



64
Dej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

" IMPORTANCIA DEL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN
DE S. MARCESCENS EN UN BROTE DE INFECCIÓN
INTRAHOSPITALARIO "

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
Q. F. B. ROSALIA GUEVARA LEONEL

MEXICO, D. F., A 19 DE FEBRERO DE 1991



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.

INDICE.

INTRODUCCION

OBJETIVOS

HIPOTESIS

CAPITULO I.- GENERALIDADES.....	1
---------------------------------	---

CAPITULO II.- SERRATIA MARCESCENS

2.1.- Historia.....	7
2.2.- Taxonomía.....	9
2.3.- Hábitat	
2.3.1.- <u>Serratia</u> en aire, agua y suelo.....	11
2.3.2.- <u>Serratia</u> asociada con plantas.....	13
2.3.3.- <u>Serratia</u> asociada con insectos.....	14
2.3.4.- <u>Serratia</u> asociada con vertebrados.....	14
2.3.5.- <u>Serratia</u> en el hombre.....	14
2.4.- Importancia Clínica.....	15
2.5.- Patogenia.....	17
2.6.- Análisis Epidemiológico	
2.6.1.- Características microbiológicas	
2.6.1.a.- Características microscópicas.....	18
2.6.1.b.- Características macroscópicas.....	18

2.6.1.c.- Características bioquímicas.....	18
2.6.2.- Identificación de biotipos.....	19
2.6.3.- Serotipificación.....	21
2.6.4.- Tipificación de las bacteriocinas.....	22
2.6.5.- Zymogramas de Proteinasas.....	23
2.6.6.- Sensibilidad a antibióticos.....	24
2.6.7.- Tipificación por plásmidos.....	28
2.6.8.- Tipificación por fagos.....	30

CAPITULO III.- PARTE EXPERIMENTAL.

3.1.- Material.

3.1.1.- Material de uso común.....	31
3.1.2.- Equipo.....	32
3.1.3.- Material biológico.....	32
3.1.4.- Medios de cultivo y Reactivos.....	32

3.2.- Métodos

3.2.1.- Aislamiento.....	41
3.2.2.- Conservación de la cepa.....	42
3.2.3.- Tipificación de las cepas.	
3.2.3.a.- Determinación de biotipos.....	42
3.2.3.b.- Determinación de exoenzimas.....	43
3.2.3.c.- Sensibilidad a antibióticos.....	43
3.2.3.d.- Determinación del perfil de plásmidos...	44

CAPITULO IV.- RESULTADOS..... 47

CAPITULO V.- ANALISIS DE RESULTADOS..... 69

CAPITULO VI.- CONCLUSIONES..... 75

ANEXO 1..... 78

INTRODUCCION.

S. marcescens se consideró como un saprófito inofensivo hasta que Woodward y Clark en 1913 dieran a conocer su aislamiento a partir de pacientes con enfermedades pulmonares crónicas. Este microorganismo se ha identificado en cuadros de meningitis, septicemia, endocarditis bacteriana, artritis media crónica, enfermedades urinarias y respiratorias.

En 1,107 aislamientos de Serratia obtenidos de pacientes hospitalizados en Bordeux por un período de 8 años, se encontró -- S. liquefaciens y S. marinorubra en un porcentaje de 2 y 0.2% respectivamente, mientras que el 97.8% correspondía a S. marcescens. Además se observó que las cepas aisladas de este microorganismo eran no pigmentadas, llegando a la conclusión que los biotipos no pigmentados tienen mayor importancia nosocomial que los que sí lo son.

Estudios taxonómicos muestran que las cepas no pigmentadas de S. marcescens pertenecen a biotipos y serotipos diferentes a las pigmentadas.

Aunque todas las especies y biotipos de Serratia muestran resistencia natural a las cefalosporinas y polimixinas (incluyendo el colistín), la multirresistencia y la resistencia mediada por plásmidos R se encontró exclusivamente en biotipos no pig-

mentados.

Los estudios epidemiológicos de las enfermedades nosocomiales pueden basarse y realizarse por medio de sistemas de marcadores tales como: serotipificación, tipificación del fago, producción de bacteriocina y susceptibilidad, zimotipificación, antibiogramas, pruebas bioquímicas o con modelos de asimilación de la fuente de carbono.

La tipificación de las bacteriocinas, de los biotipos y de los fagos de S. marcescens, han mostrado buena correlación con los sistemas de serotipificación.

Algunos serotipos, biotipos, tipos de fagos y bacteriocinas -- específicos de S. marcescens se han asociado con brotes de enfermedades nosocomiales y con la multirresistencia.

Este estudio se ha realizado con el fin de encontrar un sistema simple de tipificación que ayude a un análisis epidemiológico de cepas de origen nosocomial.

OBJETIVOS:

Determinar si S. marcescens aislada de niños infectados pertenece a una sola cepa.

Comprobar qué método es más confiable para conocer la cepa o cepas que provocaron dicho brote.

Clasificar a las cepas de S. marcescens en biotipos y observar si pertenecen a un mismo tipo.

Obtener los modelos de exoenzimas capaces de diferenciar cada una de las cepas aisladas.

Realizar pruebas de sensibilidad con diferentes antibióticos y observar los marcadores de resistencia de cada cepa.

Obtener un patrón de plásmidos y correlacionarlo con los marcadores de resistencia.

HIPOTESIS:

La presencia de un brote infeccioso por Serratia marcescens - ocurrido en la Unidad de Terapia Intensiva y Neonatología simultáneamente, hace pensar en la posibilidad de que se encuentre dado por microorganismos pertenecientes a la misma cepa de ---- S. marcescens.

CAPITULO I.

GENERALIDADES.

Las enfermedades nosocomiales son aquéllas que se desarrollan dentro del hospital o son producidas por microorganismos adquiridos durante la hospitalización. Pueden involucrar no sólo pacientes, sino también individuos que hayan tenido algún contacto previo en el hospital, incluyendo miembros del mismo, voluntarios, visitantes, trabajadores, etc.

La mayoría de las enfermedades pueden ser notorias durante la hospitalización, sin embargo, el ataque puede ser después de -- que el paciente es dado de alta.

La incubación de la infección en el tiempo que el paciente es tá en admisión no es nosocomial; se adquirió fuera del hospi---tal.

Los microorganismos causantes pueden ser de dos fuentes:

- Endógena: cuando la infección fue por su propia flora.
- Exógena: cuando la infección es causada por microorganismos -- que no son de su flora.

El término prevención, implica aquellos eventos relacionados con la infección que podrían alterarla con el fin de prevenir---la, por ejemplo: el personal que lava sus manos después de que tiene contacto con algún paciente muy infectado, puesto que su lavado puede prevenir dicha infección.

Es a menudo imposible establecer el modo de infección de cada

paciente, ya que más de una forma puede contribuir al desarrollo de la misma y no todas se pueden prevenir.

Una infección puede ocurrir a pesar de todas las precauciones, por ejemplo, en el caso de un paciente inmunosuprimido debido a su flora normal, lo que no se puede evitar.

Para caracterizar a la enfermedad se debe tomar en cuenta el lugar, la persona y el tiempo, y se realiza de la siguiente manera (2):

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

Las enfermedades intrahospitalarias, en su mayoría, tienen carácter de tipo endémico y sólo en algunos casos resultan esporádicos. Sin embargo, han cobrado gran importancia, sobre todo en los últimos diez años, debido al notable incremento que han mostrado (9).

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

Esto ha conducido a la creación de comités de infecciones intrahospitalarias cuyas actividades no sólo deben abarcar hospitales de segundo y tercer nivel del Sector Salud, sino también,

instituciones privadas (5).

México tiene como característica fundamental estar constituido por una población joven en alto índice de crecimiento; un porcentaje elevado de mujeres se encuentran en etapa reproductiva. Otra característica, es el círculo vicioso entre la desnutrición e infección, problema que se inicia desde la etapa neonatal y que conduce a que una de las principales causas de morbilidad infantil sea infecciosa.

Es necesario conocer la frecuencia y tipo de microorganismos causantes de infecciones perinatales en nuestro país (1).

Durante 1987, en el Instituto Nacional de Pediatría registraron 337 casos de infecciones intrahospitalarias, las cuales, con un cálculo de costo diario de 80,000 pesos, representaron una erogación global de 26,960 pesos.

En 1986 se llevó a cabo en el INP en un período de seis meses, una encuesta para conocer el porcentaje de ingresos por causa infecciosa, y el resultado fué un 29.3% mensual. Esto indica que más de la cuarta parte de los ingresados presentan padecimientos potencialmente transmitibles al resto de la población interna, por lo que se deben de tomar en cuenta las medidas necesarias para evitar que otros pacientes contraigan infecciones durante su hospitalización (5).

Los objetivos de un comité de infecciones deben ser:

- a).- Conocer la incidencia de las enfermedades intrahospitalarias.
- b).- Conocer, con base en estudios epidemiológicos, los riesgos de que un paciente hospitalizado adquiriera una infección por los procedimientos diagnósticos que se empleen.
- c).- Reducir la frecuencia de las infecciones intrahospitalarias.

Las funciones del comité deben constituir en:

- 1).- Establecer políticas y mecanismos para observar y evaluar las enfermedades intrahospitalarias.
- 2).- Determinar los procedimientos apropiados para prevenir y controlar éstas (aislamientos, egresos, etc.).
- 3).- Marcar las políticas y procedimientos de manejo de pacientes no infectados, que requieren aislamiento por alteraciones de su sistema inmunológico.

El comité debe de estar integrado por un representante de la Dirección Médica y Administrativa, un infectólogo, una enfermera por cada 250 camas, un epidemiólogo y el Jefe de Bacteriología.

Se hará un reconocimiento muy cuidadoso de aquellos pacientes que tienen "alto riesgo" por sus condiciones inmunológicas. Se deberán revisar las hojas de reporte de los pacientes que acuden a la consulta externa después de su egreso, debido a que algunos episodios aparecen en ese período (varicela, hepatitis, etc.). El Departamento de Bacteriología debe de informar una vez por semana de todos los cultivos que sean positivos, para que la enfermera y el infectólogo, analicen caso por caso los candidatos a ser catalogados como infección intrahospitalaria.

Cada 15 días, el comité debe reunirse a fin de analizar los casos y posteriormente:

- a).- elaborar índice por caso y por servicio.
- b).- reconocer el problema, formular una hipótesis de la causa del mismo y dictar las medidas conducentes a la solución del problema.

Es responsabilidad del comité dar a conocer a todo el personal las acciones y medidas de control, para aunar esfuerzos que tiendan a evitar nuevos episodios de infecciones intrahospitalarias.

Las enfermedades intrahospitalarias más frecuentes que se pre

sentan desde hace varios años se deben principalmente a bacterias Gram negativas. Hoy en día, el papel que desempeña el laboratorio es principalmente el de crear métodos, como los que se han establecido en los últimos años, para la identificación de enfermedades intrahospitalarias.

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

Al identificar adecuadamente al microorganismo causal de la infección intrahospitalaria, es necesario además hacer un planteamiento global que incluya un buen manejo de los casos e identificación del origen. Es sabido que dentro de un hospital existen áreas de alto riesgo (salas de cirugía, hemodiálisis, unidad de cuidados intensivos, laboratorio, ginecología y obstetricia --entre otras--), que requieren una vigilancia más estrecha.

En ocasiones, la búsqueda de un microorganismo intrahospitalario incluye una estrategia que va, desde el estudio específico del agente, hasta un muestreo ambiental.

El enfoque que se da a los nuevos agentes, depende principalmente del estudio epidemiológico que el hospital considere necesario, así como la vigilancia de la aparición de brotes; por lo tanto, en las infecciones intrahospitalarias es necesario contar con estudios de clonados aunados al patrón de resistencia, además de perfiles de compatibilidad genética (26).

En estudios recientes se ha demostrado un aparente incremento en la incidencia de septicemia enterocócica. Sin embargo, las -- comparaciones directas en esas publicaciones son difíciles, ---

porque hay marcada diferencia en las condiciones en que se hizo dicho estudio. Están asociadas a la elevada mortalidad y se han encontrado con septicemia polimicrobiana y con enfermedades crónicas. El aumento de su incidencia se debe al abuso de los antibióticos como las cefalosporinas, particularmente en profilaxis quirúrgica. La epidemia hospitalaria debida a microorganismos multirresistentes se atribuye a la amplitud de la resistencia de la cepa, aunque algunas instituciones han observado un incremento en la frecuencia de enfermedades causadas por varias cepas multirresistentes de un sólo género o de varios géneros --- (2).

En 1986, en un hospital de Ohio (21) se observó que el 64% de los episodios de septicemia enterocócica se adquirieron dentro del hospital. Las fuentes más comunes son enfermedades del tracto urinario, heridas cutáneas y enfermedades intrabdominales. - Los enterococos son la quinta causa de septicemia nosocomial en Estados Unidos, siendo el 7.3% del total de casos.

Los microorganismos más comunes en este estudio fueron: S. epidermidis, S. aureus, E. aerogenes, K. pneumoniae, E. coli, - S. marcescens, C. albicans, Acinetobacter sp., P. aeruginosa, - Streptococcus β -hemolíticos (21).

En las recientes décadas, el significado de enfermedades oportunistas con resistencia a antibióticos se ha estudiado en Pseudomonas sp., E. coli y Serratia sp que son tres de los agentes comunes entre los bacilos Gram negativos. Los mecanismos moleculares se explicaron en base a las exotoxinas de E. coli y Pseudomonas sp pero no se han reportado exotoxinas específicas en la patogénesis de Serratia, comparables a las de los microorganismos anteriores (18).

CAPITULO II.

SERRATIA MARCESCENS.

Los aislamientos de la multirresistente Serratia sp a partir de varios sitios anatómicos, han sugerido que es un importante patógeno especialmente en pacientes inmunosuprimidos o en aquellos con tratamiento con esteroides (22).

Es uno de los agentes más comunes de enfermedades adquiridas en el hospital, siendo importante en oftalmología, urología y en enfermedades de pulmón. En base a esto, es importante conocer la epidemiología de dicha infección, para lo cual se ha hecho un análisis de sus marcadores epidemiológicos tales como serotipificación, tipificación del fago, producción de la bacteriocina y susceptibilidad, zymogramas, antibiogramas, tipificación bioquímica y modelos de asimilación de la fuente de carbono (24, 30).

2.1.- HISTORIA.

El género Serratia está compuesto por varias especies, algunas de las cuales producen un pigmento rojo insoluble en agua y no difusible, llamado prodigiosina, aunque ésta y pigmentos parecidos son producidos por Vibrio psychoerythreus, Pseudomonas manganovorubra, Alteromonas rubra, Streptomyces sp y Nocardia --

(Actinomadura) sp., en la antigüedad la aparición de puntos rojos se atribuía a S. marcescens (11).

Seis siglos A.C., Pitágoras notó la aparición de una coloración roja en los alimentos. El primer dato histórico encontrado fué en 332 A.C. en el sitio de Troya, donde unos soldados de Macedonia observaron gotas de sangre en el pan (36).

