



00544
6
281

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE
Serratia marcescens**

PROYECTO DE INVESTIGACION

T E S I S

.Que para obtener el Diploma de:

ESPECIALIDAD EN BIOQUIMICA CLINICA

P r e s e n t a :

Q.B.P. Araceli Santos Segura

Asesor: Dr. Adolfo Pérez Miravete



México, D.F.

Nov. 1995



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.

00544

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

5
28i

INSTITUTO DE QUÍMICA
CARRERAS DE QUÍMICA Y QUÍMICA INDUSTRIAL

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE QUÍMICA
CARRERAS DE QUÍMICA Y QUÍMICA INDUSTRIAL

INSTITUTO DE QUÍMICA

00544

6

28j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

PROYECTO DE INVESTIGACION

TITULO DE LA INVESTIGACION: QUÍMICA DE LOS CARBOHIDRATOS. ESTUDIO DE LA BIODEGRADACION DE LOS CARBOHIDRATOS.

QUE INVESTIGA: ANTONIO MARTÍNEZ SAGUÁ

Asesor: Dr. Adolfo Pérez Contreras



México, D.F.

Nov. 1965

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM), bajo la dirección del Dr. Adolfo Pérez Miravete y la co-dirección de la Q.B.P. María de la Luz Ramírez Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Adolfo Pérez Miravete por haberme permitido aprender a su lado y brindarme todo su apoyo.

A los miembros del Jurado: Dra. Griselda Ma. Chávez Camarillo, Dra. Rebeca Franco, Dra. Silvia Giono Cerezo, Dr. Jesús Guzmán García y Dr. Ramón Cruz Camarillo, por su ayuda en la revisión de este trabajo.

A la Q.B.P. María de la Luz Ramírez Aguilar por su ayuda en la parte experimental de este trabajo.

A Catalina, Silvia, Lucia, Virginia, Paty, Yolanda, Mary, Irma, Rocio y Jorge por los momentos compartidos.

DEDICATORIAS

**Con todo cariño y agradecimiento por
el apoyo que siempre me han brindado**

A mis padres: Ramiro y Alicia

**A mis hermanos: Alicia, Marisa, Paz,
Rosalba, Emiliano, Juan
Manuel y Ramiro.**

INDICE

	Pag
1.0 RESUMEN	1
2.0 INTRODUCCION	
2.1. Antecedentes historicos	3
2.2. Características generales de <u>S. marcescens</u>	7
2.3. <u>S. marcescens</u> como patógeno oportunista	8
2.4. Objetivos	12
3.0 MATERIALES Y METODOS	
3.1. Microorganismos y su conservación	14
3.1.1. Cepas de trabajo	14
3.1.2. Cepa de referencia	14
3.1.3. Conservación de cepas	16
3.2. Hospedero experimental	16
3.3. Preparación del inóculo	16
3.4. Determinación de DL ₅₀	17
3.5. Búsqueda de órgano blanco	17
3.6. Medios de cultivo	18
3.6.1. Medio sintético basal	18

3.6.2.	Estudios cineticos del crecimiento y la la actividad proteolítica	19
3.7.	Determinación de proteasas por el método de Kunitz	20
4.0	RESULTADOS	
4.1.	Determinación de DL_{50} en un modelo experimental de ratón	21
4.2.	Determinación de la actividad proteolítica en cepas de <u>S. marcescens</u>	23
4.3.	Determinación del crecimiento de las cepas de <u>S. marcescens</u>	25
4.4.	Busqueda de órgano blanco en un modelo experimen tal de ratón por infección de <u>S. marcescens</u>	27
5.0	DISCUSION Y CONCLUSIONES	36
6.0	BIBLIOGRAFIA	40

1. RESUMEN

Serratia marcescens es un bacilo Gram negativo que ha venido adquiriendo mayor importancia como patógeno oportunista en infecciones nosocomiales, y aunque los mecanismos de virulencia en esta especie bacteriana aún no están bien establecidos, se conoce que de la serie de exoenzimas que produce, las proteasas son capaces de producir neumonía en animales de laboratorio.

En este trabajo se pretende conocer algo más sobre la relación existente entre la actividad proteolítica del microorganismo y el daño causado por el hospedero. Para ello se realizó una selección de las cepas que aparentemente presentaron una mayor virulencia clínica y se procedió a evaluar el efecto nocivo del microorganismo en un modelo animal experimental, además de que paralelamente se determinó la capacidad proteolítica de estas cepas, usando un medio sintético con gelatina, con objeto de conocer si las cepas más proteolíticas son las más patógenas. Sin embargo esta relación no se logró establecer, lo que hace pensar que las proteasas no son los únicos determinantes en el efecto producido en el animal.

