - - + - ⊖ - ⊖ - - - + - - - - - + + + + + + + + +		

c.p. = cepa patrón Klebsiella ozaenae ATCC 11296
 () número de cepas en cada grupo. ⊖ reacciones diferentes
 a, b, c, d. Patrones bioquímicos más frecuentes en los tres grupos estudiados.
 1 - 34 Sustratos bioquímicos probados: (clave en el texto, página 22).
 ⊕ Patrón compartido ⊖ Patrones más frecuentes

UTILIDAD DE DIFERENTES METODOS DE TIFICACION DE 114 CEPAS *KLEBSIELLA OXYDANS*

Frecuencia relativa de los patrones de resistencia a antimicrobianos más comunes de acuerdo al origen de las cepas

GRUPO I (n=20)		SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS. PATRON DE RESISTENCIA		NUMERO DE CEPAS		FRECUENCIA
ANTIMICROBIANOS PROBADOS						
AM, CB, PP, CF, SM, KM, GM, AK, SA, THP/SBG, F, CH, TC						
AM, CB, PP, SM, KM, GM, SA, THP/SBG, CH, TC				19		1/20
AM, CB, SM, KM, GM, SA, THP/SBG, CH, TC				20		1/20
AM, CB, SM, KM, GM, THP/SBG, CH, TC				1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15		15/20
AM, CB, PP, SM, KM, GM, TC				18		1/20
AM, CB, SM, KM, SA, THP/SBG, F, TC				17		1/20
AM, CB, SM, KM, CH, TC				16		1/20
GRUPO II (n=31)						
AM, CB, SM, KM, GM, THP/SBG, CH, TC				23,33		2/31
AM, CB, PP, CF, SM, SA, CH, TC				28,48		2/31
AM, CB, SM, SA, THP/SBG, CH, TC				21		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, AK, TC				30		1/31
AM, CB, SM, KM, SA, THP/SBG, CH, TC				35		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, AK, CH, TC				36		1/31
AM, CB, PP, SM, KM, GM, SA, CH, TC				41,50		2/31
AM, CB, SM, KM, SA, THP/SBG, TC				49		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, TC				22		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, SA, THP/SBG, F, TC				25		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, TC				27		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, SA, TC				31		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, CH, TC				38,42		2/31
AM, CB, SM, THP/SBG, F, TC				46		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, F, TC				47		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, TC				48		1/31
AM, CB, SM, KM, GM, SA, THP/SBG, TC				26		1/31
AM, CB, SM, KM, THP/SBG, TC				24,32		2/31
AM, CB, SM, KM, SA, THP/SBG, TC				29		1/31
AM, CB, SM, KM, TC				34,43		2/31
AM, CB, SM, SA, THP/SBG, TC				37		1/31
AM, SM, KM, GM, CH, TC				40,44		2/31
AM, SM, KM, SA, TC				51		1/31
AM, SM, KM, AK, TC				39		1/31
GRUPO III (n=62)						
AM, CB, SM, KM, GM, AK, TC				68,89		2/62
AM, CB, SM, KM, THP/SBG, TC				52		1/62
AM, CB, SM, KM, CH, TC				55		1/62
AM, CB, SM, KM, SA, THP/SBG, TC				56		1/62
AM, CB, SM, KM, GM, TC				96,109		2/62
AM, CB, SM, KM, TC				83,99		2/62
AM, CB, SM, KM, GM, AK, TC				84		1/62
AM, CB, SM, KM, CH, TC				59		1/62
AM, CB, SM, KM, GM, SA, TC				62		1/62
AM, CB, SM, KM, SA, F, TC				64,103,106		3/62
AM, CB, SM, KM, SA, TC				79		1/62
AM, CB, SM, KM, GM, SA, TC				82,107		2/62
AM, CB, SM, KM, TC				114		1/62
AM, CB, SM, KM, GM, AK, TC				73,83,88		3/62
AM, CB, SM, KM, GM, CH, TC				71,94		2/62
AM, CB, SM, KM, GM, SA, THP/SBG, F, TC				76,81,92		3/62
AM, CB, SM, KM, SA, CH, TC				77		1/62
AM, CB, SM, KM, SA, THP/SBG, CH, TC				78		1/62
AM, CB, SM, SA, THP/SBG, F, TC				100		1/62
AM, CB, SM, SA, F, TC				101		1/62
AM, SM, KM, GM, TC				51,83		2/62
AM, SM, KM, GM, CH, TC				54,68,85,111		4/62
AM, SM, KM, CH, TC				66,113		2/62
AM, SM, KM, TC				67		1/62
AM, SM, KM, SA, CH, TC				70,75		2/62
AM, SM, KM, SA, CH, TC				80		1/62
AM, SM, KM, SA, CH, TC				87		1/62
AM, SM, KM, SA, CH, TC				89,95		2/62
AM, CB, PP, SM, KM, SA, CH, TC				90,105		2/62
AM, CB, SM, SA, TC				94		1/62
AM, SM, SA, TC				97,110		2/62
AM, SM, TC				102		1/62
AM, CB, SM, TC				57		1/62
AM, SM, SA, THP/SBG, TC				59,108		2/62
AM, SM, SA, THP/SBG, TC				61,72,91,104		4/62
AM, SM, SA, THP/SBG, TC				65,82,86,98,112		4/62

* No presentaron patrón de resistencia (n) Número de cepas en cada grupo
 AM = Ampicilina CB = Carbencilina PP = Piperacilina
 CF = Cefotaxima SM = Estreptomicina KM = Kanamicina
 GM = Gentamicina AK = Amikacina SA = Sulfadiazina
 THP/SBG = Trimetoprim-sulfametoxazol F = Furazolidona
 CM = Cloranfenicol TC = Tetraciclina Patrón compartido
 Patrones más frecuentes

UTILIDAD DE DIFERENTES METODOS DE TIPIFICACION DE 114 CEPAS DE KLEBSIELLA OZAMENAR

Frecuencia relativa de los patrones de resistencia a metales pesados más comunes de acuerdo al origen de las cepas

GRUPO I (n=20)

SUSCEPTIBILIDAD A METALES PESADOS. PATRON DE RESISTENCIA

METALES PESADOS PROBADOS		NUMERO DE CEPAS	FRECUENCIA
Fe, Ag, Hg, Cu, Co, Pb, Cr, Zn, Li, As			
⊕ Fe,	Pb, Zn, Li, As	1 - 20	20/20

GRUPO II (n=31)

Fe,	Cu, Co, Pb,	Zn, Li, As	36	1/31
Fe,	Cu,	Pb, Zn, Li, As	22,41	2/31
Fe,	Cu, Co, Pb,	Li, As	30,	1/31
Fe,	Cu,	Pb, Cr, Li, As	31,48,50	3/31
⊕ Fe,	Pb,	Zn, Li, As	21,23,28,29,32,33	13/31
			35,36,38,39,42,44,47	
Fe,	Pb,	Li, As	27,37	2/31
Fe,	Cu,	Li,	25,43,46,	3/31
Fe,	Pb,	As	34	1/31
Fe,		Li, As	40	1/31
		Zn, Li, As	4	1/31
		Pb, Zn, Li,	49	1/31
		Pb, Li, As	51	1/31

GRUPO III (n=63)

Fe,	Cu,	Pb,	Zn, Li, As	53,54,55,62,65,69,74,76,80,83,84,86,88, 89,91,94,99,102,103,111,114	20/63
⊖ Fe,		Pb,	Zn, Li, As	52,56,58,60,64,66,70,72,75,77,79,81,82, 86,90,92,93,97,100,104,105,106,110,113	25/63
Fe,		Pb,	Li, As	57,63,67,73,87,96,109,112	8/63
	Cu,	Pb,	Li, As	59,68,71	2/63
			Zn, Li, As	91	1/63
Fe,			Li,	61,76	2/63
		Pb,	Li,	83	1/63
			Li, As	85,103	2/63
	Cu,		Li,	95	1/63
Fe,			Zn,	107	1/63
			Li,	101	1/63

(n) Número de cepas en cada grupo

Fe = Cloruro férrico
 Ag = Nitrato de plata
 Hg = Cloruro mercurico
 Cu = Sulfato de cobre
 Co = Nitrato de cobalto

Pb = Acetato de plomo
 Cr = Cromato de potasio
 Zn = Sulfato de cinc
 Li = Cloruro de litio
 As = Arseniato de sodio

⊕ Patrón compartido

⊖ Patrones más frecuentes

UTILIDAD DE DIFERENTES METODOS DE TIPIFICACION DE 114 CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE

Frecuencia relativa de los patrones klebocínicos más comunes de acuerdo al origen de las copas

GRUPO I (n=20)

* PATRON KLEBOCINICO	NUMERO DE CEPAS	FRECUENCIA
<input type="checkbox"/> 4 4 4 4	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,18,19,20	19/20
1 3 1 1	17	1/20

GRUPO II (n=31)

* PATRON KLEBOCINICO	NUMERO DE CEPAS	FRECUENCIA
<input type="checkbox"/> 1 1 1 1	24,28,30,35,36,38,41,42,44,48,50	11/31
<input checked="" type="checkbox"/> 4 4 4 4	21,22,23,26,31,33,43,47	8/31
1 2 1 1	27,32,40	3/31
4 4 2 4	25,46	2/31
4 3 4 4	29,45	2/31
4 4 2 3	39,49	2/31
1 3 1 1	37	1/31
4 4 1 1	51	1/31
3 2 2 1	34	1/31

GRUPO III (n=63)

* PATRON KLEBOCINICO	NUMERO DE CEPAS	FRECUENCIA
<input type="checkbox"/> 4 4 4 4	52,56,61,63,69,70,71,74,75,77,79,80,84,88,90,98,104,106	18/63
1 1 1 1	54,58,65,66,67,89,91,93,94,95,97,100,101,107,109,110,113	17/63
1 2 1 1	55,59,60,62,68,73,78,99,111,112	10/63
4 4 2 4	53,92,102,108	4/63
4 4 2 3	57,68,82,86,	4/63
1 3 1 1	72,76,114	3/63
4 3 4 4	85,96	2/63
3 1 1 1	87	1/63
1 2 3 1	105	1/63
2 4 2 4	103	1/63
4 2 4 4	64	1/63
2 1 1 1	83	1/63

(n) Número de cepas en cada grupo

* De acuerdo al criterio de Farmer

1 = Sensibilidad del crecimiento a ambos extractos (cepas productoras número 114,902).