Gaughran encontró más de 35 reportes históricos de manchas de sangre en el pan Eucarístico. El primer incidente fué en 1169 - en Dinamarca. La hostia incubada en un ambiente húmedo en las Iglesias Medievales proporcionó un sustrato excelente para el desarrollo de S. marcescens.

En la provincia de Padua, Italia, en 1819, la aparición de puntos rojos en la polenta aterrorizó a la población supersticiosa (11).

Bartolomeo Bizio y Sette demostraron que la supuesta sangre es causada por un microorganismo que llamaron S. marcescens. Se rratia en honor de un físico italiano Sefarino Serrati, y marcescens que es derivado del latín decadencia, porque observaron que vira el pigmento de un rojo púrpura a un rosa pálido. Los experimentos de Bizio son de gran importancia porque fueron los primeros trabajos del uso de medios sólidos para el cultivo de bacterias cromogénicas (36).

El epíteto "prodigiosa" fué cambiado a otros nombres Micrococcus prodigosus, Bacillus prodigosus y Bacterium prodigosum. Desafortunadamente Ehrenberg no preservó la cepa y su identidad es incierta.

En 1884 Koch aisló una bacteria con pigmentación roja en el tracto digestivo de un mono de la India. La cepa (ATCC 4002) se preservó y se llamo Bacillus indicus. Durante 1903 se aislaron más de 76 especies por la producción del pigmento (rosa o rojo).

El primer reporte comparativo lo hizo Hefferan quien clasificó 24 cepas no mentadas en cuatro grupos: prodigiosus, lactis erythrogenes, mucoides roseus y rubricus. Solamente el grupo -- prodigiosus correspondió a la enterobacteria. El primer nombre genérico para reconocerla fué Erythrobacillus, dado por Fortineau en 1904. Y la especie se llamó Erythrobacillus nysepticus, preservada como ATCC 2075.

Buchanan revivió el nombre genérico Serratia, pero no se aceptó y el anterior fué el oficialmente recomendado. Publicaciones subsiguientes de Breed y la nomenclatura usada en el Bergey's Manual impusieron el uso del nombre de Serratia, que es ahora el universalmente aceptado designándose la cepa tipo S. marcescens (11).

A principios de este siglo, más de 73 de las especies descritas por Hefferan (1903), y las 23 especies de Serratia se enlistaron en la primera edición del Bergey's Manual (Bergey 1923). Este número decreció de 5 en la quinta edición, a una sola: S. marcescens. Esto siguió hasta la octava edición (3, 12).

En la última edición del Manual de Bergey's se enlistan seis especies S. marcescens, S. liquefaciens, S. plymuthica, S. rubida, S. odorifera, S. ficaria (3).

2.2.- TAXONOMIA.

La inclusión del Género Serratia en la tribu Klebsiellae no se aceptó. Estudios en relación a su composición de ADN, pruebas inmunológicas cruzadas entre enzimas isofuncionales y propiedades físicas, regulación y secuencia de aminoácidos de las enzimas, mostró que el género Serratia es un grupo muy diferente al formado por Escherichia, Shigella, Salmonella, Citrobacter, Klebsiella y Enterobacter (12).

La taxonomía del género Serratia era muy confusa, ya que se asociaron 42 especies con el nombre genérico. Desde Hefferen en 1903, varios taxonomistas han tratado de simplificarla, entre ellos Ewing, Davis y Reavis (1958), Ewing, Davis y Johnson (1962) y Martinec y Kocur (1960, 1961) quienes hicieron al género específico (13).

En un estudio taxonómico realizado en 1977 (13) se juntaron 156 cepas de Serratia y bacterias relacionadas como E. liquefaciens, E. cloacae, E. aerogenes, Erwinia carotovora, Erwinia chrysanthemi, E. herbicola y E. minipressuralis. Se estudiaron usando 223 pruebas tanto morfológicas y fisiológicas, como bioquímicas y de utilización de diferentes fuentes de carbono. Los análisis fueron computarizados. El 80% de todas las cepas excepto dos, se clasificaron en 8 grupos, importando solamente los tres primeros que corresponden al género Serratia:

Grupo A: Incluyeron a las cepas que no fermentan la pentosa y la rafinosa. No producen gas a partir de la fermentación de azúcares. Muchas cepas fermentan sorbitol y poseen la ornitina descarboxilasa.

No alcalinizan el malonato. Varias son resistentes a las tetraciclinas.

Crecen a 40°C. Todas las cepas aisladas de pacientes pertenecen a este grupo.

Se aislaron también de animales, agua de mar y de alimentos. Este grupo cuenta con 11 subdivisiones (Al al A11) y de éstas existen algunas derivaciones.

A este grupo corresponde S. marcescens (el neotipo sugerido por Martinec y Kocur, 1961) y también al modelo 1 de Serratia, aislada por Fulton y col en 1959 (13).

Grupo B: Este consiste en cepas aisladas de hongos, agua de mar y cerdos, ninguna fué de humanos. Todas son pigmentadas y fer

mentan pentosa, rafinos, celobiosa, lactosa y adonitol pero no sorbitol. Alcaliniza el caldo manitol. No crecen a 5°C - ni a 40°C, carecen de la ornitina descarboxilasa y son susceptibles a las tetraciclinas.

Hay tres subgrupos observados. El pigmento es soluble en éter de petróleo y da un aspecto idéntico al de la prodigiosina de Nima.

A este grupo corresponde S. marinorubra, S. rubidae, Serratia biotipo 2 de Bascom (13).

Grupo C: Consiste en cepas aisladas de agua de mar y de salchichas. Fermentan las pentosas, rafinosa, sorbitol, pero no adonitol. Producen gas al fermentar carbohidratos, polialcoholes, exento inositol, crecen a 5°C pero no a 40°C. Todas son susceptibles a las tetraciclinas.

Este grupo se subdivide en (13):

- Grupo C₁: corresponde a S. liquefaciens.
- Grupo C₂: no produce pigmento y corresponde a S. plymuthica.

2.3.- HABITAT.

La confusión que existió en la taxonomía hizo difícil deducir su hábitat. Las cepas pigmentadas se nombran en publicaciones antiguas pero no las especies y biotipos no pigmentados, hasta la actualidad se han hecho trabajos sobre ellas y se ve la gran importancia de identificarlas. Las especies de Serratia se aislan de diferentes hábitats como lo muestra la tabla 1 (3, 12).

2.3.1.- Serratia en aire, agua y suelo.

En agua residuales, S. marcescens y S. liquefaciens se encuentran en 1.2% y 3.4% de las muestras, respectivamente. Denis, en 1971 aisló cepas con características bioquímicas de S. rubidae

Tabla 1.- Distribución entre las cepas de Serratia de 1,273 cepas aisladas a partir de diferentes hábitats.

Especies de <u>Serratia</u> .	Hábitats y no. de aislamientos.			
	Agua	Plantas	Insectos	Pacientes hospitalizados
<u>S. marcescens</u>	31	19	28	1,078
<u>S. plymuthica</u>	19	5	0	0
<u>S. rubidae</u>	5	3	1	2
<u>S. odorifera</u>	-	4	-	1
<u>S. liquefaciens</u>	6	30	19	27

Tabla 2.- Distribución de biotipos de S. marcescens en 1,139 cepas aisladas de cuatro diferentes hábitats.

Biotipos.	Hábitats y no. de aislamientos			
	Agua	Plantas	Insectos	Pacientes hospitalizados
A 1 ab	8	8	3	2
A 2ab/ A 6ab	14	2	15	78
A 3abcd	1	5	3	78
A 4ab	6	3	4	277
A 5/ A8abc	0	0	2	497
TCT	0	0	1	134

a partir de agua de mar y plancton (11).

De 61 aislamientos de Serratia sp a partir de agua (incluyendo 8 muestras de agua de mar), S. marcescens representó el 50% de todas las cepas, S. liquefaciens el 11.2%, S. plymuthica --- 30.6% y S. rubidae 8.1%. Los biotipos de S. marcescens son esencialmente pigmentados (74.6% de cepas) y solamente los biotipos A4 y A3b son no pigmentados, representando el 19.3 y 3.2% de --- las cepas, respectivamente (12).

La tabla 2 muestra la distribución entre biotipos de las cepas de S. marcescens en diferentes hábitats.

S. rubidae no es realmente una especie marina pues no se especifica su requerimiento de iones Na^+ y puede encontrarse en --- aguas dulces. En el suelo S. marcescens juega un papel en la mineralización.

Los biotipos A5, A8abc y TCT no se han encontrado en agua y --- suelo (fuera de los hospitales).

2.3.2.- Serratia asociada con plantas.

Serratia sp se encontró en el 30% de 209 especímenes de plantas observadas: árboles (eucaliptos, pinos), arbustos, frutales (higos, cocos), vegetales (jitomates, puerro, cebolla verde, lechuga, brócoli, alcachofa, rábanos, espinacas, zanahorias, coliflor), hierbas, hongos comestibles y venenosos y musgo. De las --- especies recobradas la que predominó fué S. protamaculans y los biotipos de S. marcescens no pigmentados A3 y A4 (11, 12).

Los vegetales usados en ensaladas pueden llevar especies de --- Serratia y al dárselos a los pacientes hospitalizados pueden infectar su aparato digestivo, así se encontró que las especies --- aisladas de las ensaladas servidas en un hospital de Pittsburgh fueron: S. marcescens, S. liquefaciens y S. rubidae en un 29, --- 28 y 11%, respectivamente.(12).

2.3.3.- Serratia asociada con insectos.

Los insectos involucrados pertenecen a numerosas especies y géneros de las órdenes Orthoptera (grillo y saltamontes), Coleoptera (escarabajo y gorgojo), Isoptera (hormiga blanca), Lepidoptera (marinosa nocturna), Hymenoptera (abeja y avispa) y Diptera (mosca) (12).

Las causas de la infección en insectos son poco entendidas.

S. marcescens y S. liquefaciens se clasifican como patógenos potenciales, porque causan rápidamente enfermedad cuando están en el hemocel, pero no cuando se ingieren en pequeñas cantidades. El jugo digestivo no es apto para el desarrollo bacteriano, y no está claro cómo se reproduce Serratia (11).

2.3.4.- Serratia asociada con vertebrados:

Se asocia también con infecciones crónicas en vertebrados de sangre fría como infección nodular en lagarto cubano, abscesos en iguana, artritis en lagarto, enfermedad ulcerativa en tortugas (12).

Las aves de corral pueden contaminarse con Serratia sp originando una epizootia entre los embriones de pollo, aunque las gallinas portadoras de S. marcescens en su tracto digestivo no son afectadas. Se ha reportado la muerte de pollos con S. liquefaciens y sus huevos contaminados por Serratia pigmentada.

Cepas de Serratia son igualmente responsables de mastitis en vacas. Rara vez se encuentra en leche cruda. Está involucrada en septicemia de potros, cerdos y cebras, en conjuntivitis de caballo y abortos de vacas (11, 12).

2.3.5.- Serratia en el hombre.

S. marcescens es la única especie que tiene interés nosocomial. S. proteamaculans y S. rubida se aíslan ocasionalmente de especímenes clínicos, pero su mecanismo de patogenicidad no es

tá claro. Entre los diferentes biotipos de S. marcescens, solamente los no pigmentados son un gran problema dentro de un hospital.

Los biotipos pigmentados son raramente responsables de brotes, a menos que el paciente se contamine con productos no estériles, como inyecciones y aerosoles. Estos son también responsables del síndrome del pañal rojo y de la colonización asintomática del tracto digestivo del recién nacido. Frecuentemente se encuentran en heces de recién nacido pero no en adultos. Colonizan el tracto respiratorio y un excesivo crecimiento puede tornar rojo el esputo (11, 12).

S. marcescens no pigmentada puede identificarse en heces de pacientes hospitalizados cuando se ocupa un medio selectivo.

2.4.- IMPORTANCIA CLINICA.

La septicemia producida por bacilos Gram negativos se ha presentado con mayor frecuencia en los últimos tres decenios. La frecuencia general estimada varía entre 71,000 y 330,000 casos por año en Estados Unidos con índice de mortalidad de 20 y 50%, se presenta entre 3 y 25/1,000 pacientes internados (21).

Serratia se consideró originalmente como saprófito inocuo pero ahora es patógeno oportunista con mayor frecuencia, tiene elevada mortalidad y es poseedor de una notable capacidad para desarrollar resistencia a gran número de antibióticos (12, 20).

Hoy en día, se piensa que Serratia es el agente causante de 1.6 a 18.1% de las septicemias provocadas por bacilos Gram negativos y posee un índice de mortalidad variable entre 18 y 64% (4).

De una revisión de 8 años de las meningitis bacterianas ocurridas en el Instituto Nacional de Pediatría, se encontró que de 453 casos, el 4.2% correspondió a S. marcescens. La distribu

ción de edad mostró una mayor frecuencia en los menores de 3 meses (63.1% de los casos) originado posiblemente por la baja experiencia inmunológica de la población a esta edad, por la presencia de procesos infecciosos concomitantes y por la desnutrición (25).

S. marcescens es capaz de producir neumonía. Estudios previos revelaron que la administración intratraqueal de la proteasa en conejos, produce gran daño en el pulmón (20).

Es importante patógeno nosocomial, capaz de producir endocarditis, osteomielitis, infecciones asociadas a catéteres intravenosos, neumonía y enfermedades en tracto urinario (16, 24).

Existen varios factores que predisponen a que un paciente se infecte con S. marcescens:

- 1.- Edad: Causa más fácilmente infecciones en pacientes entre 60 y 80 años, por tener la respuesta inmune debilitada, o en niños con edades menores de un año.
- 2.- En pacientes que sufren padecimientos debilitantes como diabetes mellitus, enfermedades cardíacas (infarto al miocardio, debilitamiento congestivo al corazón), enfermedades respiratorias (neumonía y epiema), enfermedad hepática (cirrosis), anemias, tuberculosis pulmonar. Todas éstas bajan la resistencia del individuo y favorecen la infección.
- 3.- Implantación de catéteres tanto intravenosos como uretrales, ya que actúan como vías de entrada al organismo.
- 4.- Tipo de terapia antibiótica, ya que elimina parte de la flora normal y puede ser aprovechada por S. marcescens para causar infección.

Experimentos hechos por Miller y Bucker explican la resistencia de S. marcescens hacia muchos antibióticos, en base a que encontraron que puede sobrevivir la fagocitosis por leucocitos humanos y pueden crecer extracelularmente y así diseminarse ha-

cia otros tejidos (17, 24).

2.5.- PATOGENIA.

Los mecanismos de patógenesis en la infección por Serratia se pueden explicar en base a sus 4 proteasas (24).

- 1.- S. marcescens produce 4 diferentes y potentes proteasas, -- así como dos endonucleasas.
- 2.- Una proteasa de 56 kilodaltons (proteasa 56K) que activa el factor de Hageman y consecuentemente la cascada Hageman-kalicreína-quinina, lo cual permite la permeabilidad vascular. La queratitis es resultado de la actividad de la proteasa.