La realización de una cinética de crecimiento permitió confirmar que la producción de proteasas está asociada al crecimiento de la bacteria.

Otra parte del estudio se enfocó a la búsqueda del órgano blanco. Se encontró que puede producir daño en ojos, corazón, hígado y riñón, siendo este último el más frecuentemente afectado. Se observó también una irregularidad en la respuesta y la aparición tardía de lesiones, lo que puede poner en evidencia una heterogeneidad de huéspedes que escapó a nuestro método de selección de los mismos.

2. INTRODUCCION

2.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

Antes de ser descrita y estudiada como bacteria, Serratia marcescens fue reconocida por su pigmento rojo característico (prodigiosina) que dio lugar a una serie de mitos y leyendas. En 1773, Otto Mueller la designó como perteneciente al género Vibrio y Lienk en 1809 como del género Polyangion, pero el nombre de Serratia marcescens le fue dado por Bizio en 1823. En distintas épocas se le ha encontrado ampliamente distribuída en alimentos, especialmente en aquellos que contienen almidón, en los cuales fácilmente se estimula la producción del pigmento rojo sangre. Este pigmento influyó en la historia de una manera muy importante; en el siglo VI a.c. originó ciertas creencias, sobre la aparición de "sangre milagrosa" en frijoles cocidos y serenados por varias noches, lo que hizo pensar a Pitágoras que las almas reencarnaban en diferente materia orgánica. Se cuenta también sobre la aparición de pan "ensangrentado" en los años 581, 1091 y 1093 en Alemania y Bélgica, refiriéndose que los enfermos que habían comido dicho pan, padecían de la enfermedad conocida como "fuego de San Antonio" (8, 18). En los años de 1198 a 1201 en Italia y Alemania, durante ceremonias religiosas se decía que el pan se trans -

formaba en carne sangrante. Estas creencias permanecieron hasta el año de 1264, siendo de tal importancia histórica que Rafael en 1508 decoró el Vaticano con una pintura conocida como "El milagro de Bolsena" (8, 15,35).

No fué sino hasta principios del siglo XIX que el fenómeno fué estudiado desde el punto de vista científico, tratando de explicar la aparición de "sangre" en alimentos durante un verano húmedo y caliente. Pietro Melo fué el primero en dar una explicación lógica a la supuesta aparición de "sangre" en el alimento de un niño, cuya enfermedad era atribuida a hechizos. Melo interpretó el fenómeno como una fermentación espontánea, la cual se entendió más tarde a los poblados cercanos a Padua, a principios del mes de agosto de 1819, época de verano, y fué observada sobre todo en alimentos ricos en almidón (8, 10,23).

Bizio fué otro investigador que en forma cuidadosa estudió el desarrollo de dicha coloración en un medio de cultivo sólido, encontrando que era debida a la actividad de pequeños corpúsculos redondos, cuya multiplicación dependía de la humedad y la temperatura. Tales gérmenes no pertenecían a los conocidos como algas u hongos.

El mismo autor estudio el efecto del alcanfor, aceite de aguarras y vapores de azufre sobre la sobrevivencia del microorganismo, al que llamó en 1823 Serratia marcescens, en honor a Sera

fino Serrati, físico italiano considerado el inventor del barco de vapor, en tanto que marcescens viene de la palabra latina "decaer", refiriéndose al hecho de que la coloración roja disminuía rápidamente. Al estudiar el pigmento encontró que era soluble en alcohol e insoluble en agua, y al intentar emplearlo para teñir lana y seda observó que desaparecía por efecto de la luz (8, 10, 15, 35).

La designación de S. marcescens dada en 1823 no tuvo mucha fortuna, puesto que en 1886 Flugge la llamó Bacillus prodigiosus, de ahí derivó el nombre de prodigiosina para el pigmento. Las diferentes designaciones consignadas en la Tabla I reflejan las discrepancias en cuanto a la morfología microscópica y comportamiento bioquímico observado, y desde luego, el gran desconocimiento del trabajo de Bizio realizado en 1823. Hasta un siglo después, en el Manual Bergey, vuelve a emplearse el nombre de S. marcescens (5).