2 = Sensibilidad al primer extracto (cepa productora número 823) y resistencia al segundo (cepa productora número 525).

3 = Resistencia al primer extracto (cepa productora D-33) y sensibilidad al segundo (cepa productora D-40).

4 = Resistencia al crecimiento a los dos extractos (cepas productoras número L-4,K-6).

Patrón compartido

Patrones más frecuentes

CUADRO 6

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE
(CEPAS CAUSANTES DEL BROTE)

G R U P O I

<u>CEPAS CON FRAGMENTOS SIMILARES</u>				<u>CEPAS CON FRAGMENTOS DIFERENTES</u>			
CEPAS CON PATRON	NUMERO DE CEPAS	CEPA NUMERO	PESO MOLECULAR (MDa)	CEPAS CON PATRON	NUMERO DE CEPAS	CEPA NUMERO	PESO MOLECULAR (MDa)
DE 4 BANDAS	2	9, 10	15.0, 14.0, 9.5, 2.5	DE 4 BANDAS	6	1	28.0, 16.5, 12.5, 5.3
						2	30.5, 23.0, 18.5, 15.0
						4	15.0, 14.5, 9.5, 5.3
						13	14.8, 14.5, 9.5, 2.3
						15	25.0, 12.2, 9.5, 2.3
						18	28.0, 14.5, 7.2, 2.3
DE 3 BANDAS	3	5, 6, 7	14.0, 9.5 2.5	DE 3 BANDAS	2	14	24.5, 7.8, 2.3
						19	12.0, 7.2, 2.3
DE 2 BANDAS	3	8, 11, 12	9.5, 2.5	DE 2 BANDAS	2	3	26.0, 2.3.
						17	14.5, 2.3
DE 1 BANDA				DE 1 BANDA	2	16	2.3
						20	12.1

CUADRO 6

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE
(CEPAS CAUSANTES DEL BROTE)

G R U P O I

<u>CEPAS CON FRAGMENTOS SIMILARES</u>				<u>CEPAS CON FRAGMENTOS DIFERENTES</u>			
CEPAS CON PATRON	NUMERO DE CEPAS	CEPA NUMERO	PESO MOLECULAR (MDa)	CEPAS CON PATRON	NUMERO DE CEPAS	CEPA NUMERO	PESO MOLECULAR (MDa)
DE 4 BANDAS	2	9, 10	15.0, 14.0, 9.5, 2.5	DE 4 BANDAS	6	1	28.0, 16.5, 12.5, 5.3
						2	30.5, 23.0, 18.5, 15.0
						4	15.0, 14.5, 9.5, 5.3
						13	14.8, 14.5, 9.5, 2.3
						15	25.0, 12.2, 9.5, 2.3
						18	28.0, 14.5, 7.2, 2.3
DE 3 BANDAS	3	5, 6, 7	14.0, 9.5 2.5	DE 3 BANDAS	2	14	24.5, 7.8, 2.3
						19	12.0, 7.2, 2.3
DE 2 BANDAS	3	8, 11, 12	9.5, 2.5	DE 2 BANDAS	2	3	26.0, 2.3
						17	14.5, 2.3
DE 1 BANDA				DE 1 BANDA	2	16	2.3
						20	12.1

CUADRO 7

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE
(CEPAS AISLADAS DEL MEDIO HOSPITALARIO)

G R U P O II

<u>CEPAS CON FRAGMENTOS SIMILARES</u>				<u>CEPAS CON FRAGMENTOS DIFERENTES</u>			
<u>CEPAS CON PATRON</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>	<u>CEPA NUMERO</u>	<u>PESO MOLECULAR (MDa)</u>	<u>CEPAS CON PATRON</u>	<u>NUMERO DE CEPAS</u>	<u>CEPA NUMERO</u>	<u>PESO MOLECULAR (MDa)</u>
				DE 3 BANDAS	1	32	23.5, 8.3 1.95
DE 2 BANDAS	5	23, 33, 35, 36, 41	8.3, 2.19	DE 2 BANDAS	2	34 40	3.7, 2.19 8.3, 1.95
DE 1 BANDA	2	47, 48	8.3	DE 1 BANDA	1	42	5.2

Las cepas No: 21, 22, 24, 25, 26, 30, 31, 45, 50 no presentaron bandas de material genético extracromosomal.

CUADRO 8

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE
(CEPAS AISLADAS DE LA COMUNIDAD)

G R U P O III

<u>CEPAS CON FRAGMENTOS DIFERENTES</u>			
CEPAS CON PATRON	NUMERO DE CEPAS	CEPA NUMERO	PESO MOLECULAR (MDa)
DE 3 BANDAS	2	52	29.0, 16.5, 9.5
		70	24.0, 14.0, 5.4
DE 2 BANDAS	4	54	24.0, 14.0
		65	14.0, 5.2
		73	24.0, 13.5
		80	29.0, 4.75
DE 1 BANDA	3	51	26.0
		53	24.0
		77	9.5

Las cepas No: 55, 60, 66, 67, 68, 69, 72, 74, 75, 76, 78 no se presentaron bandas de material genético extracromosomal.

CUADRO 9

FRECUENCIA DE PESOS MOLECULARES DEL MATERIAL EXTRACROMOSOMICO OBTENIDO DE CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE EN LAS DIFERENTES POBLACIONES ESTUDIADAS

POBLACION I			POBLACION II			POBLACION III		
f	d/cm	P.M.r (MDa)	f	d/cm	P.M.r (MDa)	f	d/cm	P.M.r (MDa)
11	6.5	9.5	9	6.5	8.3	4	2.7	24.0
9	11.0	2.5	6	11.0	2.2	3	5.0	14.0
5	5.4	14.0	2	11.5	1.9	2	2.2	29.0
4	5.2	14.5	1	2.7	23.5	2	6.5	9.5
3	4.2	15.0	1	8.0	3.7	1	2.5	29.0
2	2.5	28.0	1	9.0	3.5	1	4.7	16.5
2	5.6	12.0				1	5.0	14.0
2	7.8	7.2				1	5.2	13.5
2	8.7	5.3				1	9.0	5.2
2	11.5	2.3				1	9.5	4.7
1	2.3	30.5						
1	2.7	26.0						
1	2.8	24.5						
1	2.9	24.5						
1	3.3	23.0						
1	4.0	18.5						
1	4.4	16.5						
1	4.5	14.8						
1	4.9	14.0						
1	5.5	12.2						
1	5.8	11.2						
1	7.0	7.8						
Plasmidos de Referencia			Plasmidos de Referencia			Plasmidos de Referencia		
	d	P.M.		d	P.M.		d	P.M.
	(cm)	(MDa)		(cm)	(MDa)		(cm)	(MDa)
pRS _{D1}	2.3	30.0	pRS _{D1}	2.0	30.0	pRS _{D1}	2.1	30.0
pEWD			pEWD			pEWD		
299	8.5	5.2	299	8.5	5.2	299	8.5	5.2

f = frecuencia = No. de bandas/ No. total de cepas analizadas P.M. = Peso molecular

d/cm = distancia de migración del material genético extracromosomal en centímetros

(MDa) = Mega daltones

CUADRO 10

UTILIDAD DE CUATRO METODOS DE TIPIFICACION PARA IDENTIFICAR A LAS CEPAS DE KLEBSIELLA OZAENAE, CAUSANTES DE UN BROTE EPIDEMICO INTRAHOSPITALARIO Y DIFERENCIARLAS DE LAS NO RELACIONADAS CON EL MISMO

INDICADOR	METODO DE TIPIFICACION			
	PRUEBAS BIOQUIMICAS	RESISTENCIA A METALES PESADOS	SENSIBILIDAD A KLEBOCINAS	RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS
Sensibilidad	95.0 %	100.0 %	95.0 %	85.0 %
Especificidad	84.0 %	58.5 %	71.3 %	97.8 %
Valor predictivo positivo	55.9 %	33.9 %	41.3 %	88.2 %
Valor predictivo negativo	98.7 %	100.0 %	98.5 %	96.8 %
Eficiencia	85.9 %	65.7 %	75.4 %	95.6 %

$$\text{Sensibilidad} = \frac{vp}{vp + fn} \times 100$$

$$\text{Especificidad} = \frac{vn}{vn + fp} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{vp}{vp + fp} \times 100$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{vn}{vn + fn} \times 100$$

$$\text{Eficiencia} = \frac{vp + vn}{vp + vn + fp + fn} \times 100$$

vp = verdaderos positivos

vn = verdaderos negativos

fp = falsos positivos

fn = falsos negativos

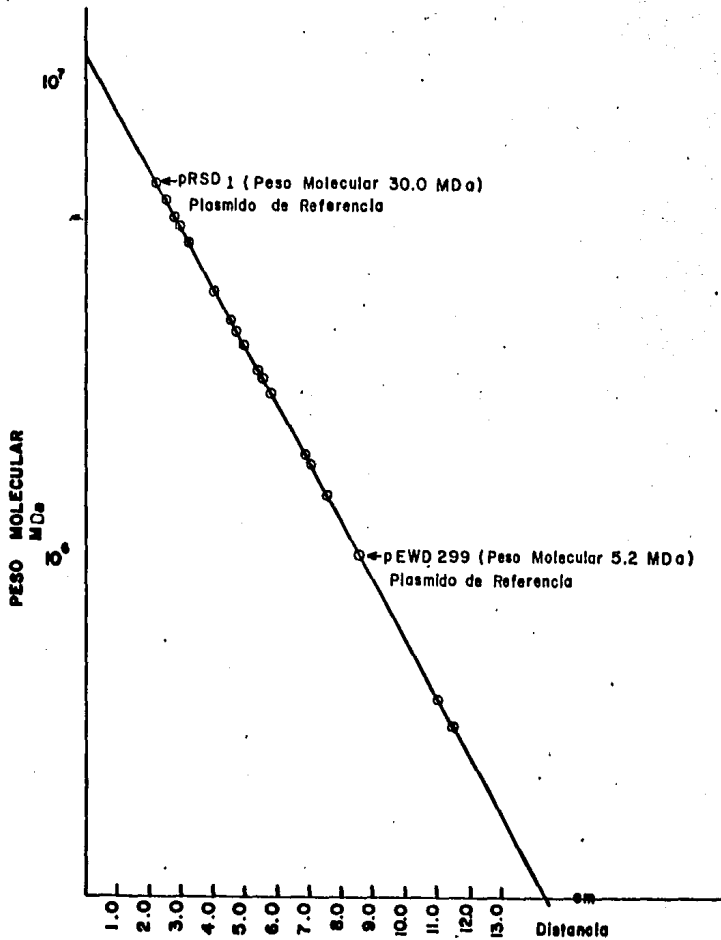


Figura 1 Peso Molecular relativo del Material Extracromosomal de 20 cepas de Klebsiella pneumoniae (Brote Hospitalario) Hospital de pediatria CMN, IMSS.