Se investigaron los efectos de la proteasa extravascular de S. marcescens en los constituyentes del suero humano tales como inmunoglobulinas, fibronectina, α_2 -macroglobulina, lisozima y transferrina. Poca concentración de la proteasa degradó rápidamente la fibronectina en tres dominios estructurales o en pequeños fragmentos. La IgG3 y la IgA1 las destruyó en 30 min; la α_1 proteasa inhibidora no actuó y al igual que los otros constituyentes, fueron degradados. Con esto se demostró que la proteasa es capaz de degradar las proteínas orientadas a la respuesta humoral que constituyen los tejidos (22, 24).

En las tentativas para caracterizar las proteasas 56K, se encontró que son sustrato específico para síntesis de péptidos -- que son casi idénticos a la kalicreína, la cual se conoce como factor activador de la cascada Hageman-kalicreína-quinina (18, 24).

2.6.- ANALISIS EPIDEMIOLOGICO.

En base a todo lo mencionado, es importante conocer la epidemiología de dicha infección, se ha hecho un análisis de sus marcadores epidemiológicos como serotipificación, tipificación del

fago, producción de la bacteriocina y susceptibilidad, zimogramas, antibiogramas, tipificación bioquímica y modelos de asimilación de la fuente de carbono (30).

2.6.1.- Características microbiológicas:

2.6.1.a.- Características microscópicas.

- Bacilos Gram negativos en forma de varilla delgada con extremos redondeados.
- Móvil mediante flagelos peritricos.

2.6.1.b.- Características macroscópicas.

- Colonias grandes, lisas, de bordes regulares, opacas, - además producen pigmento rojo; pero pueden ser blancas o rosas. No producen pigmento en agar papa.
- En medio agar sangre producen hemólisis.
- Condiciones de cultivo:

pH del cultivo: 5-9.

Temperatura de incubación: 10 - 36°C.

Tensión de oxígeno: facultativos. (3, 7, 12).

2.6.1.c.- Características bioquímicas (3, 7).

Prueba bioquímica.	Resultado
Fermentación:	
Glucosa	+
Lactosa	-
Producción:	
Gas	-
H ₂ S	-
Indol	-
Movilidad	+
Utilización:	
Citrato	+

Urea	+
Voges-Proskauer	+
OX	+
AD	-
ID	+
Malonato	-
Sorbitol	+
Rafinosa	-
Arabinosa	-

Enzimas extracelulares.	Resultado.
-------------------------	------------

Gelatinasa	+
Lipasa	+
Caseínasa	+
Lecitinasa	+
DNAasa	+

2.6.2.- Identificación de los biotipos:

Los biotipos de Serratia fueron los primeros estudiados por la taxonomía numérica. Ahora se reconocen 19 biotipos en S. marcescens, 7 en S. liquefaciens, 3 en S. plymuthica, 3 en S. rubidae y 2 en S. ficaria. Para identificar los biotipos se lleva a cabo una serie de pruebas basadas en la utilización de diferentes fuentes de carbono (3, 7, 12, 30).

Características	Biotipos						
	A1	A2/6	A3	A4	A5/8	TCT	TC
Crecimiento en:							
m-eritrol	+	+	+	+	-	-	-
Benzoato o hipurato	+	-	-	-	-	-	-
Quinato o 4-hidroxibenzoato.	-	db	-	db	+	-	-
3-hidroxibenzoato	-	-	db	-	db	-	-
trigonelina	-	db	db	-	+	+	-
DL-carnitina	db	d	d	+	db	db	+
Reducción de tetratio							
nato.	+	+	+	-	+	+	+
Producción de la pro-							
digiosina.	+	+	-	-	-	-	-

d Positiva para el biotipo A6, negativa para A2a y A2b

db Pruebas positivas para los diferentes biotipos.

Para un análisis epidemiológico se realiza la biotipificación de S. marcescens. Los biotipos A1a, A1b, A2b, A2a, A6a y A6b — son los únicos pigmentados. Los 13 restantes son no pigmentados. Los biotipos A6b, A4b, TT y TC se encuentran raramente y — su importancia ecológica se desconoce.

Los biotipos A3abcd y A4 son inocuos, mientras que los biotipos no pigmentados A5, A8abc y TCT son estrictamente de pacientes hospitalizados. Los biotipos pigmentados son ubicuos (3, — 7, 13).

2.6.3.- Serotipificación.

Se cita que Hefferan en 1906 (12) hizo su primer trabajo, sin embargo, fué hasta 1926 en que empezó a trabajar con antígenos somáticos.

Los antígenos flagelares (H) se describieron hasta 1959. La serotipificación no fué fácil. El presente sistema consta de 21 antígenos somáticos (O1 al O21) y 25 antígenos flagelares (H1 - al H25).

Hay reacciones cruzadas entre los antígenos O2 y O3; O6 y O7; y O6, O12 y O14. Hay una relación tan estrecha entre O6 y O14 - que a veces es muy difícil distinguirlos.

La combinación más frecuente es O14:O12. La serotipificación subdivide a los biotipos, pero cuando hay dos que corresponden al mismo serotipo usualmente difieren en alguna reacción bioquímica. Los biotipos pueden unirse en biogrupos para amplificar - la correlación biotipo-serotipo (3, 12, 30).

Biogrupo	Serotipo O:H
A1	5:2, 5:3, 5:13, 5:23, 10:6, 10:13.
A2/6	6,14:2, 6,14:8, 6,14:9, 6,14:10, 6,14:13, 8:3, 13:5.
A3	3:5, 3:11, 4:9, 4:18, 5:6, 5:15, 6,14:5, 6,14:6, --- 6,14:20, 9:11, 9:17, 12:5, 12:9, 12:17, 12:20, 13:11, 13:17, 15:3, 15:5, 15:8, 15:9, 17:4, 18:21.
A4	1:1, 1:4, 2:1, 2:8, 3:1, 4:1, 4:4, 5:1, 5:6, 5:8, --- 5:9, 9:1, 13:1, 13:13.
A5/8	3:12, 3,21:12, 4:12, 5:4, 6,14:12, 6,14:4, 8:12, --- 15:12, 21:12.
TCT	1:7, 2:7, 4:7, 5:7, 5:19, 7:23, 11:4, 13:7, 13:12, --- 16:19, 18:9, 18:16, 19:14.
TC	10:8, 20:12.

2.6.4.- Tipificación de las bacteriocinas (11, 12, 32, 33, 35).

El primer reporte de una bacteriocina en S. marcescens designada marcescina, fué el de Petter y Horton en 1950, quienes descubrieron una cepa de este microorganismo pigmentado aislado de suelo, la bacteriocina fué un polipéptido termoestable (100°C) activo contra C. diphtheriae, S. aureus, Pasteurella multocida (P. septica) y C. perfringens y tóxica para ratones. La marcescina fué hemolítica para glóbulos rojos de caballo, soluble en solventes orgánicos, dializable y resistente a la tripsina.

La bacteriocina la observaron Hamon y Peron en 1961, en 73 de 85 aislamientos de Serratia, después de la inducción con luz ultravioleta. Sin embargo, 12 de 73 cepas bacteriocinogénicas elaboraron varias bacteriocinas que difieren en el tipo de huésped y de este modo se asignan las fracciones 1 y 2.

La bacteriocina de fracción 1 se parece a la colicina, en que ambas son activas contra E. coli pero no contra S. marcescens y es susceptible a la tripsina. La bacteriocina purificada tiene un peso molecular de 64,000 daltones e inhibió la incorporación de leucina dentro de la proteína timidina en el ADN y activó el transporte de leucina en la cepa indicadora de E. coli JP 135.

La bacteriocina de la fracción 2 es activa contra cepas de S. marcescens pero no contra E. coli y resiste a la tripsina. Estas observaciones las confirmó Prinsloo en 1966, quien empleó una nomenclatura diferente. Su grupo B corresponde a la fracción 1 de Hamon y Peron y el grupo A a la fracción 2.

Las bacteriocinas del grupo A se dividieron en 8 grupos en base a su huésped, mencionándose cepas indicadoras y mutantes resistentes derivadas de ellas. Además, las bacteriocinas del grupo A son resistentes al cloroformo, tripsina y enzimas proteolíticas de ciertos microorganismos y son no dializables y termoestables (60°C 30 min.).

En contraste, las bacteriocinas del grupo B son inactivas contra S. marcescens pero inhibidas por E. coli, Hafnia y Aerobacter, son termolábiles, no dializables y susceptibles al cloroforno y enzimas proteolíticas. El mismo Prinsloo y sus colaboradores en 1965, demostraron que el grupo A, electroforéticamente móvil, migra hacia el cátodo mientras que las del grupo B permanecen estacionarias.

Se han desarrollado dos esquemas diferentes para tipificar -- las cepas de S. marcescens en base a susceptibilidad de bacteriocinas. Traub, Raymond y Starsman encontraron 37 cepas productoras de bacteriocinas (marcescina) de 50 cepas tratadas con mitomicina. El 92% de estas cepas fueron susceptibles a una o más marcescinas.

En 10 cepas productoras seleccionadas por computadora, se clasificaron el 93% en 16 tipos. El número de tipos se extendió -- después a 37; se tipificaron el 85% de las cepas clínicas.

Farmer en 1972, independientemente desarrolló otro sistema de tipificación por susceptibilidad de marcescina. Después de la -- inducción, se seleccionaron 12 cepas productoras y las 12 marcescinas permiten dividir a 93 cepas en 79 tipos. Se seleccionaron 33 cepas susceptibles para servir como cepas indicadoras. -- Cada cepa desconocida se trata con mitomicina y la productora -- de marcescina se identifica de acuerdo al modelo de susceptibilidad de cepas indicadoras. Este método puede tipificar el 91% de cepas estudiadas. La tipificación de producción de bacteriocinas es probablemente un marcador epidemiológico más real que tipificando por susceptibilidad de bacteriocinas.

2.6.5.- Zymogramas de Proteinasa.

Varias enzimas enterobacterianas se sometieron a un análisis electroforético en una clasificación de cepas por Métodos Núme-

ricos en base a la migración electroforética de 8 enzimas, S. marcescens formó un grupo exclusivo, diferente de Klebsiella-Enterobacter.

En la electroforesis de las proteinasas de Serratia se descubrió una multiplicidad de enzimas. Se reconocieron hasta 11 proteinasas (F1 a F11) difiriendo por su migración.

Con el uso de la electroforesis en gel de agarosa, Grimont, - Grimont y Dulong en 1977 y Grimont y Grimont en 1978, descubrieron 7 proteinasas producidas por S. marcescens (P5, P6, P7, P9a, P9b, F11, y F12). Cada cepa puede producir de 1 a 4 proteinasas.

En un hospital francés se aislaron 51 cepas de S. marcescens, en un período de 6 años dando 33 diferentes modelos de proteinasas llamadas zymotipos.

De acuerdo con modelos de proteinasas y pruebas bioquímicas, las especies de Serratia se pueden clasificar en biotipos.

Una cámara de electroforesis con gel de poliacrilamina permitió la determinación aproximada de los puntos isoeléctricos de algunas proteinasas:

F1	pH = 3.6	F9	pH = 5.6 - 5.9
F2	pH = 3.7	F10	pH = 5.8 - 6.0
F3	pH = 3.8	F11	pH = 6.0
F7	pH = 5		

Los zymogramas pueden ser útiles marcadores epidemiológicos - (3, 11, 12, 14).

2.6.6.- Sensibilidad a antibióticos.

En los últimos años, el mejoramiento de las condiciones sanitarias, el uso masivo de diversas vacunas y la terapéutica antimicrobiana, han elevado el nivel de la población. Si bien el tener sustancias eficaces para el tratamiento de las enfermeda-

des fué el sueño largamente anhelado durante la primera mitad - del siglo XX, es hasta los años cuarenta cuando surge la penicilina, como la punta de lanza de los antibióticos. Después de entonces, la utilización de éstos con fines terapéuticos y profilácticos, ha traído cambios en la ecología humana.

Se mencionan un número de consideraciones para la selección -- apropiada del tratamiento antimicrobiano, estos incluyen (19):

- 1.- Conocimiento de la susceptibilidad in vitro, inherente al microorganismo infectante frente a los antibióticos apropiados.
- 2.- Relación de la susceptibilidad de la cepa con otros miembros de la misma cepa.
- 3.- Propiedades farmacológicas como toxicidad, proteínas de unión, distribución, absorción y excreción, particularmente bajo circunstancias de existencia y desarrollo de hepatitis y falla renal.
- 4.- Experiencia clínica previa de eficacia en el tratamiento de las enfermedades debidas a las mismas especies.
- 5.- Naturaleza de los procesos patológicos.
- 6.- El estado inmune del huésped.

El uso indiscriminado de antimicrobianos a nivel humano, animal y vegetal en menor grado, ha dado lugar a la selección de -- cepas bacterianas resistentes, de manera que en la práctica es común encontrar ineficacia de los antimicrobianos para tratar -- determinadas enfermedades.

Las condiciones sanitarias deficientes en que se desarrolla -- la mayor parte de la población mexicana es causa de la elevada frecuencia de las enfermedades infecciosas bacterianas, que -- aunada a la situación socioeconómica desfavorable, propicia la automedicación o la inadecuada prescripción de antimicrobianos por parte del médico, hechos que agudizan la selección de cepas

resistentes. Otros factores que contribuyen a dicha infección imperante son el uso incorrecto de antimicrobianos en veterinaria y su empleo para la conservación de alimentos (6).

La resistencia que presentan las cepas clínicas frente a los antimicrobianos es frecuente debido a la presencia de elementos extracromosómicos del ADN llamados plásmidos R. Muchos de estos elementos genéticos tienen la capacidad de transferirse entre bacterias de igual o diferente especie, así como entre distintos géneros. Es característico que la mayoría de los genes de resistencia pueden transponerse (inserción de copias de replicas), contribuyendo factores determinantes en la diseminación de genes de resistencia entre la población bacteriana. De tal manera que se dificulta el control de algunas enfermedades infecciosas que en ocasiones surge como brotes epidémicos y epizootias, que además de la pérdida de vidas, implican un deterioro económico considerable (6).

Muchos reportes enumeran la importancia nosocomial de S. marcescens como un oportunista patógeno. Se han incrementado con frecuencia durante los últimos años las infecciones serias causadas por este microorganismo, especialmente entre los pacientes hospitalizados con disminución en la resistencia a la infección. Un factor que marca la terapia frente a la enfermedad es la múltiple resistencia de muchas cepas (10, 34).

La resistencia al cefalotín, colistín y polimixina es muy frecuente en el género y mucho más constante en S. marcescens, al igual que la resistencia a la tetraciclina y ampicilina (3).

Von Gravitz estableció que Serratia no tiene un modelo uniforme de susceptibilidad, pero sugiere fallas en su sensibilidad que pueden ser de ayuda en el diagnóstico y tratamiento clínico. Farrar en 1956 encontró que Serratia es sensible al cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, y altamente resistente a la -

resistentes. Otros factores que contribuyen a dicha infección imperante son el uso incorrecto de antimicrobianos en veterinaria y su empleo para la conservación de alimentos (6).

La resistencia que presentan las cepas clínicas frente a los antimicrobianos es frecuente debido a la presencia de elementos extracromosómicos del ADN llamados plásmidos R. Muchos de estos elementos genéticos tienen la capacidad de transferirse entre bacterias de igual o diferente especie, así como entre distintos géneros. Es característico que la mayoría de los genes de resistencia pueden transponerse (inserción de copias de replicas), contribuyendo factores determinantes en la diseminación de genes de resistencia entre la población bacteriana. De tal manera que se dificulta el control de algunas enfermedades infecciosas que en ocasiones surge como brotes epidémicos y epizootias, que además de la pérdida de vidas, implican un deterioro económico considerable (6).

Muchos reportes enumeran la importancia nosocomial de S. marcescens como un oportunista patógeno. Se han incrementado con frecuencia durante los últimos años las infecciones serias causadas por este microorganismo, especialmente entre los pacientes hospitalizados con disminución en la resistencia a la infección. Un factor que marca la terapia frente a la enfermedad es la múltiple resistencia de muchas cepas (10, 34).

La resistencia al cefalotín, colistín y polimixina es muy frecuente en el género y mucho más constante en S. marcescens, al igual que la resistencia a la tetraciclina y ampicilina (3).

Von Gravitz estableció que Serratia no tiene un modelo uniforme de susceptibilidad, pero sugiere fallas en su sensibilidad que pueden ser de ayuda en el diagnóstico y tratamiento clínico. Farrar en 1956 encontró que Serratia es sensible al cloramfenicol, gentamicina, kanamicina, y altamente resistente a la

tetraciclina y menos a la estreptomocina, y hasta 1977 fué cuando la incidencia de resistencia aumentó contra estos antibióticos (8, 10).

En el Centro Especial "Ramón y Cajal" de Madrid, España, se obtuvo un patrón de sensibilidad de las cepas aisladas de S. marcescens provenientes de hemocultivos, en los que se observó que el 62% de éstas eran resistentes a la gentamicina, 4% a la amikacina y sólo 1% a cefalosporinas de tercera generación (4).

S. marcescens cae dentro de dos grupos con respecto a su resistencia a antibióticos β -lactámicos. Muchas cepas son altamente resistentes a las cefalosporinas, pero son susceptibles a ampicilina y carbenicilina, mientras que otras cepas son resistentes a todas. Las primeras producen una pequeña cantidad de cefalosporinasa inducible, siendo mediada cromosómicamente. En cambio, las resistentes a estos tipos de antibióticos elaboraron una penicilinasa-cefalosporinasa no inducible, la cual es mediada por plásmidos. La capacidad de este tipo de enzimas puede ser transferido a K. pneumoniae o a E. coli y puede ser espontáneo o presentarse con agentes curativos de S. marcescens (10, 28, 31).

Trabajos previos, han aclarado que tanto β -lactámicos, como amino-glucósidos, solos o en combinación, pueden provocar resistencia en S. marcescens. Esto parece ser resultado de dos eventos separados, alteración en las proteínas de la membrana exterior y desarrollo de actividad de la acetil-amino-glicosidasa (AAC'6). Trabajos de Traub y col (34) sugirieron que el gen de la AAC'6 puede ser inducido y tener un origen cromosómico (27).

Las alteraciones de la membrana que se presentan incluyen:

- 1.- Mayor permeabilidad en su membrana exterior.
- 2.- Estabilidad contra la hidrólisis de la β -lactamasa localizada en el periplasma.

3.- Alta afinidad a enzimas localizadas en la membrana citoplasmática.

Se reportó que la adición de EDTA reduce la MIC de los antibióticos de bacterias Gram negativas. Esta acción se atribuye al daño de la barrera de permeabilidad de la membrana exterior por quelación de los cationes divalentes de la misma (15, 34).

2.6.7.- Tipificación por plásmidos.

Es poco común que una cepa de S. marcescens sea la causa de un brote nosocomial prolongado y la resistencia a agentes antimicrobianos se deriva de los plásmidos R, que pueden ser inducidos cuando la cepa tiene contacto con otras cepas resistentes (23).

El sitio de transferencia de plásmidos R postulado entre bacilos Gram negativos, es el tracto gastrointestinal. Para S. marcescens, que es un pobre colonizador del tracto, es raro que ocurra esto (28).

La ausencia de colonización sugirió la posibilidad de que la transferencia sea extraintestinal. Pueden ser posibles numerosos sitios, pero este microorganismo tiene marcada predilección por el tracto urinario.

Schaeffler y col (1977) reportaron que puede ocurrir la transferencia en tracto intestinal pero en ciertas condiciones poco comunes (29).

La orina es un buen medio de crecimiento y la bolsa donde se recolecta en pacientes cateterizados, está libre de propiedades antimicrobianas. Estos pacientes son tratados con terapia antimicrobiana que podría ayudar a la selección de cepas resistentes. Además, las bolsas se vacían a intervalos largos. Se ha demostrado que la transferencia ocurre en cuatro horas a temperatura ambiente. Cuando estos microorganismos se cultivan de oportunidad dentro del hospital a intercambio de información genética

ca; así, la orina residual, tanto en las bolsas de orina como la presente por el vaciamiento incompleto de la vejiga puede proveer un inóculo que podría multiplicarse rápidamente, con las concentraciones óptimas de transferencia de plásmidos (28).

Estudios hechos in vitro sobre la transferencia de Serratia y Klebsiella a E. coli, demostraron la capacidad de ambas especies, de transferir resistencia a ampicilina, cefalotonina, kanamicina, tetraciclina, cloramfenicol y sulfonamidas. Además, la transferencia de la multiresistencia de S. marcescens a Klebsiella in vitro, marca una pauta para la noción de que el evento puede ocurrir in vivo (31).

Medeiros y O'Brien mostraron que los factores R, confieren altos niveles de la actividad de penicilinasa en cepas de S. marcescens, e incrementan el nivel de resistencia de estas cepas a ampicilina. Encontraron igualmente, que estos factores R dan un moderado grado de resistencia a cefalotina en experimentos con otros microorganismos, pero la resistencia a éste, no se pierde junto con otros marcadores de resistencia durante pasos sucesivos en caldos (10).

Hedges notó que los plásmidos de Serratia pueden ser extremadamente estables. Hay un número limitado de grupos de plásmidos incompatibles en el género y la transferencia in vitro a menudo es ineficiente (8).

En S. marcescens solamente hay seis grupos incompatibles que son: L, S (=H₂), G, M, P y P_{II}. Los grupos P, G y M tienen un amplio rango, mientras que el L sólo se encontró en S. marcescens. La transferencia espontánea de plásmidos R se identificó sólo en biotinos no pigmentados (11).

La disponibilidad de nuevos métodos de electroforesis en gel, podría determinar la presencia de ADN extracromosomal con o sin determinantes de resistencia a antibióticos en un cierto número

de Serratia (23).

El descubrimiento en 1977 de que algunos tipos de plásmidos pueden ser preferencialmente asociados, en lugar de otros, postuló dos hipótesis: en primer lugar, la presencia de plásmido — podría influir en la posición taxonómica por modificación de caracteres fenotípicos cualitativos (plásmidos metabólicos) o — cuantitativos (por alteración en la expresión de algunas funciones) y en segundo, por algunas razones desconocidas, los biotipos pigmentados pueden portar más plásmidos R (11).

2.6.8.- Tipificación por fagos (3, 11, 12).

El primer esquema de fago-tipificación de Serratia lo reportaron Pillich, Hradecna y Kocur en 1964, quienes estudiaron la — susceptibilidad de 107 cultivos a 10 fagos y describieron 7 grupos. Este sistema, sin embargo, no se usa en cepas de tipo clínico. Posteriormente, Hamilton y Brow seleccionaron 34 fagos — que pudieron clasificar al 90.6% de 204 cepas dentro de 23 grupos y 71 tipos de fagos.

Los bacteriofagos activos en Serratia se encuentran fácilmente en agua de río o de mar. Los que son activos en una especie de Serratia son también en cepas de otras especies del mismo — género, pero raramente en cepas de distinto género. La lisogenia es muy común en las cepas de Serratia.

CAPÍTULO III.

PARTE EXPERIMENTAL.

3.1.- Material.

3.1.1.- Material de uso común.

Asa bacteriológica.

Baño de hielo.

Baño de hielo seco-etanol.

Cajas Petri.

Espátula.

Frascos de vidrio.

Matraces Erlenmeyer de 250 ml.

Mechero de Bunsen.

Micropipeta de 1 - 20 μ l.

Micropipeta de 50 - 200 μ l.

Microplacas.

Pipeta Pasteur.

Pipetas 0.1 ml divididas 1/10.

Pipetas 1.0 ml divididas 1/10.

Pipetas 5.0 ml divididas 1/10.

Pipetas 10.0 ml divididas 1/10.

Portaobjetos.

Probetas de 100 ml.

Puntas para micropipeta.

Tela de asbesto.

Tripié.

Tubos de ensayo de 12 x 75.

Tubos de ensayo de 12 x 120.

Tubos de ensayo de 13 x 100.

Tubos de ensayo de 16 x 150.

Tubos de ensayo de 16 x 150 con tapón de rosca.

Tubos de Eppendorf.

Vasos de precipitado.

3.1.2.- Equipo.

Agitador magnético Corning.

Autoclave Presto.

Baño María con agitador Corning.

Balanza analítica Digital CYI DGN.

Balanza granataria OHAUS.

Cámara de electroforesis.

Cámara de Luz U.V. Buchler/instruments.

Filtros Millipore.

Fuente de Poder Buchler-Instruments.

Incubadora.

Nefelómetro Klett-Sumerson.

Potenciómetro Corning.

Replicador.

Ultracentrífuga Eppendorf Brinkman.

3.1.3.- Material Biológico.

Cepas GM 30/PBR 322 Tc^r Amp^r P.M. 2.6×10^6 .

P 654/FRS D1 Tc^r P.M. 35×10^6 .

J 53 / PF Tc^r Amp^r Km^r Nm^r P.M. 40×10^6 .

K 37/R 1 - 19 Amp^r Km^r Sm^r Sp^r Su^r Cr^r 63x10⁶.
Serratia marcescens biotipo 2b.

3.1.4.- Medios de cultivo y Reactivos.

Ac. acético glacial Baker Analyzed.

Ac. bórico P.Q. Monterrey.

Acetato de sodio Baker Analyzed.

Ac. clorhídrico Baker Analyzed.

Ac. etilendiaminotetracético Baker Analyzed.

Agar Bioxón.

Agarosa Zigma.

Agar EMB Merk.

Agar McConkey Merk.

Azul de bromotimol Merk.

Base Tris Zigma.

Base gelosa chocolate Merk.

Base gelosa sangre Merk.

Benzoato de sodio P.Q. Monterrey.

Bromuro de etidio Zigma.

Cloruro de calcio Baker Analyzed.

Cloruro de sodio Baker Analyzed.

Colorantes de Gram.

Difosfato de potasio P.Q. Monterrey.

Dodecil sulfato de sodio Zigma.

Elastina Zigma.

m-Britrol Zigma.

Etanol Merk.

Extracto de carne Difco.

Gelatina Bioxon.

Glucosa Merk.

Hidróxido de sodio Baker Analyzed.

Huevo.

Caldo Infusión Cerebro Corazón Difco.

Leche Nestlé.

Lifozima Zigma.

Manitol Sal Agar Merk.

Medio de Citrato de Simmons Merk.

Medio de Kligler Merk.

Medio de SIM Merk.

Medio de Hemocultivo de Ruiz Castañeda.

Medio de Lisina descarboxilasa Merk.

Medio de Arginina descarboxilasa Merk.

Medio de Crnitina descarboxilasa Merk.

Medio de urea Merk.

Monfosfato de potasio P.Q. Monterrey.

Nitrato de cobalto P.Q. Monterrey.

Peptona Difco.

Rafinosa Zigma.

Sorbitol Zigma.

Sulfato de amonio P.Q. Monterrey.

Sulfato de fierro P.Q. Monterrey.

Sulfato de magnesio Baker Analyzed.

Sulfato de manganeso P.Q. Monterrey.

Sulfato de cobre P.Q. Monterrey.

Tiosulfato de sodio Baker Analyzed.

Trigonelina Zigma.

Tween 80 P.Q. Monterrey.

DIAGRAMA 2.- CONSERVACION DE CEPAS.

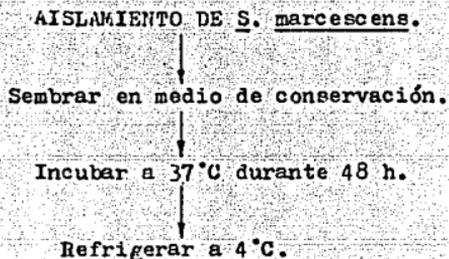


DIAGRAMA 3.- TIPIFICACION DE LA CEPA.

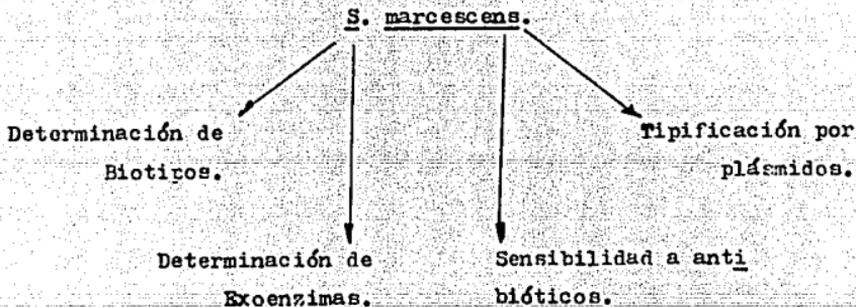


DIAGRAMA 4.- DETERMINACION DE BIOTIFOS.

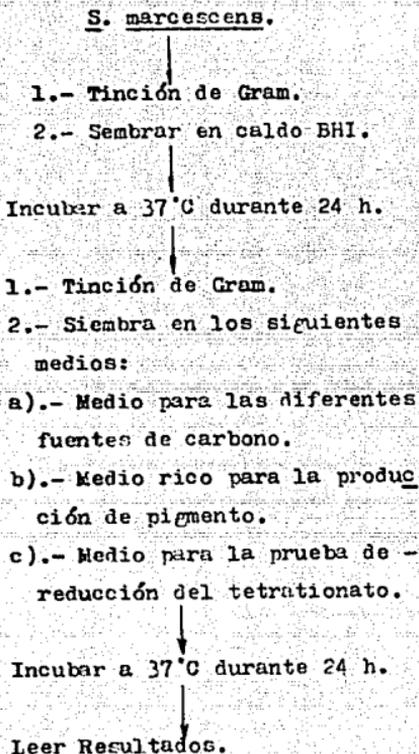


DIAGRAMA 5.- DETERMINACIÓN DE EXOENZIMAS.

S. marcescens

- ↓
- 1.- Tinción de Gram.
 - 2.- Siembra en caldo BHI.

↓

Incubación a 37°C durante 24 h.

- ↓
- 1.- Tinción de Gram.
 - 2.- Sembrar en los siguientes medios, para la producción de enzimas.

- a).- Medio de Huevo.
- b).- Medio de Tween 80.
- c).- Medio de leche descremada.
- d).- Medio de Gelatina.
- e).- Medio para la producción de DNasa.
- f).- Medio para la producción de elastasa.

↓

Incubar a 37°C durante 24 a 48 h.

↓

Leer Resultados.

DIAGRAMA 6.- DETERMINACION DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS.