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE KLEBSIELLA OZAENAE

Población I. Cepas de brote epidémico

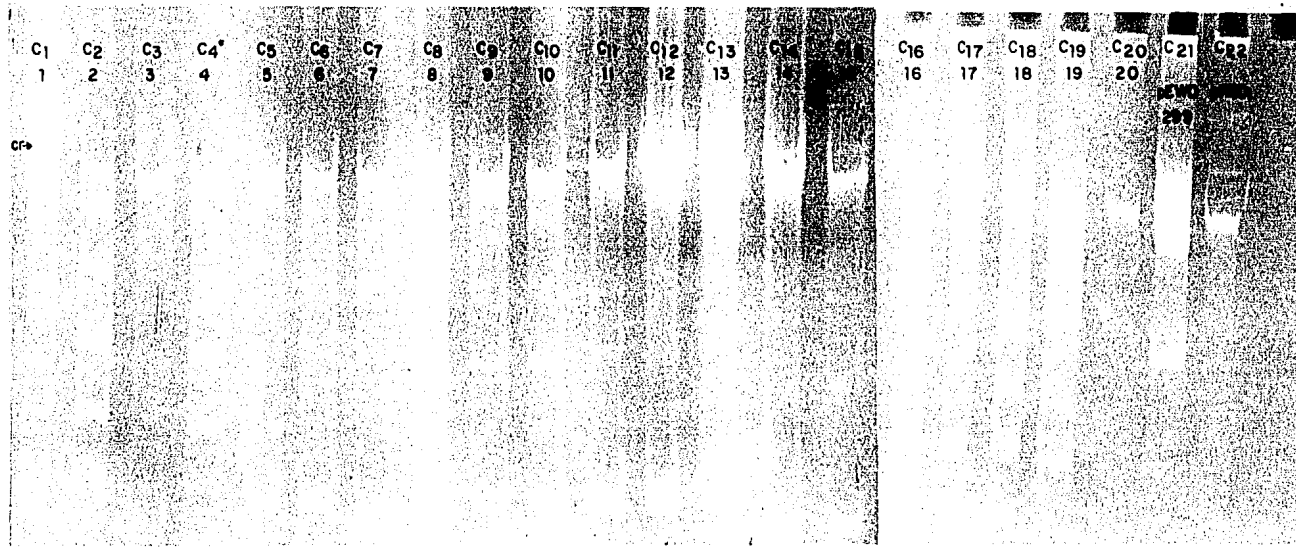


Figura 2. Carriles 1-20 fotografía del material genético extracromosomal de 20 cepas de Klebsiella ozaenae del brote epidémico, carril 21 plásmido de referencia pEWD 299 (Peso Molecular 5.2 MDa), carril 22 plásmido de referencia pRSD₁ (Peso Molecular 30.0 MDa)

cr = cromosoma bacteriano

C = carril No. 1 - 20

1 - 20 = cepa número: 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20

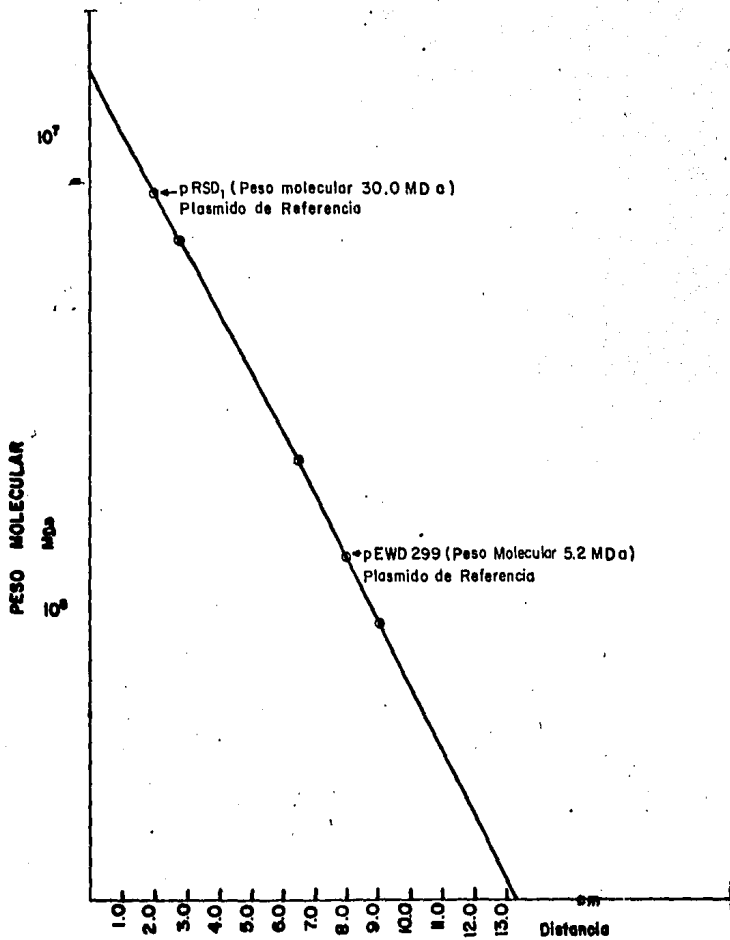


Figura 3. Peso Molecular relativo del Material Extracromosomal de 20 cepas de *Klebsiella ozaenae* (Medio Ambiente Hospitalario), Hospital de Pediatría CMN, IMSS.

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE KLEBSIELLA OZAENAE

Población II. Cepas del ambiente hospitalario.

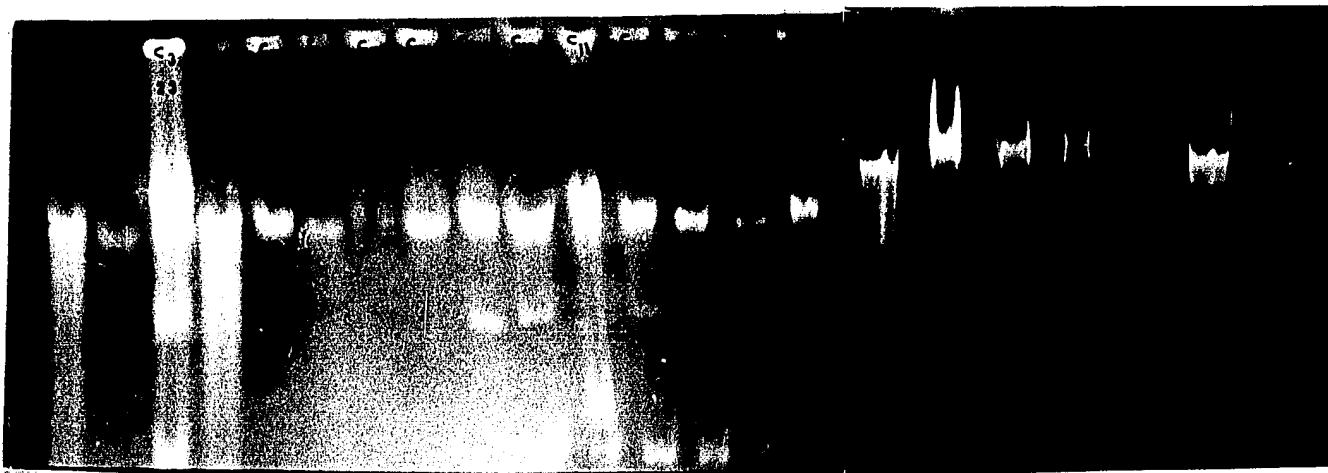


Figura 4. Carriles 1-20 fotografía del material genético extracromosomal de 20 cepas de Klebsiella ozaenae del ambiente hospitalario, carril 21 plásmido de referencia pEWD 299 (Peso Molecular 5.2 MDa), carril 22 plásmido de referencia pRSD₁ (Peso Molecular 30.0 MDa)

cr = cromosoma bacteriano

c = carril número 1 - 20

1-20 = cepa número: 21, 22, 23, 24, 25, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 45, 47, 48, 50

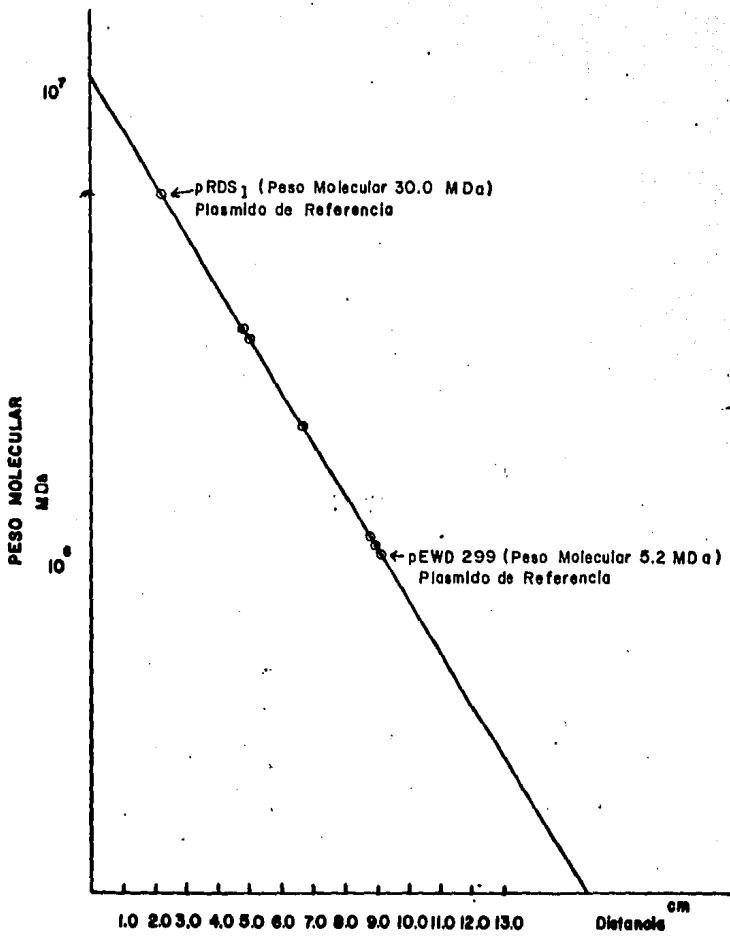


Figura 5. Peso Molecular relativo del Material Extracromosomal de 20 cepas de Klebsiella pneumoniae (Comunidad Extrahospitalaria) Hospital de pediatria CMN, IMSS

PATRON DE MATERIAL GENETICO EXTRACROMOSOMAL DE KLEBSIELLA OZAENAE

Población III. Cepas de la comunidad

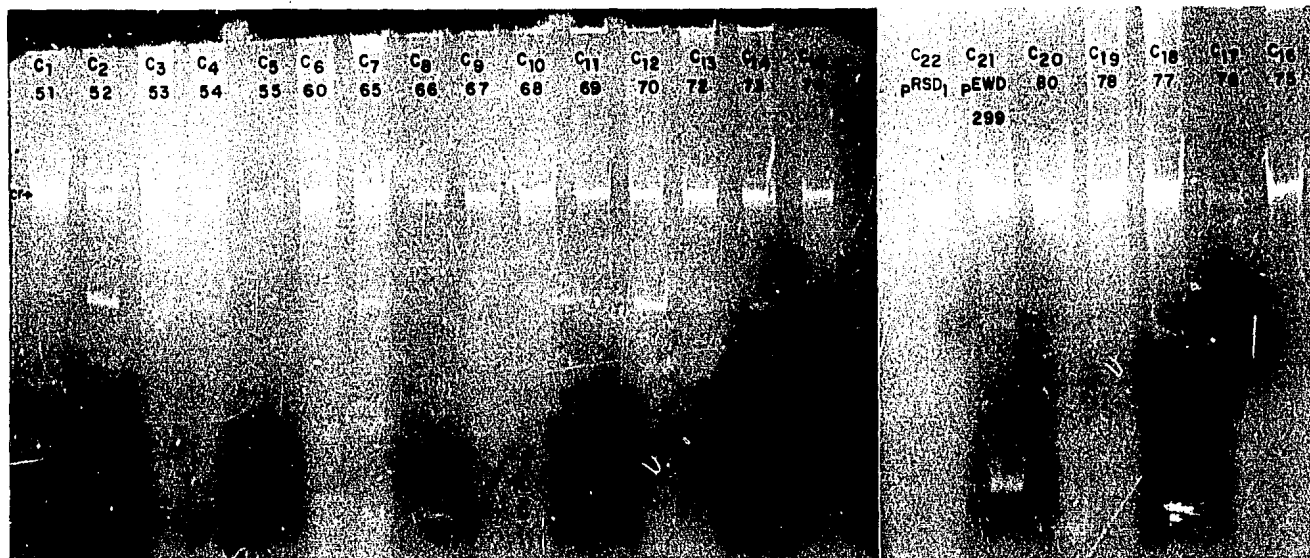


Figura 6. Carriles 1-20 fotografía del material genético de 20 cepas de Klebsiella ozaenae de la comunidad, carril 21 plásmido de referencia pEWD 299 (Peso Molecular 5.2 MDa), carril 22 plásmido de referencia pRSD₁ (Peso Molecular 30.0 MDa)

cr = cromosoma bacteriano

c = carril No. 1-20

1-20 = cepa número: 51, 52, 53, 54, 55, 60, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 80

CUADRO 11

PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA IDENTIFICACION DE LA
TRIBU *KLEBSIELLAE*

AZUCARES			NO AZUCARES		
No.Prueba	Substrato	P.I.*	No.Prueba	Substrato	P.I.*
2	@ Lactosa	1.00	9	Malonato	0.96
5	Xilosa	1.00	4	@ C. Simmons	0.87
12	Ramnosa	1.00	1	@ H S 2	0.78
13	Glicerol	0.75	5	@ Urea	0.72
1	@ Gas Glucosa	0.60	10	KCN	0.65
3	@ Rojo de Metilo	0.60	12	Mucato	0.58
6	Sacarosa	0.60	13	Tartrato	0.58
9	Salicina	0.50	3	@ Indol	0.52
11	Manitol	0.50	2	@ Movilidad	0.52
4	@ V-P	0.40	6	@ Arginina	0.51
10	Esculina	0.40	11	Fenilalanina	0.47
8	Salicina	0.25	8	@ Ornitina	0.41
9	Sorbitol	0.25	7	@ Lisina	0.38

* P.I. = peso informativo de la prueba i.

La escala relativa entre 0 y 1 refleja la importancia relativa de cada una de las pruebas.

@ = Corresponden al minimo de pruebas bioquimicas para la identificacion de las especies de la Tribu *Klebsiellae*.

DISCUSION

El manejo y control de las infecciones nosocomiales, constituyen un problema de salud pública que tiene repercusión en la morbilidad hospitalaria, así como en la economía de un país (1-10, 141-150).

En el Hospital de Pediatría del CMN, IMSS, la incidencia de infecciones nosocomiales en el periodo 1982-1985 fue de 9.1 por cada 100 egresos, con 1.1 infecciones por paciente. Durante este lapso, el segundo agente patógeno en frecuencia pertenecía al género *Klebsiella* (*K. ozaenae*) (10). La ocurrencia en el servicio de recién nacidos de un brote de infección nosocomial (en la sección de pacientes no infectados) cuyo agente etiológico fue *Klebsiella ozaenae*, permitió realizar un estudio con 5 diferentes marcadores microbiológicos y analizar su importancia epidemiológica.

Para cumplir con nuestro primer objetivo, utilizamos 5 diferentes métodos de tipificación: 1) Determinación de Biotipo o Biovar, 2) Susceptibilidad a Antimicrobianos, 3) Susceptibilidad a Metales Pesados, 4) Susceptibilidad a Klebocinas y 5) Análisis del Patrón de Material Genético Extracromosomal, para diferenciar a las poblaciones microbianas involucradas en el brote de infección nosocomial por *Klebsiella ozaenae*, de los microorganismos que colonizan el Hospital de Pediatría del CMN, IMSS, y establecimos la hipótesis de que la descripción de la presencia o ausencia de

material extracromosómico en las cepas de *Klebsiella ozaenae* proporcionaría la información más útil para distinguir a las poblaciones microbianas involucradas (113-133).

En general, en un brote de infección nosocomial se estudian tanto cepas causantes del brote (en nuestro caso Grupo I), como las aisladas del ambiente hospitalario (Grupo II). En este estudio, se incluyeron además, cepas aisladas de niños sanos de una comunidad, para tener un grupo contraste o testigo por su diferente origen (Grupo III).

Marcadores Utilizados

Biotipo. Esta determinación está basada en las propiedades morfológicas, metabólicas, crecimiento y replicación del microorganismo en un medio tolerante (34, 94-111). La determinación del biotipo no es un carácter que se estudie en forma aislada, por el contrario, se asocia en diferentes combinaciones a otros marcadores. Ejemplos: Cepas de *E. coli* del serogrupo O157: H7 que no fermentan el sorbitol, productora de toxinas y factor de adherencia localizado (161-162); la fermentación de lactosa y otros azúcares por *E. coli* (EPEC) productora de toxinas termolábil y termoestable, con patrones de resistencia a Antimicrobianos y Metales Pesados (49). Sin embargo, cuando se ha comparado la determinación de Biotipo con otros marcadores, ejemplo: patrón de plasmidos, no se encuentra una buena correlación (115-117, 120-125; 129-133) e incluso algunos autores lo consideran de escaso valor

(49, 113-126).

En las cepas estudiadas por nosotros la característica bioquímica de las cepas presentó una clara diferenciación en el 95 % de las cepas causantes del brote, ya que el perfil bioquímico de éstas (lactosa +, Citrato de Simmons + y lisina -) solamente ocurrió en el 16.1 y en el 22.4 % de las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad, respectivamente (Cuadro 2). El 5 % restante de las cepas del brote compartió características bioquímicas (lactosa +, Citrato de Simmons - y lisina -) con las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad.

No es posible eliminar la posibilidad de que el brote se haya iniciado por una cepa del ambiente hospitalario; sin embargo, los porcentajes encontrados sugieren lo contrario, es decir, que el brote se inició en la sala de recién nacidos con la diseminación ulterior al ambiente hospitalario, fenómeno ya descrito en la literatura (113-133). Cabe destacar, que las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad prácticamente fueron indistinguibles, ya que compartieron características bioquímicas semejantes en los cuatro perfiles encontrados (Cuadro 2).

A pesar de que la biotipificación, no se considera un marcador epidemiológico confiable, debido a que no es una propiedad genética estable, ya que se ve influido por las condiciones del medio y por la presencia de material extracromosómico (34, 49), en nuestro caso, con una pobla-

ción bacteriana muy homogénea en sus características, como lo fue la del brote, resultó un indicador de utilidad.

Susceptibilidad Antimicrobiana. La multiresistencia de los patógenos nosocomiales difiere significativamente en el tipo y severidad de infección que causan; su manejo y respuesta a los tratamientos terapéuticos tradicionales es difícil, lo cual se refleja en los altos índices de morbilidad y mortalidad hospitalaria (113-133, 163).

La tipificación por patrones de susceptibilidad antimicrobiana es el que con mayor frecuencia se usa en el medio hospitalario como marcador epidemiológico (12-14, 113-129, 163). Los resultados en nuestro trabajo, confirman la importancia de este tipo de estudios durante brotes epidémicos dentro de los hospitales, ya que 17 de las 20 cepas mostraron resistencia a múltiples Antibióticos (8 a 10 Antibióticos), mientras que solamente 2 cepas del ambiente hospitalario y ninguna de la comunidad mostraron este patrón. Llama la atención la elevada frecuencia de resistencia a Antibióticos (hasta 5 antibióticos) observada en las cepas del ambiente hospitalario, y aún en la comunidad, aunque cuando las cepas más frecuentes del hospital no son en este aspecto semejantes a las de la comunidad (Cuadro 3), hecho que sugiere la existencia de un fenómeno de selección por presión del uso de antimicrobianos, que se ha descrito en los hospitales (113-133, 141).

ción bacteriana muy homogénea en sus características, como lo fue la del brote, resultó un indicador de utilidad.

Susceptibilidad Antimicrobiana. La multiresistencia de los patógenos nosocomiales difiere significativamente en el tipo y severidad de infección que causan; su manejo y respuesta a los tratamientos terapéuticos tradicionales es difícil, lo cual se refleja en los altos índices de morbilidad y mortalidad hospitalaria (113-133, 163).