S. marcescens.

↓
1.- Tinción de Gram.

2.- Sembrar en caldo EHI.

↓
1.- Tinción de Gram.

2.- Preparación del inóculo.

↓
Tomar 150 μ l y colocarlos en una
placa que contiene las diluciones -
de los antibióticos a probar.

↓
Incubar a 37 °C durante 24 h.

↓
Leer los resultados obtenidos.

DIAGRAMA 7.- TIFICACION POR PLÁSMIDOS.

S. marcescens



1.- Tinción de Gram.

2.- Sembrar en caldo EHI.



Obtención del plásmido.



Tinción del gel.



Observar y medir corrimientos
de plásmidos.

3.2.1.- AISLAMIENTO.

Las muestras las tomó el personal médico y paramédico de la Institución sembrándolas en medios ricos para el desarrollo de los microorganismos.

Las muestras de sangre se inyectan en el frasco con medio de Ruiz Castañeda y se coloca en forma horizontal durante 15 min. Posteriormente se levanta y se incuba a 37°C durante 24 h. Se observa el desarrollo al término del tiempo. En caso de no haber presencia de microorganismos incubar durante 30 días más.

Si hubo desarrollo, se siembra en Gelosa Sangre y en Gelosa Chocolate complementado con Isovitalex para el aislamiento de los microorganismos. Incubar durante 24 a 48 h a 37°C. Terminado el tiempo de incubación, de cada colonia hacer tinción de Gram para observar el grupo de microorganismos de que se trata. Dependiendo del resultado se procede de la siguiente manera:

Si son cocos Gram (+) se siembra en Manitol Sal Agar y Gelosa Sangre para observar si se trata de estafilococos y estreptococos. Incubar a 37°C durante 24 h, realizar tinción de Gram. Para diferenciar entre estos microorganismos se realiza la prueba de catalasa, primero se siembra de la Gelosa Sangre en caldo BHI, se toma una pequeña muestra y se realiza la prueba. Esta es positiva para estafilococos y negativa para estreptococos.

En el caso de estafilococos se realizan la prueba de la coagulasa y manitolasa.

Si se trata de estreptococos se hacen las pruebas de la bacitracina, CAMP o pruebas de aglutinación con anticuerpos contra los grupos A, B, C o D.

Si se trata de bacilos Gram (-) se siembra en agar McConkey y en EMB. Incubar a 37°C durante 24h. Realizar tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

3.2.3.b.- Determinación de Exoenzimas.

Sembrar cada cepa en caldo BHI, incubar a 37°C durante 18 h.

Esterilizar el replicador y dejarlo enfriar para ocuparlo al siguiente día.

Vaciar aproximadamente 0.5 ml del medio donde hubo desarrollo, en el replicador, hacer esto con todas las cepas. Colocar la caja de cada prueba a un lado. Por medio del replicador colocar cantidades estandarizadas de microorganismos en cada caja, éstas contienen diferentes medios para probar las siguientes enzimas: lipasa, lecitinasa, amilasa, elastasa, hidrólisis de la caseína.

Incubar a 37°C durante 18 h. Observar halos de inhibición si es positiva la prueba.

3.2.3.c.- Sensibilidad a antibióticos.

1.- Del medio de conservación de cada cepa, se toma una asada de microorganismos y se siembra en medio BHI líquido.

2.- Incubar a 37°C durante 18 h.

3.- Al cabo de este tiempo se observa el desarrollo.

Se ajusta la cantidad de microorganismos con ayuda del tubo 0.5 de la escala de Mac Farland (ver anexo I), que corresponde a 150×10^6 microorganismos aproximadamente.

4.- En tubos estériles de 16 x 150 colocar 9.6 ml de solución salina estéril, agregar 0.4 ml de medio de cada cepa ya ajustada.

5.- La preparación de las cajas se realiza un día antes:

Pesar el antibiótico tomando en cuenta la potencia y dilución final, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Vol (ml)} \times \text{dilución}}{\text{Potencia.}}$$

Se coloca en un tubo y se disuelve en el diluyente adecuado; en este caso todos se disuelven en agua.

Preparar el medio de caldo BHI y esterilizarlo, colocar 50 μ l del medio ya frío en las microplacas estériles. Taparlas perfectamente.

Agregar 50 μ l de cada antibiótico en el pozo correspondiente.

Hacer diluciones con ayuda de la micropipeta, es decir, una vez colocados los 50 μ l del antibiótico, se mezclan 2 o 3 veces, se toman 50 μ l de esta dilución y se agregan al siguiente pozo hasta llegar al pozo 11.

Una vez terminado, se tapan y refrigeran para ocuparlas el siguiente día.

6.- La dilución de cada muestra (paso 4) se vacía en una caja Petri estéril; por medio de la micropipeta tomar 50 μ l y colocarlos en cada pozo, hasta llegar a la fila 10. En la hilera 11 no se coloca inóculo porque es el control negativo, pero sí se agrega en el pozo 12 que es el control positivo. Este último sólo tiene medio y sirve para ver si hay desarrollo de la cepa.

La fila 11 es un control negativo porque sólo tiene medio más antibiótico y sirve para observar si éste no está contaminado.

Cada placa corresponde a un solo microorganismo en el que se están probando ocho antibióticos diferentes.

7.- Tapar correctamente e incubar a 37°C durante 24 h.

Todos los pasos se realizan en condiciones y con materiales estériles.

8.- Leer resultados. La última en la que no hubo desarrollo es la que se toma como resultado.

3.2.3.d.- Determinación del perfil de plásmidos.

Método de la Lisis Alcalina.

1.- Inocular en 3 ml de medio nutritivo (conteniendo el antibió

tico apropiado) una colonia bacteriana. Incubar a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa.

2.- Tomar 1 ml de cultivo y pasarlo a un tubo Eppendorf de ---- 1.5 ml. Centrifugar 5 min.

3.- Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender el paquete en un vortex con 100 μ l de solución I fresca (ver anexo I). Incubar 30 min en hielo.

4.- Agregar 200 μ l de solución II y mezclar el contenido por in versión del tubo dos o tres veces. Guardar el tubo sobre hielo 5 min.

5.- Adicionar 150 μ l de solución III (ver anexo I) cerrar el tubo, agitar suavemente con el vortex. Guardar sobre hielo 40 minutos.

6.- Centrifugar durante 20 minutos y tomar 400 μ l de sobrenadante (inmediatamente después de que se termina de centrifugar), - se pasan a otro tubo Eppendorf. Adicionar 1 ml de etanol frío - al 100%. Se mezclan y meten al baño de hielo seco-etanol (temperatura aproximada de -70°C) por 5 min o hasta que se ponga viscoso.

7.- Centrifugar 5 min y desechar sobrenadante.

8.- Adicionar 100 μ l de acetato de sodio más 200 μ l de etanol - al 100% (frío) meter en baño de hielo seco-etanol a que se ponga viscoso (5 min aproximadamente).

9.- Centrifugar 5 min, se tira el sobrenadante y se lava con -- 1 ml de etanol al 100% frío. Agitar vigorosamente.

10.- Centrifugar 5 min, desechar sobrenadante. Secar con bomba de vacío lo más posible. Colocar el paquete en desecador de vacío hasta que cristalice.

11.- El paquete se resuspende en 50 μ l de Te (pH = 8) más 1.2 μ g de azul de bromofenol conteniendo RNasa libre de DNasa.

12.- Preparar el gel de agarosa, una vez solidificado agregar -

50 μ l de la muestra en el pozo correspondiente.

13.- Colocar el gel en la cámara de electroforesis que contiene la solución de Tris Boratos 1 X (hacer dilución de la solución 5 X).

14.- Conectar la cámara de electroforesis a la fuente de poder, con un voltaje de 10 volts/cm durante 2 h o 2 h 30 min. Estar chequeando que la solución de boratos no se caliente.

15.- Sacar el gel y dejar escurrir el exceso de la solución de boratos. Teñirlos con una solución de bromuro de etidio por 4 h o toda la noche.

16.- Escurrir el exceso de colorante y pasar el gel en la cámara de luz U.V. Esto debe hacerse con mucho cuidado para no tocar el colorante porque es cancerígeno.

17.- Prender el aparato, cuidando de que los rayos no sean directos a los ojos ni a la piel. Observar bandas.

18.- Tomar fotografías, para que posteriormente se puedan medir las bandas, sin peligro de quemarse por los rayos U.V.

19.- Realizar una curva patrón con las cepas estándar para intercalar los resultados de las cepas problema y así tener el peso molecular del plásmido.

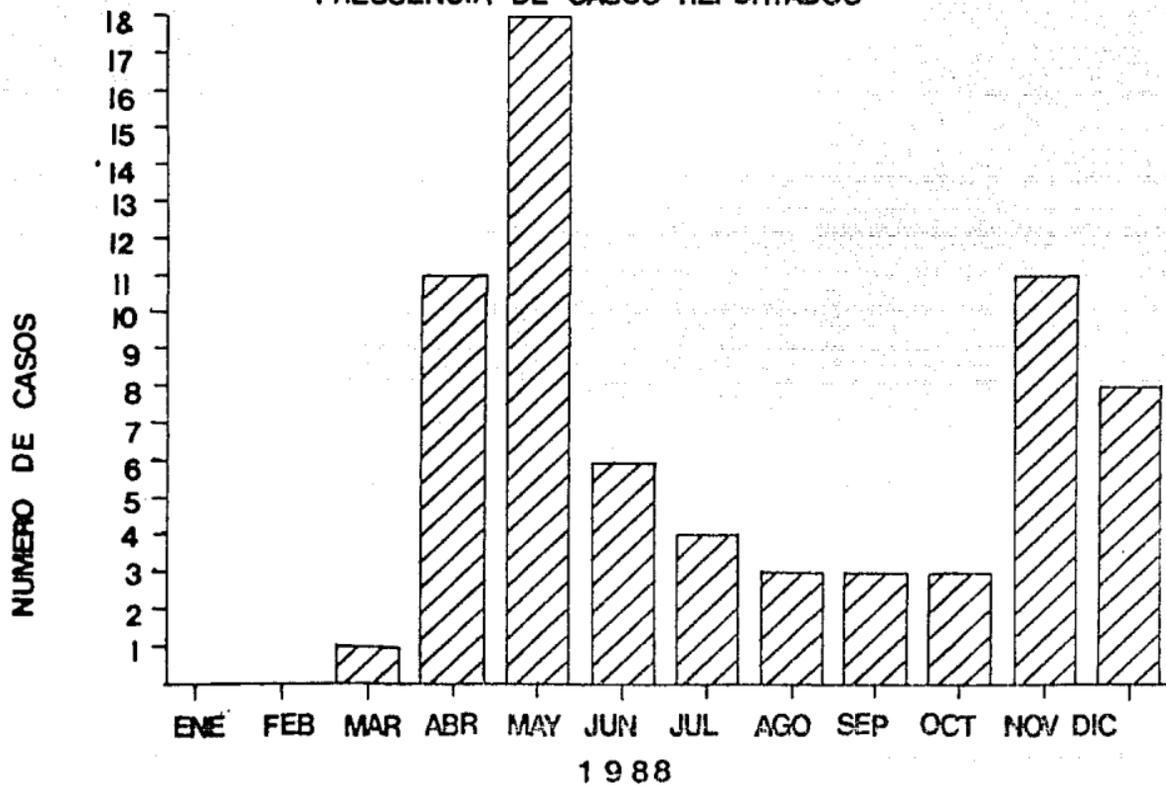
CAPITULO IV.

RESULTADOS.

Frecuencia de casos reportados en 1988.

Se realizó el estudio de un brote provocado por S. marcescens durante un año en varias Unidades del Hospital del INP. Ver gráfica 1. Se encontró que durante los meses de enero y febrero no se reportaron casos. En marzo se tiene el primer rebrote en Urgencias, y fué el único durante el mes. En abril empieza a aumentar la incidencia llegando a 11 casos, de los cuales 9 son de la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) y 2 son de Irehospitalización y de la Unidad de Infectología III. En mayo se tienen 18 casos predominando la frecuencia en la UTI (10 casos), pero también se presentó en otras unidades: Nefrología, Infectología, - Cirugía, Gastroenterología (1 caso cada uno) y Neonatología (4 casos). Junio presenta sólo 6 casos, la incidencia baja en este mes, y en la UTI se reporta un caso. Para julio ha desaparecido por completo de la UTI, y se reporta en Neonatología. En agosto, septiembre y octubre se mantiene constante, bajando lentamente en este último mes, pero aparece en la UTI. En el mes siguiente la incidencia aumenta a 11 casos, estando presentes tanto en la UTI como en Cirugía.

GRAFICA 1.
FRECUENCIA DE CASOS REPORTADOS



Sistemas de Tipificación.

De las muestras obtenidas, preferentemente sangre, se hizo la identificación del agente causal, aislándose S. marcescens de todas ellas. Para ver si fué una cebra la causante de todo el brote se ocupa un Sistema de Tipificación en el que se realizan diferentes pruebas: identificación bioquímica, biotipos, exoenzimas, sensibilidad a antibióticos y perfil de plásmidos.

a).- Identificación de biotipos:

Se obtuvieron por diferentes pruebas (tabla 1), observándose que todos los biotipos son no pigmentados, excepto uno que sirvió de control de las pruebas durante el estudio. De estos, el biotipo A₃bód tuvo 57.14% de incidencia, y el A₅ un 32.96%. Los otros biotipos obtenidos fueron menos frecuentes.

En base a esto se tabularon datos de la siguiente manera:

- Biotipos por mes (tabla 2).

Durante abril el biotipo predominante fué A₅. El A₃bód en mayo y agosto; en septiembre y octubre fueron los dos biotipos en la misma proporción. En noviembre cuando volvieron a aumentar los casos, fué el A₃bód el que imperó.

- Biotipos aislados por muestra clínica (tabla 3).

Las cepas de S. marcescens se aislaron de varias muestras clínicas: sangre, orina, de catéteres, líquido cefalorraquídeo (LCR), diversos (diálisis, líquido de oes, aspiración bronquial, duodenal, secreción ótica). Se observa el biotipo A₃bód en todas las muestras obtenidas a excepción de las de orina. No se presenta el biotipo A₅ en muestras de catéter ni de líquido cefalorraquídeo.

- Biotipos por Unidad de Servicio (tabla 4).

De las muestras obtenidas de cada paciente se aislaron varios

TABLA 1.- DETERMINACION DE BIOTIPOS

PRUEBAS	BIOTIPOS.					
	A ₃ b ⁰ d	A ₅	A ₈ ab	A ₄ ab	A ₂ b	TT
Producción de pigmento.	-	-	-	-	-	-
Reducción del tetrati- nato.	+	+	+	-	+	+
Utilización de:						
Benzoato de sodio.	-	-	-	-	-	-
m-Eritrol.	+	-	-	+	+	-
Trigonelina	+	+	+	-	+	+
Carnitina	+	+	+	+	-	-
No. de ceras.	52	30	4	3	1	1
Porcentaje de ceras.	57.14%	32.96%	4.39%	3.29%	1.09%	1.09%

TAFLA 2.- BIOTIPOS POR MES.