La tipificación por patrones de susceptibilidad antimicrobiana es el que con mayor frecuencia se usa en el medio hospitalario como marcador epidemiológico (12-14, 113-129, 163). Los resultados en nuestro trabajo, confirman la importancia de este tipo de estudios durante brotes epidémicos dentro de los hospitales, ya que 17 de las 20 cepas mostraron resistencia a múltiples Antibióticos (8 a 10 Antibióticos), mientras que solamente 2 cepas del ambiente hospitalario y ninguna de la comunidad mostraron este patrón. Llama la atención la elevada frecuencia de resistencia a Antibióticos (hasta 5 antibióticos) observada en las cepas del ambiente hospitalario, y aún en la comunidad, aunque cuando las cepas más frecuentes del hospital no son en este aspecto semejantes a las de la comunidad (Cuadro 3), hecho que sugiere la existencia de un fenómeno de selección por presión del uso de antimicrobianos, que se ha descrito en los hospitales (113-133, 141).

En la actualidad, el patrón de susceptibilidad a antimicrobianos es considerado como un marcador presuntivo, que puede o no correlacionar con otros fenotipos de reconocimiento. Las limitaciones del método de Susceptibilidad Antimicrobiana incluye el tipo del microorganismo en los que se puede aplicar (gérmenes de crecimiento lento como *Haemophilus influenzae* o gérmenes anaeróbios como *Clostridium difficile*). Generalmente la información de la multirresistencia antimicrobiana se asocia a la existencia y diseminación de factores R (113-133, 137, 141, 143, 163), que puede ser debida a un sólo plasmido o a genes cromosomales preexistentes (113-133, 163).

Susceptibilidad a Metales Pesados. La tipificación por este método se aplicó inicialmente a las cepas en las que se utiliza la serotipificación como uno de los métodos de elección primaria (42-52, 54, 55). En la actualidad se sabe que algunas de las resistencias a metales pesados se encuentran codificados en transposones (Tn 10, resistencia a mercurio), lo que disminuye la sensibilidad del método ya que este fenotipo al estar codificado por un elemento móvil en el genoma bacteriano puede dar resultados no siempre reproducibles (42-52, 54, 114-124, 131).

Aparentemente la combinación de Biotipificación, Susceptibilidad a Antimicrobianos, a Metales Pesados, producción y Susceptibilidad a Bacteriocinas, pueden proporcionar información valiosa en los brotes epidemiológicos. Existen

reportes en los que la resistencia a un sólo metal pesado (Ag, 38) fue útil como marcador epidemiológico (50-55, 131).

A pesar de que las cepas del brote de infección nosocomial mostraron un patrón uniforme de resistencia a metales pesados (Fe, Pb, Zn, Li y As) fue un indicador epidemiológico poco confiable porque el 45.1 y el 39.62 % de las cepas de los Grupos II y III compartían esta misma característica (Cuadro 4). Llama la atención la semejanza entre las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad, ahora con respecto a esta característica, lo cual sugiere una gran diseminación de factores R, tanto en el medio hospitalario como en la comunidad. Nuevamente en el Grupo II, aparecen las dos cepas que comparten **Biotipo, Patrón de Susceptibilidad Antimicrobiana y Metales Pesados**, con las cepas causantes del brote.

Susceptibilidad a Bacteriocinas. Es un método originalmente utilizado para suplir al método de serotipificación de *E. coli* (57, 60-63, 65-91) que más tarde se aplicó a otros géneros con buenos resultados, ejemplo: *Enterobacter spp.* (92), que es una especie que no tiene procedimientos de tipificación estandarizados.

En nuestro trabajo, el patrón predominante en el **Grupo I** (patrón klebocínico 4444, según el método mnemotécnico de Farmer) estuvo presente en el **Grupo II** (25.8 %) y **III** (30.1 %), respectivamente. Las características de las ce

pas de *Klebsiella* con este método son semejantes a lo observado con la Susceptibilidad a Metales Pesados: homogeneidad en las cepas del brote, que se agrupan sólo en dos patrones y heterogeneidad semejante en las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad, así como la pobre utilidad como marcador epidemiológico independiente.

La forma en que se reportan los resultados obtenidos en esta técnica no son uniformes, ya que diferentes autores han utilizado sistemas diferentes, generalmente de tipo mnemotécnico (76, 82, 85, 86, 89, 92) o bien se le asocia a otros fenotipos de reconocimiento (57, 58, 60).

Al analizar nuestra información con los 4 primeros marcadores, los resultados sugieren, de acuerdo a la eficiencia, que la Susceptibilidad Antimicrobiana fue el más eficaz (95.6 %) y en orden decreciente, la determinación del biotipo (85.9 %), Patrón Klebocínico (75.4 %) y finalmente la resistencia a Metales Pesados (65.7 %, Cuadro 10). Este análisis estadístico no se aplicó al Patrón de Material Genético Extracromosomal debido a la diferencia respecto al tamaño de la muestra, ya que en los primeros 4 marcadores utilizados se estudiaron 114 cepas en total, en tanto que en el último marcador sólo se probaron 60 cepas, escogidas al azar.

Patrón de Material Genético Extracromosomal. El patrón de Material Genético Extracromosomal mostró una gran heterogeneidad, sin embargo permitió diferenciar a las poblaciones

involucradas en cuanto a la presencia, ausencia y frecuencia del material genético extracromosómico. El 100 % de las cepas causantes del brote de infección nosocomial presentaron bandas de material extracromosomal, contra 55 y 45 % de las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad, respectivamente ($p < 0.01$). El 65 % de las cepas causantes del brote de infección nosocomial presentó 3 ó 4 fragmentos de material extracromosomal, contra 5 y 10 % de las cepas del ambiente hospitalario y de la comunidad, respectivamente ($p < 0.01$). No podemos establecer correspondencia entre la presencia de las numerosas bandas del material extracromosómico presentes en el Grupo I y algún fenotipo de reconocimiento. La presencia de estas bandas pudieran corresponder a las diferentes formas de ADN, o bien a las diferentes formas oligoméricas de éste, por lo que sería necesario hacer estudios de clonación y transformación que nos permitieran reconocer a las diversas bandas presentes en éste primer Grupo. Sólo podemos suponer que las cepas 23 y 33, que se encontraron en el medio hospitalario con los mismos fenotipos (Biotipo o Biovar, Susceptibilidad a Antimicrobianos, Susceptibilidad a Metales Pesados, Patrón Klebocínico y Patrón de Material Genético Extracromosomal) pudieron haber sido consecuencia de este brote de infección nosocomial. La determinación de los pesos moleculares de los diferentes fragmentos de ADN fue relativa, ya que al utilizar sólo dos plásmidos de referencia, necesariamente nos dió una línea recta en la que se

extrapoló el cálculo de los pesos moleculares.

Teniendo en cuenta las características de: estandarización, reproducibilidad, sensibilidad, estabilidad, bajo costo, aplicación a la mayoría de los microorganismos y correlación con la información epidemiológica, que debe reunir un método de tipificación accesible a la mayoría de los laboratorios clínicos; podemos sugerir que la susceptibilidad a diferentes Antimicrobianos y la determinación del Biotipo fue suficiente en este caso para caracterizar a la mayor parte de las cepas causantes del brote de infección nosocomial.

Conviene mencionar que los resultados de este trabajo no se pueden extrapolar para el estudio de otras infecciones hospitalarias, ya que la decisión sobre el tipo de marcadores microbiológicos a utilizar dependerá de:

- 1) El tipo de infección,
- 2) Tipo de pacientes que son colonizados,
- 3) Microorganismo que se encuentre como agente etiológico, y
- 4) Características del medio hospitalario.

Para cumplir con el segundo objetivo: determinar el número mínimo de pruebas bioquímicas para la identificación de la Tribu *Klebsiellae* utilizando la Teoría de Descriptores Mínimos, proponemos una metodología para lograr la ordenación de las pruebas bioquímicas en una escala relativa de importancia.

Definimos el valor "peso informativo" p_i ; cuando

$p = 1$ el o los sustratos bioquímicos son indispensables para una identificación bioquímica adecuada; por el contrario, cuando después de la aplicación de la prueba de Descriptores Mínimos (164), $p = 0$, estos sustratos son prescindibles y se pueden eliminar sin temor a llegar a clasificar incorrectamente a una bacteria.

Es posible contar con una teoría matemática de apoyo que permita tratar adecuadamente problemas de clasificación entendiéndose por ella "el proceso mediante el cual se puede determinar, sobre la base de la sucesión de características de un objeto dado, cuál de estas son útiles para la clasificación y en base a ello definir la pertenencia del objeto a una determinada clase o familia" (94-96, 97-99, 104, 109, 164). El reconocimiento de patrones es un proceso mediante el cual se puede determinar la importancia de cada uno de los rasgos que describe un cierto objeto o fenómeno con respecto a su caracterización como tal y en particular, la pertenencia del mismo a una clase dada.

De acuerdo a nuestros resultados sugerimos utilizar, catorce pruebas bioquímicas, que corresponden a 6 tubos (que habitualmente se utilizan en los laboratorios clínicos). En éstos se tienen los siguientes sustratos, en los que se determinan los siguientes caracteres bioquímicos:

Prueba determinada.

- M I O:
- 1) Movilidad
 - 2) Producción de indol

3) Descarboxilación de ornitina

T S I:

4) Fermentación de glucosa

5) Producción de gas de glucosa

6) Fermentación oxidativa de lactosa

7) Producción de ácido sulfhídrico

M R / V P:

8) Rojo de metilo.- Capacidad de un microorganismo para producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de glucosa.

9) Voges-Proskauer.- Determina la capacidad de algunos microorganismos de tener como producto final neutro (acetilmetilcarbinol) a partir de la fermentación de glucosa.

Citrato:

10) Citrato de Simmons.- Utilización del citrato como única fuente de carbono.

Urea:

11) Urea de Christensen.- Presencia o ausencia de uréasa produciendo dos moléculas de amoníaco.

L I A:

12) Descarboxilación de lisina

13) Desaminación de lisina

14) Producción de ácido sulfhídrico

Con la aplicación de la Teoría de Descriptores Mínimos (164) con un sistema computarizado, pudimos identificar de acuerdo a lo propuesto por Brenner (104) 653 cepas de *Enterobacterias* y clasificar 543 cepas pertenecientes a la Tribu *Klebsiellae*.

REFERENCIAS

1. McGovan, J.E., Barnes, M.W., Finland, M. Bacteremia at Boston City Hospital : Occurrence and mortality during 12 selected years (1935-1972) with special reference to hospital-acquired cases. *J. Infec. Dis.* 132 : 316-335, 1975.
2. Dixon, R.E. Investigation of endemic and epidemic infections. En: Benneth, J.V., Brachman, P.S. *Hospital infections*. Little, Brown and Company (Boston, USA.). 1979, pp. 63-80.
3. Bennett, J.V. Human infection : economic implications and prevention. *Ann. Intern. Med.* 89: 761-763, 1978.
4. Dixon, R.E. Effect of infection in hospital care. *Ann. Intern. Med.* 89: 749-753, 1978.
5. Maki, D.G. Control of colonization and transmissions of pathogenic bacteria in the hospital. *Ann. Intern. Med.* 89: 777-778, 1978.
6. Isenberg, H.D., Smith, J.K. The epidemiology and control of nosocomial and opportunistic infections. En: Balows, G., Hausler, Jr. *Diagnostic procedures for bacterial mycotic and parasitic infections*. American Public Health Assoc. 1981. pp. 113-139.
7. Hughes, J. M., Culver, J.W., Whithe, W. R., et. al. Nosocomial infections surveillance, 1980-1982 morbid-mortality. *Weekly Rep. CDC Surveillance Summaries.* 32. (Suppl. 4): 155-169S, 1983.
8. Hughes, J.M., Jarvis, W.R. Epidemiology of nosocomial infections. En : Lennette E.H., Balows, A., Hausler, W.J. *Manual Clinical Microbiology*. A.S.M. (Washington, USA.). 1985. pp. 99-104.
9. Haley, R.W., Culver, D.H., White, J.W. The nationwide nosocomial infection rate. *J. Epidemiology.* 121: 159-179, 1985.
10. Padilla, B.G., Guiscáfre, H.G., Martínez, G.M.C., et. al. Epidemiología de las infecciones nosocomiales en un hospital pediátrico. *Salud Pública de México.* 28: 599-610, 1986.
11. Finland, M. Changing ecology of bacterial infections as related to antibacterial therapy. *J. Infec. Dis.* 122: 419-431, 1970.
12. Adler, J.L., Shulman, J.A., Terry, P.M., et. al. Nosocomial colonization with kanamycin resistant *K. pneumoniae*, types 2 and 11 in premature nursery. *J. of Pediatrics.* 77: 376-385, 1970.
13. Eisenach, K.D., Riber, R.M., Eitzman, D.U., et. al. Nosocomial infections due to kanamycin-resistant R-Factors carrying enteric organisms in an intensive care nursery. *Pediatrics.* 50: 395-402, 1972.
14. Hable, K.A., Matsen, J.M. *Klebsiella* type 33. Septic-emic and infant intensive care unit. *J. of Pediatrics.* 80: 920-924, 1972.

15. Matsen, J.M. The sources of hospital infections. *Medicine*. 52: 271-277, 1973.
16. Davis, T.J., Matsen, J.M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relations to association with hospital and environmental. *J. Infect. Dis.* 130: 402-405, 1974.
17. Hill, H.R., Hunt, C.E., Matsen, J.M. Nosocomial colonization with *Klebsiella* type 26 in neonatal intensive care unit. Associate with an outbreak of sepsis meningitis and necrotizing enterocolitis. *J. of Pediatrics* 85: 415-419, 1974.
18. Schaberg, D.R., Alford, R.H., Anderson, R., et. al. An outbreak of nosocomial infections due to multiply resistant *S. marcescens*: evidence of interhospital spread. *J. Infect. Dis.* 134: 181-188, 1976.
19. Balows, A. An overview of recent experiences with plasmid-mediated antibiotic resistance or induced virulence in bacterial diseases. *J. Antimicrobial Chemotherapy*. (Suppl.) 3-6, 1977.
20. Curie, K., Speller, D.C.E., Simpson, R.A., et. al. An hospital epidemic caused by a gentamicin-resistant *K. aerogenes*. *J. Hyg. Camb.* 80: 115-123, 1977.
21. Stamm, W.E., Martin, S.M., Benneth, J.V. Epidemiology of nosocomial infections due to gram negative bacilli: Aspects relevant to the development and use of vaccines. *J. Infect. Dis. (Suppl)* 151-160, 1977.
22. Weinstein, R.A., Stamm, W.E. Pseudoepidemics in hospital. *Lancet*. ii: 862-864, 1977.
23. Casewell, M.W., Phillips, L. Epidemiological patterns of *Klebsiella* colonization and infection an intensive care ward. *J. Hyg. Camb.* 80: 295-300, 1978.
24. Eidelman, A., Reynolds, J. Gentamicin-resistant *Klebsiella* colonization in a neonatal intensive care unit. *Am. J. Dis. Child.* 132: 421-422, 1978.
25. Goldman, D.A., Lecleair, B.S., Macone, B.S. Bacterial colonization of neonates admitted to an intensive care environment. *J. of Pediatrics*. 93: 288-293, 1978.
26. Schaberg, D.R., Weinstein, R.A., Stamm, W.E. Epidemic of nosocomial urinary tract infections caused by multiple resistant gram negative bacilli. *Epidemiology and Control*. *J. Infect. Dis.* 133: 363-366, 1971.
27. McGowan, J.E., Terry, P.M., Huang, T.S. et. al. Nosocomial infections with gentamicin-resistant *S. aureus*. Plasmid analysis as an epidemiology tool. *J. Infect. Dis.* 140: 864-872, 1979.
28. Sadowski, P.L., Peterson, B.C., Gerdin, D.N. et. al. Physical characterization of ten R plasmids obtained from outbreak of nosocomial *K. pneumoniae* infections. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 15: 616-624, 1979.
29. Couterney, M.A., Miller, J.R., Summersgell, J., Melo, J. et. al. R-Factor responsible for an outbreak of

- multiply antibiotic resistant *K. pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemother. 18: 926-929, 1980.
30. Manorama, D.R., Bhujwala, A., Shiriniwas, M.S. *K. pneumoniae* as the possible cause of an outbreak of diarrhea in a neonatal special care unit. Indian. J. Med. Res. 71: 359-362, 1980.
 31. Markowitz, S.M. Veazey, J.M., Macrina, F.L. et. al. Sequential outbreaks of infections due *K.pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. Implication of a conjugative R plasmid. J. Infect. Dis. 142: 106-112, 1980.
 32. Tompkins, L.S., Florde, J.J., Falhow, S. Molecular analysis of R-factors from multiresistant nosocomial isolates. J. Infect. Dis. 141: 625-636, 1980.
 33. Deb, M., Shiriniwas, M.S., Singh, M. *K. pneumoniae* as the possible cause of an outbreak of diarrhoeae in a neonatal special care unit. Indian. J. Med. Res. 71: 359-362, 1980.
 34. Aber, R.C., Mackel, D.C. Epidemiological typing of nosocomial microorganisms. Amer. J. Med. 70: 899-905, 1981.
 35. Tantulavanich, S., Olexy, V.M., Prasa, T.R. et. al. An R plasmid of broad host-range, coding for resistance to nine antimicrobial agents endemic in gram negative nosocomial isolates. J. Med. Microbiol. 14: 371-380, 1981.
 36. Eickhoff, T.C. Nosocomial infections. N. Engl. J. Med. 306: 1545-1546, 1982.
 37. Shlaes, D.M., Vartian, C., Currie, C.A. Variability in DNA sequence of closely related nosocomial gentamicin-resistant plasmids. J. Infect. Dis. 148: 1013-1018, 1983.
 38. Markowitz, S.M., Smith, S.M., Williams, D.S. Retrospective analysis of plasmid patterns in study of burn unit outbreaks of infections due to *E. cloacae*. J. Infect. Dis. 148: 18-23, 1983.
 39. Okuda, T., Endo, N., Osada, Y. et. al. Outbreak of nosocomial urinary tract infections caused by *S. marsecens*. J. Clin. Microbiol. 20: 691-695, 1984.
 40. Svenningsen, N.W., Bekassy, A.N., Christensen, P. et. al. Nosocomial *K. pneumoniae* infection: clinical and hygienic measures in a neonatal intensive care unit. Scand. L. Infect. Dis. 16: 29-35, 1984.
 41. Wenzel, R.P. Infection control priorities in critical care medicine: Device-associate intravascular infections. En : Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. Manual Clinical Microbiology. A.M.S. (Washington, USA). 1984. pp. 123-128.
 42. Smith, D.H. R Factors mediated resistance to mercury, nickel and cobalt. Science. 156: 1114-1116, 1967.
 43. Elek, S.D. Higney, L. Resistogram typing a new epidemiological tool: application to *E. coli*. J. Med. Microbiol. 3: 103-110, 1969.

44. Elek, S.D. Davies, J.R., Miles, R. Resistotyping of *S. sonnei*. J. Med. Microbiol. 6: 329-345, 1973.
45. Cooke, M.D. Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacterial isolated from sewage, seawater, and marine shellfish. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 9: 879-884, 1976.
46. Nakara, H., Ishikawa, T., Sarai, Y. et. al. Linkage of mercury, cadmium and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Ps. aeruginosa*. App. Env. Microbiol. 33: 975-976, 1977.
47. Gyles, C.L., Falchadhuri, S., Maas, W.K. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. Science. 14: 198-199, 1977.
48. Makara, H., Ishikawa, T., Miysuhashi, S. et. al. Frequency of heavy-metal resistance in bacteria from in patients in Japan. Nature. 266: 165-167, 1977.
49. Rennie, R.P., Nord, C.E., Sjöberg, L. et. al. Comparison of bacteriophage typing and biotyping as aids in epidemiological surveillance of *Klebsiella* infections. J. Clin. Microbiol. 8: 638-642, 1978.
50. Smith, H.W., Arsenic resistance in *Enterobacteria*: its transmission by conjugation and phage. J. Gen. Microbiol. 109: 49-56, 1978.
51. Kelch, W.J., Lee, J.S. Antibiotic resistance patterns of gram negative bacteria isolated from environmental sources. App. Env. Microbiol. 36: 450-456, 1978.
52. Marques, A.M., Congregado, F., Simon, P. Antibiotic and heavy metal resistance of *Ps. aeruginosa* from soils. J. Appl. Bacteriol. 47: 347-350, 1979.
53. O'Brien, T.F., Ross, D.G., Guzmán, M.A. et. al. Dissemination of an antibiotic resistance plasmid in hospital patient flora. Antimicrobial Agents Chemother. 17: 537-543, 1980.
54. Porter, F.D., Silver, S., Ong, C. et. al. Selection for mercurial resistance in hospital settings. Antimicrobial Agents and Chemother. 22: 852-858, 1982.
55. Tetaz, T. J., Luke, R. K. J. Plasmid-controlled resistance to copper in *E. coli*. J. Bacteriol. 154: 1263-1268, 1983.
56. Knothe, H.P., Shah, S., Mitsuhashi, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *S. marcescens*. Infection. 35: 315-317, 1983.
57. Sell, T.L., Schaberg, D.R., Fekety, F.R. Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for *C. difficile*. J. Clin. Microbiol. 17: 1148-1152, 1983.
58. Holmberg, S.D., Wachsmuth, I.K., Hickman-Brenner, et. al. Comparison of plasmid profile analysis phage typing antimicrobial susceptibility testing in characterizing *S. typhimurium* isolates. J. Clin Microbiol. 19: 100-104, 1984.
59. Atkinson, B. A., Lorian, V. Antimicrobial agents