MES	BIOTIPOS	No. CEPAS	% CEPAS.
ABRIL	A ₃ b6d	6	6.6
	A ₅	8	8.8
	A ₈ ab	1	1.1
MAYO	A ₃ b6d	8	8.8
	A ₅	7	7.7
AGOSTO	A ₃ b6d	9	9.9
	A ₅	3	3.3
	A ₈ ab	1	1.1
SEPTIEMBRE	A ₃ b6d	5	5.5
	A ₅	4	4.4
	A ₄ ab	1	1.1
OCTUBRE	A ₃ b6d	1	1.1
	A ₅	1	1.1
NOVIEMBRE	A ₅ b6d	22	24.2
	A ₅	7	7.7
	TT	1	1.1
	A ₄ ab	2	2.2
	A ₈ ab	1	1.1

TAELA 3.- BIOTIPOS AISLADOS SEGUN EL TIPO DE MUESTRA CLINICA.

TIPO DE MUESTRA.	BIOTIPO	No. CASOS	% CASOS.
Sangre	A ₃ bód	35	38.46%
	A ₅	24	26.37
	A ₈ ab	1	1.1
	TT	1	1.1
	A ₄ ab	1	1.1
Muestras diversas	A ₃ bód	7	7.7
	A ₅	6	6.6
	A ₈ ab	1	1.1
Muestras de catéter	A ₃ bód	5	5.5
	A ₄ ab	2	2.2
	A ₈ ab	1	1.1
L.C.R.	A ₃ bód	4	4.4
Orina	A ₃ bód	1	1.1
	A ₅	1	1.1

TAELA 4.- FICHIOS POR UNIDAD DE SERVICIO.

UNIDAD	FICHIOS	No. PACIENTES.
UTI	A ₃ bód	15
	A ₅	14
	A ₈ ab	2
NEONATOS	A ₃ bód	4
	A ₅	3
	TT	1
PREHOSPITALIZACION	A ₃ bód	1
URGENCIAS	A ₅	2
INFECTOLOGIA	A ₃ bód	1
CIRUGIA	A ₃ bód	4
	A ₄	2
	A ₅	1
CONSULTA EXTERNA	A ₃ bód	1

biotipos no inmortalando en la Unidad en la que se encuentran. - Los biotipos A₂b₆d y A₅ fueron los que predominaron.

b).- Identificación de Exoenzimas (tabla 5).

El patrón enzimático fué limitado, debido a que sólo se obtuvieron dos modelos, los cuales difieren únicamente en la prueba de la elastasa. Cuatro fueron las cepas que la utilizaron.

c).- Sensibilidad a Antibióticos:

En la tabla 6 se observa que algunos antibióticos (tetraciclina, ácido nalidíxico, ceftazidime y moxalactam) inhiben a concentraciones muy bajas (\leq 0.125). La ampicilina, carbenicilina, cefalotín, amikacina, gentamicina, cloramfenicol y fosfomicina, inhiben muy poco a S. marcescens cuando llega al valor de corte.

El valor de corte es el valor resultante del promedio de la concentración sérica de un antimicrobiano y de la concentración tisular de éste haciendo pruebas in vitro con microorganismos - en dilución en tubo.

S. marcescens es sensible a la nitrofurazona inhibiéndose por completo antes de llegar al valor de corte.

Posteriormente, en la tabla 7 se observa el porcentaje de resistencia y el de sensibilidad a cada antibiótico.

La tabla 8 indica el número y la variedad de marcadores obtenidos. Los patrones que tienen ocho y siete marcadores fueron los que predominaron. Solamente el 3.26% fué resistente a todos los antibióticos excepto a la nitrofurazona.

En todos los patrones predominaron los siguientes antibióticos: cefalotín, ampicilina, carbenicilina, gentamicina, kanamicina y con menor incidencia amikacina, cloramfenicol, fosfomicina. Los demás antibióticos no fueron constantes. El moxalactam se encontró en muy baja incidencia, de ahí le siguió el cefoxitín y el ácido nalidíxico.

Tabla 5.- PATRON DE ENZIMAS.

ENZIMAS		RESULTADO.
Lecitinasa.	+	+
Hidrólisis de la caseína.	+	+
Elastasa.	+	-
Hidrólisis del tween 80.	+	+
Gelatinasa.	+	+
Dnasa	+	+
No. Cepas.	4	87

TABLA 6.- PORCENTAJE ACUMULATIVO.

ANTIBIO TICO.	CONCENTRACION (µg/ml)												
	≤0.125	0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0	10.0	32.0	64.0	≥64.0	
Amp					1.1	1.1	2.2	2.2	2.2	2.2	6.6	93.4	
Car								1.1	4.4	9.9	23.1	100	
Cef						1.1	1.1	1.1	2.2	13.2	13.2	100	
Clor				4.4	12.1	15.4	17.6	22.2	34.1	71.5	97.9	100	
Gen					2.2	2.2	2.2	5.5	13.2	34.0	49.4	99.9	
Tetr	5.5	6.6	13.2	27.5	45.1	51.7	56.1	59.4	64.9	75.9	86.9	100	
Ac. Nal	14.3	14.3	23.1	34.1	38.5	42.9	55.0	70.4	75.9	81.4	93.5	100	
Ami							2.2	9.9	27.5	46.2	90.1	100	
Cefo		1.1	8.8	20.9	40.7	50.6	77.0	83.7	83.7	84.8	98.0	100	
Ceft	12.1	12.1	12.1	16.5	18.7	19.8	23.1	39.6	52.8	64.9	79.2	100	
Kan					3.3	6.6	8.8	9.9	15.4	31.9	38.6	100	
Mox	5.5	7.7	23.1	49.5	64.9	74.8	78.1	79.2	83.6	85.8	94.5	100	
Nitr						3.3	9.9	18.7	47.3	78.1	94.6	100	
Fos							2.2	8.8	36.3	60.5	74.8	91.3	100

NOTA:

Amp Ampicilina, Car Carbenicilina, Cef Cefalotín, Clor Cloramfenicol, Gen Gentamicina, Tetr Tetraciclina, Ac. Nal Ácido Nalidíxico, Ami Amikacina, Cefo Cefoxitín, Ceft Cefotaxime, Kan Kanamicina, - Mox Moxalactam, Nitr Nitrofurazona, Fos Fosfomicina.

TABLA 7.- PORCENTAJE DE RESISTENCIA Y SENSIBILIDAD DE S. aureus cepas A DIFERENTES ANTIBIOTICOS.

ANTIBIOTICO	VALOR DE CORTE.	RESISTENCIA		SENSIBILIDAD	
		No. Cepas	%	No. Cepas	%
Cefalotín	32 μ /ml	90	98.9	1	1.1
Ampicilina	32	89	97.8	2	2.2
Carbenicilina	32	87	95.6	4	4.4
Gentamicina	8	86	94.5	5	5.5
Kanamicina	25	77	84.6	14	15.4
Amikacina	32	66	72.6	25	27.4
Cloramfenicol	25	60	65.6	31	34.1
Posfomicina	16	58	63.7	33	36.3
Ceftazidime	32	43	47.3	48	52.7
Tetraciclina	16	37	40.6	54	59.3
Ac. Nalidíxico	32	22	24.2	69	75.8
Cefoxitín	32	15	16.5	76	83.5
Moxalactam	64	13	14.3	78	85.7
Nitrofurazona	100	0	0	91	100

TABLA 8.- PORCENTAJE DE LA FRECUENCIA DE MARCADORES.

No. DE	MARCADORES												%	
													MUESTRAS.	
13	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft	Tetr	Ac.Nal	Cefo	Mox	3.26
12	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft	Tetr	Ac.Nal	Cefo		1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami		Fos	Ceft	Tetr	Ac.Nal	Cefo	Mox	3.26
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan		Clo	Fos	Ceft	Tetr	Ac.Nal	Cefo	Mox	1.09
11	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft	Tetr	Ac.Nal			1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft			Cefo	Mox	1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami		Fos	Ceft		Ac.Nal	Cefo	Mox	3.26
10	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft	Tetr				1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft		Ac.Nal			1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos		Tetr	Ac.Nal			1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos		Tetr		Cefo		1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami		Fos	Ceft			Cefo	Kox	1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan		Clo	Fos	Ceft	Tetr	Ac.Nal			1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan		Clo	Fos	Ceft	Tetr		Cefo		1.09
9	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos	Ceft					2.16
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo	Fos		Tetr				7.52
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami	Clo		Ceft	Tetr				2.16
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan	Ami		Fos	Ceft	Tetr				1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan		Clo	Fos	Ceft	Tetr				1.09
	Cef	Amp	Car	Gen	Kan		Clo	Fos		Tetr	Ac.Nal			3.26

TAELA 9.- MARCADORES POR MES.

MES	MARCADOR.
ABRIL	Car Cef Gen Kan Amp Pos Ami Clo Ac.Nal Ceft Tetr Cefo
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Ami Clo Ac.Nal Tetr
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Ami Clo Ceft Cefo Mox
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Ami Ac.Nal Ceft Cefo Mox
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Ami Ceft
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Ami
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Clo Ac.Nal Ceft Tetr Cefo Mox
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Clo Ac.Nal Tetr
	Car Cef Gen Kan Amp Pos Clo Ceft Tetr Cefo
	Car Cef Gen Kan Amp Pos
	Car Cef Gen Kan Amp
MAYO	Car Amp Cef Gen Kan Pos Ac.Nal Tetr Ceft Mox Ami Cefo Clo
	Car Amp Cef Gen Kan Pos Ac.Nal Tetr Ceft Mox Ami Cefo
	Car Amp Cef Gen Kan Pos Ac.Nal Tetr Ceft Clo
	Car Amp Cef Gen Kan Pos Ac.Nal Tetr Clo
	Car Amp Cef Gen Kan Pos Ac.Nal Ceft Mox Ami Cefo
	Car Amp Cef Gen Kan Pos Tetr Mox
	Car Amp Cef Gen Kan Pos Ceft Mox Ami Cefo
	Car Amp Cef Gen Kan Pos
AGOSTO	Car Amp Cef Gen Kan Tetr Pos Clo Ami
	Car Amp Cef Gen Kan Tetr Pos Clo
	Car Amp Cef Gen Kan Tetr Pos Ami Ceft
	Car Amp Cef Gen Kan Tetr Pos
	Car Amp Cef Gen Kan Tetr Clo Ami Ceft

MES

MARCADOR

SEPTIEMBRE Car Amp Cef Gen Kan Clo Ami Tetr Pos Cefo
Car Amp Cef Gen Kan Clo Ami Tetr Pos
Car Amp Cef Gen Kan Clo Ami Fos Ceft
Car Amp Cef Gen Kan Clo Ami
Car Amp Cef Gen Kan Clo Tetr Ac.Nal
Car Amp Cef Gen Kan Clo
Car Amp Cef Gen Kan Tetr Pos
Car Amp Cef Gen Clo Ami Ceft

OCTUBRE Cef Gen Ami Amp Car Clo Kan Ceft
Cef Gen Ami Amp Car Clo Fos
Cef Gen Ami Amp Car Clo
Cef Gen Ami Amp Kan Fos
Cef Gen Car Kan Fos

NOVIEMBRE Amp Cef Ami Car Gen Clo Kan Ceft Pos
Amp Cef Ami Car Gen Clo Kan Ceft Ac.Nal
Amp Cef Ami Car Gen Clo Kan Ceft
Amp Cef Ami Car Gen Clo Kan Fos
Amp Cef Ami Car Gen Clo Ceft Ac.Nal
Amp Cef Ami Car Gen Clo Ceft
Amp Cef Ami Car Gen Clo Fos
Amp Cef Ami Car Gen Clo Ac.Nal
Amp Cef Ami Car Gen Clo
Amp Cef Ami Car Gen Kan Ceft Pos
Amp Cef Ami Car Gen Kan Ceft
Amp Cef Ami Car Gen

MES

MARCADOR

Amp	Cef	Ami	Car	Glo	Kan			
Amp	Cef	Ami	Car					
Amp	Cef	Ami		Gen	Glo	Ceft	Pos	Tetr
Amp	Cef	Ami		Gen		Kan	Ceft	
Amp			Car			Kan		

NOTA:

Amp Ampicilina, Car Carbenicilina, Cef Cefalotín, Clor Cloramfenicol, Gen Gentamicina, Tetr Tetraciclina, Ac. Nal Ácido Nalidíxico, Ami Amikacina, Cefo Cefoxitín, Ceft Ceftazidime, Kan Kana micina, Mox Moxalactam, Nitr Nitrofurazona, Pos Fosfomicina.

La tabla 9 indica los marcadores por mes, en los que se observan varios cambios surgidos. En abril y mayo, el perfil de resistencia que predominó fué carbenicilina, ampicilina, cefalotín, gentamicina, kanamicina, fosfomicina. En agosto cambia y aumenta la resistencia a tetraciclina bajando un poco la resistencia a la fosfomicina. Para septiembre el perfil se mantiene casi constante a excepción del último marcador que cambia a cloramfenicol, quedando de la siguiente manera: carbenicilina, ampicilina, cefalotín, gentamicina, kanamicina, cloramfenicol. Octubre presenta un cambio en el perfil, debido a que hay cepas sensibles a la ampicilina y carbenicilina, pero se conserva la resistencia a otros antibióticos.

Cuando el brote aumenta de frecuencia en noviembre, hay cambios, sigue la resistencia a las penicilinas, bajando en los aminoglucósidos y cefalosporinas. Desaparece por completo la resistencia al moxalactam y cefoxitín. Esto último ocurre desde septiembre.

d).- Perfil de Plásmidos:

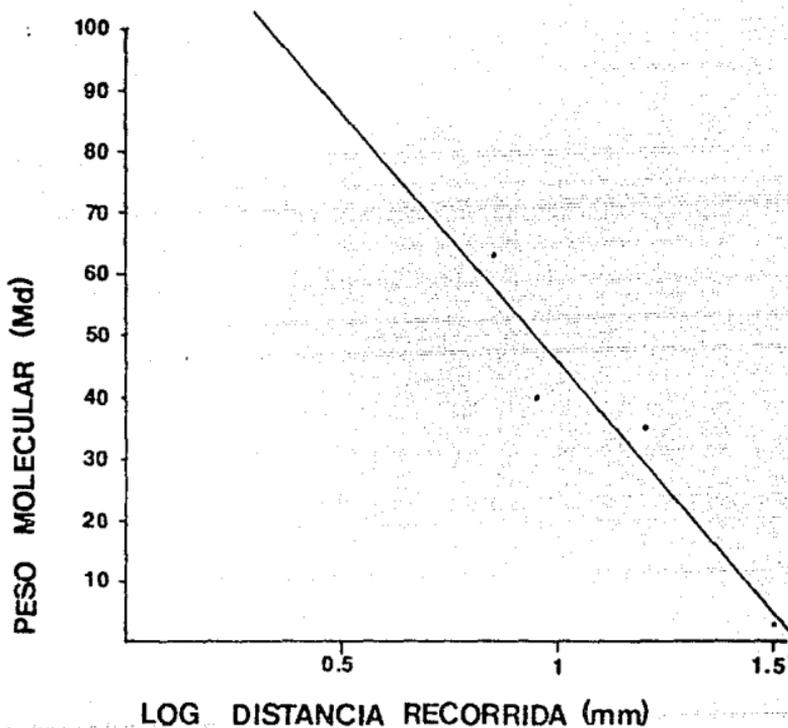
Se realizó una curva estándar (gráfica 2) con cepas con plásmidos de peso molecular conocido, por medio de electroforesis en gel de agarosa. Se midió la distancia recorrida por el plásmido.

La tabla 10 muestra la distancia recorrida por cada plásmido y el peso molecular de cada cepa de S. marcescens.

Se observa que hay muestras que contienen más de un plásmido y algunas con plásmidos iguales (tablas 10 y 11).

GRAFICA 2.

CURVA ESTANDAR DE PLASMIDOS.



P.M. Plásmidos	Log distancia
2.6×10^6	1.5
35×10^6	1.2
40×10^6	0.95
63×10^6	0.85

TABLE 10.- PLASME IONS OF RESISTENCIA.

No. Muestra	Distancia (mm)	Log Distancia	Peso Molecular (Daltons).
1	24	1.38	14×10^6
3	5	0.69	70×10^6
14	35	1.54	1.1×10^6
18	10	1.0	45.5×10^6
	28	1.44	9.5×10^6
20	30	1.47	7.0×10^6
23	12	1.07	39×10^6
24	8	0.9	53.5×10^6
	12	1.07	39.5×10^6
	15	1.17	31×10^6
	18	1.25	25×10^6
	34	1.53	2×10^6
25	33	1.5	4.5×10^6
28	8	0.9	53.5×10^6
	12	1.07	39×10^6
	15	1.17	31×10^6
	18	1.25	25×10^6
	34	1.53	2×10^6
30	5	0.69	70×10^6
	8	0.9	53.5×10^6
	13	1.11	36.5×10^6
	22	1.34	17.5×10^6
	25	1.39	13×10^6
	30	1.47	7×10^6

No. Muestra	Distancia (mm)	Log Distancia	Peso Molecular (Daltons).
38	8	0.9	53.5×10^6
54	15	1.17	31×10^6
63	15	1.17	31×10^6
68	8	0.9	53.5×10^6
	9	0.95	49.5×10^6
	36	1.55	0.3×10^6
70	24	1.38	14×10^6
71	7	0.84	58.5×10^6
	28	1.44	9.5×10^6
	37	1.56	0.4×10^6
72	15	1.17	31×10^6
	24	1.38	14×10^6
	32	1.5	4.5×10^6
	37	1.56	0.4×10^6
74	6	0.77	64.5×10^6
	10	1.0	45.5×10^6
78	31	1.49	5×10^6
80	7	0.84	58.5×10^6
	35	1.54	1.1×10^6
82.	12	1.07	39×10^6
87	5	0.69	70×10^6
	8	0.9	53.5×10^6
	13	1.11	36.5×10^6
	21	1.32	19×10^6
	30	1.47	7×10^6

No. Fuestra	Distancia (mm)	Log Distancia	Peso Molecular (Daltons).
89	5	0.69	70 x 10 ⁶
	7	0.84	58.5 x 10 ⁶
	14	1.14	34 x 10 ⁶
	24	1.38	14 x 10 ⁶
	27	1.43	10 x 10 ⁶
90	30	1.47	7 x 10 ⁶
92	7	0.84	58.5 x 10 ⁶
	10	1.0	45.5 x 10 ⁶
	12	1.08	39 x 10 ⁶
	28	1.4	13 x 10 ⁶
	34	1.53	2.0 x 10 ⁶

TAULA 11.- NUMERO DE FLASQUIDOS POR PESO MOLECULAR.

Peso Molecular (Daltons)	No. de muestras.
70 x 10 ⁶	4
64.5 x 10 ⁶	1
58.5 x 10 ⁶	4
53.5 x 10 ⁶	6
49.5 x 10 ⁶	1
45.5 x 10 ⁶	3
39.5 x 10 ⁶	2
39 x 10 ⁶	1
36.5 x 10 ⁶	2
34 x 10 ⁶	1
31 x 10 ⁶	5
25 x 10 ⁶	1
19 x 10 ⁶	1
17.5 x 10 ⁶	1
14 x 10 ⁶	3
13 x 10 ⁶	2
10 x 10 ⁶	1
9.5 x 10 ⁶	2
7 x 10 ⁶	4
5 x 10 ⁶	1
4.5 x 10 ⁶	2
2 x 10 ⁶	3
1.1 x 10 ⁶	1
1 x 10 ⁶	3
0.4 x 10 ⁶	2
0.2 x 10 ⁶	1

CAPITULO V.

ANALISIS DE RESULTADOS.

En el Instituto Nacional de Pediatría se presentó durante 1988 un brote nosocomial debido a S. marcescens, el primer reporte fué de la Unidad de Urgencias, en donde al parecer se inició durante el mes de marzo. En abril, la frecuencia aumentó, debido a que se propagó a otras unidades. Esto puede deberse a que el personal no tuvo los cuidados apropiados al pasar de una unidad a otra, como es el lavado de manos, la ropa adecuada para entrar a determinada zona, el cambio de aparatos (catéteres, nebulizadores), la limpieza adecuada en el sitio donde el enfermo se encontraba, la entrada a personas ajenas al área, etc. Durante el mes de mayo alcanzó la máxima incidencia y se obtuvo el mayor número de casos en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI). Es bien sabido que los pacientes que se encuentran en esta unidad, son muy sensibles a microorganismos oportunistas de su propia flora o del exterior. S. marcescens se ha encontrado en aire, suelo, agua y en portadores sanos (a nivel nasofaríngeo). Algún portador sano o que anteriormente tuvo contacto con un enfermo infectado con este microorganismo, puede llegar a contagiar a otros pacientes. Esta sería una de las causas del gran aumento que ocurrió en este mes.

Al tener los datos del brote, se optó por medidas de precau--

ción drásticas. Se realizaron muestreos de las manos del personal encargado de la unidad, de aparatos y de soluciones; desafortunadamente en este proceso, el personal médico y paramédico puso demasiados obstáculos, por lo que no se logró aislar al microorganismo; sólo en la madre de un niño infectado por S. marcescens, se pudo aislar de sus manos.

Debido a las medidas de higiene tomadas en los siguientes meses bajó la frecuencia (gráfica 1), pero sin desaparecer. En noviembre volvió a aumentar, pero en este caso, S. marcescens ya se encontró en otras Unidades del hospital, aunque en muy baja incidencia. Esta elevación se pudo presentar, porque las medidas de precaución no se siguieron como debe de ser.

I.- Identificación de biotipos.

S. marcescens es un agente nosocomial del que existen cepas pigmentadas y no pigmentadas. Estas últimas son de gran importancia en hospitales, mientras que los biotipos pigmentados son raramente responsables de un brote, a menos de que el paciente está muy contaminado por cantidades grandes del microorganismo.

Todas las cepas obtenidas de especímenes biológicos, fueron no pigmentadas. Se realizaron diferentes pruebas para observar qué biotipo fue el causante y si sólo se trataba de uno solo. Se observaron varios biotipos, predominando el $A_{3bód}$ y el A_5 sobre los demás. En estudios realizados en años anteriores por otros investigadores, se ha visto que los biotipos A_5 , A_8 , TCT son estrictamente de pacientes hospitalizados, mientras que los biotipos A_{3abc} y A_4 son ubicuos.

Se buscó cuál de los biotipos fue el causante del brote y se obtuvo que tanto el $A_{3bód}$ como el A_5 , estuvieron presentes desde el inicio (tabla 2). El biotipo $A_{3bód}$ imperó durante los me-

ses en los que se elevó el número de casos.

Cuando se tabularon los resultados por muestras clínicas, no se pudo establecer qué biotipo tiene preferencia por determinado sitio del organismo, se vió que de cuatro muestras de líquido cefalorraquídeo (L.C.R.) se aisló A_3 bód. Para decir que un biotipo en especial, tiene preferencia por determinada zona, se tiene que tomar en cuenta mayor número de muestras, además de que no se han reportado datos acerca de esto. La mayoría de las muestras se obtuvieron de sangre y se observaron claramente que los biotipos A_3 bód y A_5 están presentes predominando sobre otros.

Se puede concluir que no importa el sitio de donde se tome la muestra para que se obtenga un biotipo determinado. Esto quedó demostrado de manera precisa en las distintas Unidades de Servicio, ya que se obtienen en cada una de ellas diferentes biotipos.

En base a esto, puede decirse que no fué un sólo lugar en donde se originó el brote. Debido a que los biotipos son un parámetro constante de la cepa y no cambian, tuvo que haber una fuente para cada uno de ellos.

II.- Identificación de Exoenzimas.

No se observa una gran diferencia en los modelos obtenidos. Todas las enzimas probadas son características de S. marcescens. Probablemente si se realiza la identificación con otras pruebas pueda haber marcadas diferencias, pero no las suficientes para que por sí solas sirvan como modelo específico en la identificación de la cepa causante del brote.

III.- Sensibilidad a Antibióticos.

La resistencia a cefalotín y ampicilina es constante en S. marcescens. Se ha establecido que no hay un modelo uniforme de susceptibilidad. En algunos estudios se ha encontrado que es resistente a tetraciclina, cloramfenicol, gentamicina y kanamicina.

En este estudio se obtuvo que las cepas de S. marcescens son resistentes a ampicilina, carbenicilina, cefalotín, amikacina, gentamicina, kanamicina y fosfomicina, que son antibióticos muy comunes y poco empleados actualmente para el tratamiento de pacientes con enfermedades por este microorganismo.

El moxalactam, cefoxitín, ceftazidime y ácido nalidíxico muestran una gran inhibición del desarrollo de S. marcescens a concentraciones bajas. Esto puede deberse a que son antibióticos nuevos y este microorganismo no ha desarrollado todavía resistencia frente a ellos, en el caso del ácido nalidíxico, se requiere de una alta frecuencia de mutación.

Se obtuvieron los marcadores de resistencia por pruebas de sensibilidad en microplacas. Esta prueba es muy sensible, no hay un amplio rango de error como en las pruebas en disco. Son cuantitativas, el consumo de material es mínimo y los resultados se obtienen rápidamente.

Al tener los marcadores de cada cepa se observa (tabla 9) que hay una amplia variedad de ellos, es decir, se obtienen patrones de 3 a 13 marcadores, predominando los de 8 y 7 marcadores. La cepa que sirvió de control tuvo sólo dos marcadores probablemente porque se trata de una cepa que no es nosocomial, o sea, que no ha tenido contacto con antibióticos o con cepas resistentes que son las que predominan generalmente en los hospitales.

En todos los patrones predominó la resistencia a cefalotín, ampicilina, carbenicilina, gentamicina y kanamicina. En los es-

tudios que se han realizado en S. marcescens, se comprobó que la resistencia es resultado de dos eventos por separado: las alteraciones de proteínas de membrana exterior y del desarrollo de la actividad de la acetil-aminoglicosidasa (AAC'6). El contacto continuo de S. marcescens con los antibióticos puede inducir o hacer que tenga un origen cromosómico la producción de la AAC'6. Como los antibióticos antes señalados son muy comunes en su uso, S. marcescens pudo haber tenido contacto previo con ellos, llevándose a cabo alteraciones de proteínas en la membrana exterior, que impiden el paso del antibiótico al interior de la bacteria. Además, este microorganismo es capaz de producir enzimas degradadoras de algunos antibióticos, lo que hace que aumente la resistencia a ellos. También puede ocurrir que adquiera la resistencia por transferencia de plásmidos de cepas de microorganismos multirresistentes. Todos estos eventos pudieron haber ocurrido durante el brote, lo que hizo imposible su total erradicación del hospital.

En los meses en los que se elevó la frecuencia (mayo y noviembre) el suministro de antibióticos a los pacientes aumentó, en estos momentos S. marcescens elevó el número de marcadores de resistencia en comparación con los otros meses del año. Esto ocurrió por alguno de los eventos anteriormente mencionados.

En base a lo señalado, la resistencia a los antibióticos no es constante, sino que la adquiere o la cambia.

IV.- Tipificación por Plásmidos.

Se observó gran variación en la cantidad y tamaño de los plásmidos en cada muestra, lo cual hace que con el avance logrado hasta este momento, sea difícil tomar la presencia de este material genético extracromosomal como un parámetro epidemiológico

que no permita caracterizar a las cepas de este brote.

Es imposible que esto se pueda lograr a través del uso de enzimas de restricción sobre este material, así como el lograr obtener transconjugantes que permitan definir el papel de estos plásmidos, como portadores de un determinado número de marcadores de resistencia.

Se ha usado un número de sistemas tipificadores para determinar si un grupo de aislamientos bacterianos representan a una sola cepa o más de una. Estos incluyen: tipificación bioquímica, de exoenzimas, biotipos, susceptibilidad antimicrobiana, perfil de plásmidos (realizados en este trabajo), además de otros como serotipificación y tipificación por bacteriofagos. Están disponibles nuevos sistemas en los que se hacen pruebas de ADN (incluyendo derivados de fragmentos cromosomales y RNA), electroforesis de proteínas bacterianas en gel de policrilamida y modelos de endonucleasa de ADN cromosomal de restricción.

Todos estos signos son de ayuda para el conocimiento de la historia natural de las enfermedades.

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES.

- 1.- Por las pruebas realizadas en este trabajo, se puede observar que no se trató de una sola cepa, sino de varias; no importando la Unidad de Servicio o el lugar de donde se tomó la muestra, estuvieron presentes varios biotipos. La determinación de éstos fue de gran ayuda para aclarar que no se presentó en forma común en todas las áreas del hospital.
- 2.- Los biotipos A_5 y A_3ab que se obtuvieron, son de importancia nosocomial porque sólo se han aislado de pacientes hospitalizados. En cambio, los biotipos $A_3bód$ y A_4 , son ubícuos. Durante este trabajo se obtuvieron con mayor frecuencia el A_5 y $A_3bód$. Para establecer correctamente el origen debió haberse muestreado el medio ambiente, instrumental médico, soluciones, personal médico y paramédico que estuvieron en contacto con el paciente infectado y así observar si los biotipos encontrados pudieron adquirirse del medio ambiente.
- 3.- La clasificación de las cepas por medio de exoenzimas no fue útil, porque sólo se obtuvieron dos modelos en los que varía la utilización de la elastasa (87 cepas no la emplearon). Sin embargo, este hecho puede emplearse para decir que las ce

- pas de este brote fueron en su mayoría elastasa negativas.
- 4.- La sensibilidad a antibióticos y el perfil de plásmidos pue de adquirirse, así como perderse; por lo tanto, no es un parámetro constante en el que se pueda confiar para una clasificación detallada y así obtener el origen o el número de focos - infecciosos, a no ser que se empleara el análisis de enzimas de restricción sobre este material.
 - 5.- La resistencia al cefalotín, ampicilina, carbenicilina y gentamicina, fué constante para la mayoría de las cepas estudiadas. Durante los meses en los que el brote obtuvo su mayor frecuencia, aumentó la resistencia a otros antibióticos y viceversa. Por lo tanto, se observa que no es constante el perfil de marcadores de resistencia.
 - 6.- En cuanto al perfil de plásmidos, no se obtuvo un modelo adecuado en el cual basarse para una clasificación correcta - de las cepas de S. marcescens. Debe de hacerse un estudio más completo para tomarlo como un parámetro epidemiológico, esto se puede realizar por medio de la obtención de transconjugantes, con los que se observaría la obtención de cepas resistentes a determinados antibióticos.
 - 7.- De los métodos realizados en este trabajo, la identificación de biotipos fué el mejor, ya que no cambia a través de - pasos sucesivos en medios, o con el tiempo. Las otras determinaciones pueden sufrir cambios si no se realizan en el momento en que se aísla.
 - 8.- Finalmente, podemos decir que este trabajo sirve como una - pauta para trabajos posteriores, en los que se podrían obtener

ner parámetros constantes para una correcta clasificación y -
obtención de las cepas que originaron un determinado brote.