- susceptibility patterns of bacteria in hospital from 1971-1982. *J. Clin. Microbiol.* 20: 791-796, 1984.
60. Harnett, N.M., Gyles, C.L. Resistance to drug and heavy metals. Colicin production and biochemical of selected bovine and porcine *E. coli* strains. *App. Env. Microbiol.* 48: 930-935, 1984.
 61. Reeves, P. The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 29: 24-45, 1985.
 62. Bradley, D.E. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31: 230-314, 1967.
 63. Nogel de Zwaig, R. Mode of action of colicin A. *J. Bacteriol.* 99: 913-914, 1969.
 64. Farmer, J.J. III. Mnemotechnic for reporting bacteriocin and bacteriophage types. *Lancet* 2: 96, 1970.
 65. Graaf, F.K., Planta, R.J., Stoullhaner, A.H. Effect of bacteriocins produced by *E. cloacae* on protein biosynthesis. *B.B.A.* 240: 122-136, 1971.
 66. Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W. Methods for study bacteriocins. En: Norris, J.R., Ribbons, D.W. *Methods in Microbiology.* Academic Press (London) 7A: 316-422, 1972.
 67. Hettiaratchy, I.G.T., Cooke, E.M., Shooter, R.A. Colicin production as an epidemiological marker of *E. coli*. *J. Med. Microbiol.* 6: 1-11, 1973.
 68. Guterman, S.K. Colicin B; Mode of action and inhibition by enterochelin. *J. Bacteriol.* 114: 1217-1224, 1973.
 69. Lamanna, C., Mallette, M.F., Zimmerman, L. **Basic bacteriology.** Its etiological and chemical background. William & Wilkins, Co. (Baltimore, USA) 1973. pp. 641.
 70. Helgerson, S.L., Cramer, W.A., Harris, J.M. et al. Evidence for a microviscosity increase in the *E. coli* cell envelope caused by colicin E1. *Biochemistry* 13: 3057-3061, 1974.
 71. Sabet, S.F. Effect of colicin K on membrane-associated, energy linked function. *J. Bacteriol* 126: 601-608, 1976.
 72. Buffenmyer C.L., Rycheck, R.R., Yes, B.R. Bacteriocin (klebocin) sensitivity typing of *Klebsiella*. *J. Clin. Microbiol.* 4: 239-244, 1976.
 73. Nomura, M. Colicins and related bacteriocins. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 257-281, 1977.
 74. Ayliffe, G.A. The application of typing methods to nosocomial infections. En: Bergan, T., Norris, J.N. *Methods in Microbiology.* Academic Press (San Francisco, USA) 1978, Vol. 10. pp. 72-101.
 75. Gaastra, W., Oudega, B., De Graaf, F.K. The use of mutants in the study of structure-function relationships in cloacin DF13. *B.B.A.* 540: 301-312, 1978.
 76. Heddell, G.W., Mitchell, A.A.B. Evaluation of applications of an improved bacteriocin typing method for *K. aerogenes*. *J. Clin. Path.* 31: 16-21, 1978.

77. Slopeck, S. Phage typing of *Klebsiella*. En : Bergan, T., Norris, J.R. Methods in Microbiology. Academic Press (San Francisco, USA) 1978, Vol. 11. pp. 193-292.
78. Mock, M. Schwartz, M. Mechanism of colicin E3 production in strains harboring wild-type or mutant plasmids. J. Bacteriol. 136: 700-707, 1978.
79. Corona-Brambila, G.O., Detección y aislamiento de cepas productoras de bacteriocinas. Obtención de un patrón útil para la tipificación bacteriana y su correlación con el medio hospitalario. Tesis de Licenciatura. U. de G., México. 1978.
80. Edmonson, A.S., Cooke, M. The development and bacteriocin typing methods for *Klebsiella*. J. Hyg. Camb. 82: 207-223, 1979.
81. Jajes, K.S., Model, P. Mechanism of export of colicin E1 and colicin E3. J. Bacteriol. 138: 770-780, 1979.
82. Chugh, T.D., Walla, U.S. Bactericin (klebocin) sensitivity typing as an epidemiological marker of *K. pneumoniae*. Indian J. Med. Res. 71: 195-202, 1980.
83. Chenge, A.B. Tipificación de cepas de la tribu *Klebsiellae* por un método de sensibilidad a las klebocinas. Tesis de licenciatura. E.N.C.B. México. 1980.
84. Varenne, S., Cavard, D., Lazdunski, C. Biosynthesis and export of colicin A in *C. freundii* CA31. Eur. J. Biochem. 116: 607-620, 1981.
85. Arora, D.R., Chug, T.D. Klebocin types of *K. pneumoniae* isolated normal and diarrhoeal stool. Indian J. Med. Res. 73: 856-859, 1981.
86. Bauernfeind, A., Perlmüller, C., Schneider, R. Bacteriocins as tools in analysis of nosocomial *K. pneumoniae* infections. J. Clin. Microbiol. 14: 15-19, 1978.
87. Oudega, B., Stegehuis, F., Van Tiel-Menkveld, G.J. et al. Protein H encoded by plasmid CloDF13 is involved in excretion of cloacin DF13. J. Bacteriol. 150: 1115-1121. 1982.
88. Mock, M., Miyada, C.G., Gunssalus, R.P. Nucleotide sequence for the catalytic domain of cloacin E3 and its immunity protein. Evidence for a third gene overlapping colicin. Nucleic Acids Research. 11: 3547-3557, 1983.
89. Sabherwal, U., Chandra, R., Santosh, A. Evaluation of two new producer strains in differentiating *K. pneumoniae*. Indian J. Med. Res. 78: 193-195, 1983.
90. Oudega, B., Stegehuis, F., De Graaf, F.K. Effect of glucose fermentation on the functioning of the protein H in the excretion of cloacin DF13 by *E. coli*. FEMS Microbiol. Lett. 21: 125-131, 1984.
91. Oudega, B.M., Ykema, A., Stegehuis, F. et al. Detection and subcellular localization of nature protein H; involved in excretion of cloacin DF13. FEMS Microbiol. Lett. 22: 101-108, 1984.
92. Bauerfeind, A., Pertermüller, C. Typing of

- Enterobacter spp.* by bacteriocins susceptibility and use in epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 20: 70-73, 1984.
93. Oudega, B. Moii, F.R., De Graaf, F.K. Excretion of proteins by gram negative bacteria: export of bacteriocins and fimbrial proteins by *E. coli*. A. van Leeuwenhoek. 50: 569-584, 1984.
 94. Kauffman, F., Zentralbl, F., Bakt, I. Orig. 165: 344, 1956.
 95. Kauffman, F. *Int. Bull. Bacteriol. Nomen. Tax.* 13: 187, 1963.
 96. Kauffman, F. **The bacteriology of *Enterobacteriaceae***. Copenhagen: Munksgaard. 1966.
 97. Ewing, W.H., Davis, B.R. Biochemical characterization of *C. freundii* and *C. diversus*. **Center for Disease Control**. Atlanta, Go. (USA) 1971.
 98. Edwards, P.R., Ewing, W.H. **Tribu *Klebsiellae*. Identification of *Enterobacteriaceae***. 3a. Ed. Burgess. Publishing Co. (Minneapolis, USA). 1972. pp. 290-300.
 99. Ewing, W.H. Differentiation of *Enterobacteriaceae* by biochemical reactions. Revised CDC Pub. No. 74 (USA) 1973.
 100. Crosa, J.H., Brenner, D.J. Polynucleotide sequence divergence divergence in the genus *Citrobacter*. *J. Gen. Microbiol.* 83: 272-282, 1974.
 101. Jain, K., Radsak, D., Mannheim, W. Differentiation of the *Oxytocum* group from *Klebsiella* by deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 79-82, 1974.
 102. Steirgerwah, A.G., Fanning, G.R., Brenner, D.J. DNA relatedness among species of *Enterobacter* and *Serratia*. *Can. J. Microbiol.* 22: 121-137, 1974.
 103. Brenner, D.J., Fanning, G.R. Characterization of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* by deoxyribonucleic acid hybridization and by biochemical reaction. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26: 180-194, 1976.
 104. Brenner, D.J., Farmer, J.J., Hickman, F.W. Taxonomic and nomenclature changes in *Enterobacteriaceae*. **Center Disease Control**. Atlanta, Go. (USA) 1977.
 105. Cowan, S.T. Family *Enterobacteriaceae*. En: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9th. Ed. Williams & Wilkins, Co. (Baltimore, USA), 1986. pp. 290-340.
 106. Finegold, S.M., Scott, E.G. *Enterobacteriaceae*. En: **Bailey and Scott's diagnostic microbiology**, 5th. Ed. C.V. Mosby, C. (St. Louis, USA) 1978; 70-74, 148, 179.
 107. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N. et. al. **Microbiology**. 3th. Ed. Harper. International Edition 1980. pp. 646-665.
 108. Farmer, J.J., Wells, J.G., Terranova, M.C. *Enterobacteriaceae*. En: Balows, G., Hausler, J.R. **Diagnostic procedures for bacterial mycotic and parasitic infections**. Amer. Pub. Hlth. Assoc. 1981. pp. 341-342.