ANEXO I.

PREPARACION DE MEDIOS Y SOLUCIONES OCUPADOS:

Medio de Conservación de LIU.

Proteasa Peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Agar bacteriológico	9 g
Agua destilada	csp 1,000 ml.
pH = 7.4	

Determinación de biotipos:

A).- Utilización de la fuente de Carbono.

Agar CT.

Elementos traza.

H_3PO_4	1.96 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.0556 g
$ZnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0.0286 g
$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	0.0223 g
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0.025 g
$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$	0.003 g
H_3BO_3	0.004 g
H_2O destilada	1,000 ml
Almacenar a 4°C durante un año.	

- Solución A.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.0147 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.123 g
KH_2PO_4	0.68 g
K_2HPO_4	2.610 g
Elementos traza	10 ml
Agua destilada csp	500 ml

El pH se ajusta a 7.2 con NaOH. Esterilizar a 110°C durante 20 minutos.

- Solución B.

NaCl	7 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1 g
Agar Difco	15 g
Agua destilada	500 ml

Ajustar pH = 7.2. Esterilizar al mismo tiempo -- que la solución A.

A la solución A una vez esterilizada, se le agrega la fuente de carbono para dar una concentración final de 0.1%.

Puente de carbono:

m - eritrol	1 g
Trigonelina	1 g
Carnitina	1 g
Benzoato de sodio	1 g

Mezclar solución A y B. Vaciar en cajas petri, refrigerar.

B).- Prueba de la reducción del tetrionato.

Medio de Le Minor y col, está compuesto de:

$K_2S_4O_6$	5 g
1 ml de bromotimol (solu- ción acuosa 0.2%)	25 ml
Agua Peptonada (Peptona 10 g, NaCl 5g, agua des- tilada 1000 ml).	esp 1,000 ml

Ajustar pH a 7.4. Esterilizar por filtración. Colocar el medio en tubos de 12 x 120, para que no haya mucha superficie de contacto con el aire. En el caso de contar con microplacas agregar, una vez inoculados, aceite mineral estéril.

C).- Medio para la producción de pigmento.

Bacto peptona	5 g
Glicerol	10 ml
Bacto agar	20 g
Agua destilada	1,000 ml

Determinación de exoenzimas.

- Medio de Lipasa.

Peptona	10 g
NaCl	5 g
$CaCl_2$ hidratada	0.1 g
Tween 20	10 g
Agar	10 g
Agua destilada	1,000 ml
Ajustar pH = 7	

- Medio de caseína.

Leche descremada	5 g
------------------	-----

Agar	15 g
Agua destilada	500 ml

Esterilizar a 15 libras de presión durante 10 minutos.

- Medio de Lecitina.

Limpia un huevo con yodo, después con etanol, quitar el cascarón por la parte de la cámara de aire. Dejar la clara, conservando la yema intacta. Ésta se vacía en una probeta estéril, medir el volumen que ocupa; añadir el mismo volumen de solución salina estéril (0.85%). Guardar la solución en un frasco estéril. Preparar el agar tripticase (TSA) y adicionarle la solución anterior en la siguiente concentración: 10 ml de solución de yema de huevo + 90 ml de TSA.

- Medio para la prueba de DNasa.

Base de Agar para la prueba de DNasa	92 g
L- arabinosa	10 g
Rojo de fenol	0.05 g
Verde de metilo 1 %	1,000 ml

- Medio para la prueba de Elastasa.

Solución A.

Fosfato dipotásico	25 g
Fosfato monopotásico	25 g
Agua	250 ml

Esterilizar

Solución B

NaCl	10 g
Sulfato de hierro	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.5 g
Agua destilada	250 ml

Esterilizar

Solución C.

Klastina	10 g
Agua	100 ml
Esterilizar	

Mezclar las tres soluciones en la siguiente concentración:

Solución A	0.5 ml
Solución B	0.5 ml
Solución C	10 ml

Disolver 1.5 g de agar en 85 ml de agua.

Esterilizar a 121°C durante 15 min.

Mezclar las tres soluciones con la de agar y vaciar en cajas.

Sensibilidad a antibióticos.

- Tubo estándar de Mac Farland

BaCl ₂ 1 %	0.05 ml
H ₂ SO ₄ 1 %	9.95 ml

Corresponde a una densidad aproximada de bacterias de -
150 x 10⁶ microorganismos.

- Solución salina isotónica.

NaCl	0.84 g
Agua destilada	100 ml

Determinación del perfil de plásmidos.

- Tris 1 M

Disolver 121.1 g de Tris-base en 800 ml de agua desionizada. Ajustar pH por adición de HCl a un pH = 8.

pH deseado	Cantidad aproximada de HCl concentrado
7.4	70 ml

7.6	60 ml
8.0	42 ml

Esterilizar en autoclave.

- EDTA 0.5 pH 8

Adicionar 186.1 g de EDTA a 800 ml. Agitar vigorosamente. Ajustar pH con NaOH (aproximadamente 20 g de lentejas de NaOH). Esterilizar en autoclave.

- SDS 20%

Pesar 200 g de SDS (Dodecil sulfato de sodio) en 900 ml de agua. Calentar a 68°C para disolver. Ajustar el pH a 7.2 con HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1,000 ml.

- Solución TE.

pH = 8	10 mM Tris-Cl (pH 8).
	1 mM EDTA (pH 8).

- Tris boratos.

Solución madre 5 X

Por litro:

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
0.05M EDTA (pH=8)	20 ml

- Solución I.

	Volumen total	
	5 ml	10 ml
Lisozima (2mg/ml concentración final)	10 µg	20 mg
EDTA 0.5 M (EDTA 10 mM)	0.1 ml	0.2 ml
Tris 1 M pH 8 (25 mM)	0.125 ml	0.25 ml
Glucosa 20 % (5 mM)	222 µl	444 µl
Agua estéril, desionizada	4.55 ml	9.1 ml

Una vez preparada dejarla en baño de hielo hasta que se use.

- Solución II.

	Volumen total.	
	5 ml	10 ml
NaOH 10 N (0.2N concen- tración final)	0.2 ml	0.4 ml
SDS 20% (1% concentra- ción final)	0.5 ml	1.0 ml
Agua desionizada estéril	9.3 ml	18.6 ml

Ir agregando los reactivos en orden, de abajo hacia arriba.

- Solución III.

Disolver 3 moles de acetato de sodio en un volumen míni-
mo de agua, medir pH y ajustarlo con ácido acético gla-
cial. Llevar a un litro. Almacenar a temperatura ambiente.

Todas las soluciones se esterilizan en autoclave a 120°C du-
rante 15 minutos.

- Solución de Bromuro de etidio.

Bromuro de etidio	10,000 μ g
Agua desionizada	10 ml

- Gel de agarosa.

Agarosa	0.75 g
Agua desionizada estéril	100 ml

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Arredondo García J.L., Solorzano García F. "Importancia de la Infectología Perinatal. Infectología. 1:4-6 (1989).
- 2.- Bennett J.V.
HOSPITAL INFECTIONS.
1a. Edition.
Little Brown Co.
Washintong, D.C. (1979).
- 3.- Bergey.
BERGEY'S MANUAL OF SISTEMATIC BACTERIOLOGY.
8a. Edition.
Sans Tache William and Wilkins.
Vol. 1.
Baltimor/London (1984).
- 4.- Bouza E., García de la Torre. "Bacteremia por Serratia". -
Infectología. 8:8:405-423 (1988).
- 5.- Castañeda Narváez. "Control de Enfermedades Intrahospitalarias". Rev. Enf. Infec. Ped. 1:4:125 (1988).
- 6.- Cisneros Benavides M.E. "Sensibilidad de Enterobacteriaceae a 17 antimicrobianos". Infectología. 6:259-264 (1987).
- 7.- Farmer III, Davis B.R., Hickman F.W., MacWhorter, Huntley -
G., Carter, Asbury M.A., Conradine Riddle, Wathen-Grady, --

- Elias C., Panning G.R., Steigerwalt A.G., O'Hara C.M., Morris G.K., Smith P.E. and Brenner D.J. "Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens". J. Clin. Microbiol. 21:46 - 76 (1985).
- 8.- Farrar W.E., O'Dell N.M. " β -Lactamases and Resistance to Penicillins and Cephalosporins in S. marcescens". J. Infect. Dis. 134:245-251 (1976).
- 9.- Glono Cerezo S. "Identificación de nuevos microorganismos - en Infecciones Intrahospitalarias". Mundo Médico. 177-179 - (1989).
- 10.- Greenup P. and Blazebic D.J. "Antibiotic Susceptibilities - of S. marcescens and E. liquefaciens". Appl. Microbiol. -- 22:309-314 (1971).
- 11.- Grimont P. and Grimont P. "The Genus Serratia". Ann. Rev. - Microbiol. 32:221-248 (1978).
- 12.- Grimont P.A.D., Grimont P. and Dulong H.L.C.
THE PROKARYOTES A HANDBOOK ON HABITATS ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA.
1a. Edition.
In Star Stolp, Trupper, Balows and Schlegel (Editors).
Springer Verlag, New York (1981).
- 13.- Grimont P.A.D. Grimont P. and Dulong H.L.C. "Taxonomy of -- Genus Serratia". J. Gen. Microbiol. 98:39-66 (1977).
- 14.- Grimont P.A.D., Grimont P. and Dulong H.L.C. "Characterization of S. marcescens, S. liquefaciens, S. plymuthica and - S. marinorubra by Electrophoresis of their Proteinases". -- J. Gen. Microbiol. 99:301-310 (1977).
- 15.- Gutman L. Williamson R., Moreau N., Maric-Dominique Kitzis. "Cross-Resistance to Nalidixic Acid, Trimethoprim, and Chl_oramphenicol Associated with Alterations in Outer Membrane -

- Proteins of Klebsiella, Enterobacter and Serratia". J. ----
Infect. Dis. 151:501-507 (1985).
- 16.- Horowitz H.W., Nadelman R.B., Van Horn K.G. "Serratia plym-
thica Sepsis Associated with Infection of Central Venous Ca
theter". J. Clin. Microbiol. 25:5:1562-1563 (1987).
- 17.- Jessop H.L. "The role of Surface polysaccharide in determing
the resistance of S. marcescens to serum killing". J. Gen.
Microbiol. 132:2505-2514 (1986).
- 18.- Kamata, Yamoto T. Matsumoto K. and Maeda H. "A Serratial --
Vascular Permeability Reaction by Activation of Hageman Fac
tor Dependent Pathway in Guinea Pigs". Infect. Immun. 48: -
747-753 (1985).
- 19.- Lennette E.H.
MANUAL OF CLINICAL MICROBIOL.
3a. Edition.
American Society for Microbiology.
Washington D.C. (1980).
- 20.- Lyerly and Kreger A.S. "Importance of Serratia Protease in
the Pathogenesis of Experimental S. marcescens Pneumonia".
Infect and Immun. 40:1:113-119 (1983).
- 21.- Malone D.A., Wagner R.A., Myers J.P. and Watanakumakorn Ch.
"Enterococcal Bacteremia in two Large Community Teaching Hos
pitals". A. J. Med. 81: 601-606 (1986).
- 22.- Matsumoto K., Maeda H. "Purification and Characterization -
of four proteases from clinical isolated of S. marcescens -
kums 3958". J. Microbiol. 157:1:225-232 (1984).
- 23.- Mayer L.W. "Use of Plasmid Profiles in Epidemiologic Survi-
llance of Disease Outbreaks and tracing the transmission of
Antibiotic Resistance". J. Bacteriol. 1:228-243 (1988).
- 24.- Molla A., Matsumoto K., Oyamada, Katsukit and Maeda H. "De-
gradation of Protease Inhibitors, Immunoglobulins and other

- serum proteins by Serratia Protease and its toxicity to fibroblasts in culture". Infect and Immun. 53:522-529 (1986).
- 25.- Fleites E.B., Palau Castaño, Hernández M. Gutiérrez B. "Meningitis por S. marcescens en el I.N.P. de México". 1:6:--- 227-232 (1988).
- 26.- Ramírez Rodríguez J.M. "Identificación y manejo de un brote de Infección Intrahospitalario". Mundo Médico. 16:177:19-21 (1989).
- 27.- Sanders C. and Watanakunakorn Ch. "Emergence of Resistance to lactams, aminoglycosides, and quinolones during combination therapy for infection due S. marcescens". J. Infect.-Dis. 153:617-619 (1986).
- 28.- Schaberg Dennis R., Higsmitth A. and Wachsmith K.J. "Resistance Plasmid Transfer by S. marcescens in urine". Antimicrob Agents and Chemother. 11:3:449-450 (1977).
- 29.- Schaeffler S., Winter J. Catelli A. Greene J. and Toharski B. "Specific Distribution of R-Factors in S. marcescens Strains Isolated from Hospital Infections". Appl. Microbiol. 22:3:339-343 (1971).
- 30.- Sifuentes-Osornio J., Ruiz Palacios G. and Dieter H.M.G. -- "Analysis of Epidemiological Markers of Nosocomial S. marcescens isolates with Special Reference to the Grimont Biotyping Sistem". J. Clin. Microbiol. 23:230-234 (1986).
- 31.- Thomas F.E., Jackson R.T. Melly A. and Alford R. "Sequential Hospitalwide Outbreaks of Resistance Serratia and Klebsiella Infections". Arch Intern Med. 137:581-584 (1977).
- 32.- Traub W.H. Bacteriocin Typing of S. marcescens isolates of know serotype/group". Appl. Microbiol. 23:5:979-981 (1972).
- 33.- Traub W.H. "Continued Surveillance of S. marcescens infections by Bacteriocin Typing: Investigation of two outbreaks of Cross-Infection in an Intensive Care Unit". Appl. Micro-

- biol 23:5:982-985 (1972).
- 34.- Traub W.H., Bauer D. "Outer Membrane Protein Alteration in S. marcescens Resistant against Aminoglycoside and lactam - Antibiotics". Chemotherapy. 33:172-176 (1987).
- 35.- Traub W.H. and Raymond E.A. "Epidemiological Surveillance of S. marcescens Infections by Bacteriocin typing". J. Micro--biol. 22:1058-1063.
- 36.- Yu V.L. "S. marcescens. Historical Perspective and Clinical Review". N. Eng. J. Med. 300:16:887-893 (1979).