109. Farmer, J.J., Davis, B.R., Hickman-Brenner et. al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21: 46-76, 1985.
110. Brenner, F.W., Huntley-Carter, G.P., Fanning, R.G. et. al. *K. trabulsi*, a new genus and species of *Enterobacteriaceae* formerly know as enteric group 45. *J. Clin. Microbiol.* 21: 39-42, 1985.
111. Farmer, J.J., Fanning, G.R., Davis, R. et. al. *E. fergusonii* and *E. taylorae*. Two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21: 77-81, 1985.
112. Davis, R.W., Simon, M., Davison, N. Electron microscope heteroduplex methods for mapping regions of base sequence homology in nucleic acids. **Contributions No. 3943 from the gates**, Crelling and Church Laboratories. California Institute of Technology. 1969. pp. 413-428.
113. Cohen, S.N. Transposable genetic elements and plasmid evolution. *Nature.* 28: 731-737, 1976.
114. Davies, J., Courvalin, P., Berg, D., Thoughts on the origin of resistance plasmids. *J. Antimicrobial. Chemother. (Suppl):* 7-17, 1977.
115. Datta, N. Classification of plasmids as an aid to understanding their epidemiology and evolution. *J. Antimicrobial. Chemother. (Suppl):* 18-23, 1977.
116. Chabbert, Y.A., Roussel, A. Taxonomic and epidemiology of R plasmids as molecular species. *J. Antimicrobial. Chemother. (Suppl):* 25-33, 1977.
117. O'Brien, T.F., Norton, R.A., Kent, R.L. et. al. International surveillance of prevalence of antibiotic resistance. *J. Antimicrobial. Chemother. (Suppl):* 59-66, 1977.
118. Gómez-Lus, R., Rubio-Calvo, M.C., Larrad-Mur, L. Aminoglycoside inactivating enzymes produced by R plasmids of *E. coli*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *P. vulgaris*, *P. stuartii*, *S. marcescens*. *J. Antimicrobial. Chemother. (Suppl):* 67-76, 1977.
119. Grassi, G.G. Clinical aspects of the relationship between antibiotic usage resistance. *J. Antimicrobial. Chemother. (Suppl):* 77-84, 1977.
120. Datta, N. Hughes, V.M., Nuget, M.E. et. al. Plasmids an their stability and mutability in bacteria isolated during an outbreak hospital infection. *Plasmids.* 2: 182-196, 1979.
121. Datta, N., Nugent, M., Richards, H. Transposons encoding trimethoprim or gentamicin resistance in medical important bacteria. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 45: 45-52, 1980.
122. Bryan, L.E. Mechanisms of plasmid mediated drug resistance. En : Stuttard, C., Kenneth, R. **Plasmids and transposons.** Academic Press (New York, USA) 1980. pp. 57-81.

123. Schaberg, D.R., Tompkins, L.S., Rubens, C. et. al. R-plasmid and nosocomial infection. En: Stuttard, C., Kenneth, R. **Plasmids and transposons**. Academic Press (New York, USA) 1980. pp. 44-74.
124. Rubens, C.E., Farrar, E.W., Mc Gie, Z.A. et. al. Evolution of a plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents during a prolonged epidemic of nosocomial infections. *J. Infect. Dis.* **143**: 170-181, 1981.
125. Schaberg, D.R., Tompkins, L.S., Falkow, S. Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **13**: 1105-1108, 1981.
126. Olson, B., Weinstein, R.A., Nathan, C. et. al. Broad spectrum *B*-lactam resistance in *Enterobacter* emergence during treatment and mechanisms of resistance. *J. Antimicrobial. Chemother.* **11**: 299-310, 1983.
127. Groot'Obbink, D.J., George, A.M., Coombe, R.G. Aminoglycoside-modifying enzymes associated with hospital isolates of gram-negative rods. *J. Antimicrobial. Chemother.* **11**: 525-533, 1983.
128. Farrar, E. Molecular analysis of plasmids in epidemiology investigation. *J. Infect. Dis.* **148**: 1-6, 1983.
129. Brunner, F., Margadant, A. Peduzzi, R. The plasmid pattern as an epidemiologic tool for *S. typhimurium* epidemic comparison with the lysotype. *J. Infect. Dis.* **148**: 7-11, 1983.
130. Riley, L.W., Diferdinando, J.T., De Melfi, T.M. et. al. Evaluation of isolated cases of salmonellosis by plasmid profile analysis: introduction and transmission of bacterial clone by precooked roast beef. *J. Infect. Dis.* **148**: 12-17, 1983.
131. Foster, T.J. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol. Reviews.* **47**: 361-409, 1983.
132. Nolte, F.S., Conlin, C.A., Roisin, A.J. et. al. Plasmids as epidemiological markers in nosocomial Legionnaires' diseases. *J. Infect. Dis.* **149**: 251-279, 1984.
133. Platt, R.J., Sommerville, J.S., Gribbens, J. Sequential acquisition of R-plasmids in vivo by *S. typhimurium*. *J. Antimicrobial. Chemother.* **13**: 65-69, 1986.
134. McGowan, J.E. Role of the microbiology laboratory in prevention and control of nosocomial infections. En: **Manual Clinical Microbiology**. A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 110-122.
135. Cry, S.J., Morimer, P.M., Mansfield, V. et. al. Seroepidemiology of *Klebsiella* bacteremic isolates and implications for vaccine development. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 687-690, 1986.
136. Sifuentes, O.J., Ruiz-Palacios, M.G., Groschel, D.H.M.

- Analysis of epidemiologic markers of *S. marcescens* isolates with special reference to the Grimont biotyping system. *J. Clin. Microbiol.* 23: 230-234, 1986.
137. Nakamura, M., Sato, S., Okya, T. et. al. Plasmid profile analysis in epidemiological studies of animal *S. typhimurium* infection in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 23: 360-365, 1986.
 138. Parisi, J.T., Lapson, E.C., Hoover, D.H. et. al. Comparison of epidemiologic markers for *S. epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 24: 56-60, 1986.
 139. Ballow, W.R., Cross, A.S., Williams, D.Y. et. al. Colonization of newly arrived house staff by virulent *Staphylococcus* phage types endemic to a hospital environment. *J. Clin. Microbiol.* 23: 1030-1033, 1986.
 140. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Roberts, N.C. et. al. Molecular epidemiology of Non-O1 *V. minicus* in the USA gulf coast region. *J. Clin. Microbiol.* 23: 652-654, 1986.
 141. Morrison, A.J., Hoffman, K.K., Wenzel, R.P. Associated mortality and clinical characteristics of nosocomial *P. maltophilia* in a University Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 24: 52-55, 1986.
 142. Haley, R.W., Culvert, H.D., White, J.W. et. al. The efficacy of infection surveillance and control programs in preventing nosocomial infection in the USA Hospital. *Amer. J. Epidemiology* 121: 182-205, 1985.
 143. Haley, R.W., Culvert, H.D., Morgan, W.M. et. al. Increased recognition of infectious diseases in USA Hospital through increased use of diagnostic tests, 1970-1976. *Amer. J. Epidemiology.* 121: 168-181, 1985.
 144. Haley, R.W., Culvert, H.D., Morgan, W.M. et. al. Identifying patients at high risk of surgical wound infection. *Amer. J. Epidemiology.* 121: 206-215, 1985.
 145. Garner, J.S., Emori, T.G. Nosocomial infection surveillance and control programs. En: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 105-109.
 146. Davies, P.A., Please wash your hands. *Arch. Dis. Child.* 57: 647-648, 1982.
 147. Craven, D.E., Connolly, M.G., Lightenberg, D.A. et. al. Contamination of mechanical ventilators with tubing changes every 24 or 48 hours. *N. Engl. J. Med.* 306: 1505-1510, 1985.
 148. Favero, M.S. Sterilization, disinfection and antiseptics in the hospital. En: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.M.S. (Washington, USA) 1985. pp. 129-137.
 149. Mallecka-Griggs, B. Microbiological assessment of 24 and 48 hours changes and management of semiclosed circuits from ventilators in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 23: 322-328, 1986.
 150. Larson, E.L., McGlinley, K.J., Foglia, A.R. et. al. Composition antimicrobial resistance of skin flora in

ESTA TESIS
NO DEBE
SALIR DE LA
BIBLIOTECA

- hospitalized and healthy adults. *J. Clin. Microbiol.* 23: 604-608, 1986.
151. Sheth, N.K., Bartell, C.A., Roth, D.A. In vitro study of bacterial growth in continuous ambulatory peritoneal dialysis fluids. *J. Clin. Microbiol.* 23: 1096-1098, 1986.
 152. MacDonalds, W.A., Watts, J., Bowmer, M.I. Factors affecting *S. epidermidis* growth in peritoneal dialysis solutions. *J. Clin. Microbiol.* 24: 104-107, 1986.
 153. March, B.S., Ratman, S. Sorbitol-MacConckey medium for detection of *E. coli* O157 : H7 associated with hemorrhagic colitis. *J. Clin. Microbiol.* 23: 869-872, 1986.
 154. Pai, C.H., Gordon, R.H.V., Sims, L.E. et. al. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *E. coli* O157:H7. Clinical epidemiologic and bacteriologic features. *Ann. Intern. Med.* 101: 738-742, 1984.
 155. Mac Fadin, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Williams & Wilkins Co. (Baltimore USA) 1976.
 156. Brenner, D.J. Taxonomic, classification and nomenclature of bacteria. En : Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 1-7.
 157. Richardson, J.H., Barkley, W.E. Biological safety in the clinical laboratory. En : Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 129-138.
 158. Kelly, M.T., Brenner, D.J., Farmer, J.J. III. *Enterobacteriaceae.* En: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 263-279.
 159. Thosberry, C., Sherris, J.C. Laboratory tests in chemotherapy general considerations. En : Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 959-968.
 160. Washington, J.A. II. Susceptibility tests: agar dilution. En : Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J. **Manual Clinical Microbiology.** A.S.M. (Washington, USA) 1985. pp. 969-971.
 161. Nataro, J.P., Scatelsky, I.C.A., Levine, M.M. et. al. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *E. coli*. *Infect. Imm.* 48: 378-383, 1985.
 162. Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H. et. al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *E. coli* is depended on a plasmid encoding and enteroadhesives factors. *J. Infect. Dis.* 152: 550-559, 1985.
 163. Woloj, M., Tolmasky, M.E., Roberts, M.C. et. al. Plasmid-encoded amikacin resistance in multi-resistant strains of *K. pneumoniae* isolated from neonates with meningitis. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 29:

315-319. 1986.

164. Ruiz, S.V., Soto, V. Una característica del concepto de test típico en términos de un conjunto de columnas. *Revista de Ciencias Matemáticas*. 1979.
165. Feinstein, A.R. *Clinical epidemiology*. Saunders W.B. Co. (Philadelphia, USA) 1985. pp. 184-186.
166. Maniatis, T.E., Fritsch, E., Sambrook, J. *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. (New York, USA) 1982.