La clasificación actual (Bergey's Manual, 8^a Ed, 1984) de este microorganismo es:

PARTE: Bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo.
FAMILIA: Enterobacteriaceae.
TRIBU II: Klebsielleae.
GENERO IX: Serratia
ESPECIE: Serratia marcescens

TABLA I DIFERENTES NOMBRES QUE SE HAN ASIGNADO
A LA BACTERIA Serratia marcescens

SINONIMOS	AUTOR	FECHA
<i>Serratia marcescens</i>	BIZIO	1823
<i>Zoogalactina imetrofa</i>	SETTE	1824
<i>Mucor sanguineus</i>	DE COL	1824
<i>Protococcus imetrophus</i>	MENEHINI	1936
<i>Monas prodigiosa</i>	EHRENBERG	1849
<i>Palmella prodigiosa</i>	MONTAGNE	1853
<i>Micraloa prodigiosa</i>	ZANARDINI	1853
<i>Bacteridium imatrophus</i>	SCHROETER	1872
<i>Micrococcus prodigiosus</i>	COHN	1872
<i>Micrococcus imetriphus</i>	TREVISAN	1879
<i>Bacillus prodigiosus</i>	FLUGGE	1886
<i>Bacillus imetrophus</i>	TREVISAN	1887
<i>Bacillus marcescens</i>	DE TONI - TREVISAN	1889
<i>Bacterium prodigiosum</i>	LEHMANN - NEUMAN	1896
<i>Coccobacterium sp</i>	SCHIDT - WEIS	1902
<i>Liquidobacterium prodigiosum</i>	ORLAN - JENSEN	1909
<i>Dicrobacterium prodigiosum</i>	ENDERLEIN	1917
<i>Erythrobacillus prodigiosum</i>	WINSLOW et al.	1920
<i>Salmonella marcescens</i>	PRIBAM	1929
<i>Salmonella prodigiosa</i>	PRIBAM	1929
<i>Chromobacterium prodigiosum</i>	TOPLEY - WILSON	1929

Tomado de (8,10)

2.2. CARACTERISTICAS GENERALES DE S. marcescens

S. marcescens es un bacilo corto Gram negativo, móvil, licua la gelatina, crece en medio de citrato de Simmons y en caldo con KCN, descarboxila la ornitina y la lisina, y es anaerobio facultativo. Algunas cepas son capaces de producir el pigmento prodigiosina con diferentes concentraciones que dan tonos que van desde el rosa pálido hasta el rojo, (5, 35). Varios autores aprovechan su capacidad de producir exoenzimas como la DNAasa y lipasa para diferenciarla del resto de las enterobacterias (2, 20, 26, 27). Posee una gran estabilidad genética, no tiene requerimientos nutricionales especiales y es extremadamente adaptable a crecer en cualquier medio por su potencialidad de producir una serie de exoenzimas como: proteasas, quitinasas, esterases, etc.(11,14,24).

La identificación de las cepas se puede hacer por reacciones bioquímicas y pruebas adicionales como: producción de bacteriocinas, tipificación serológica o lisis por fagos. La biotipificación en base al esquema de Grimont (asimilación de carbohidratos, producción de pigmento y reducción de tetratonato) describe 7 biogrupos (A1, A2/6, A3, A4, A5/8, TCT y Auxotrofas) y 19 biotipos (16,30).

2.3. S. marcescens COMO PATOGENO OPORTUNISTA

S. marcescens es una enterobacteria que tradicionalmente había sido asociada a infecciones de artropodos y plantas, y se consideraba como un comensal de vida libre, no patógeno para el hombre; sin embargo ha ido adquiriendo mayor importancia como patógeno oportunista causante de infecciones intrahospitalarias. Este microorganismo ataca de preferencia a individuos que presentan factores de riesgo como: deficiencias inmunológicas, discracias sanguíneas, irradiaciones y en general cualquier tipo de inmunocompromiso (6,34). En infecciones nosocomiales es causante de septicemias, bacteremias, neumonias y meningitis, todas con una elevada tasa de letalidad (12,34); la mayoría de las infecciones son adquiridas en forma intrahospitalaria a través de cateteres de uso intravenoso o urinario, cánulas endotraqueales y otros dispositivos de terapia inhalatoria (1,6).

La amplia distribución de S. marcescens indica que presenta un potencial de supervivencia y adaptabilidad elevados, además de una gran capacidad para utilizar una amplia variedad de nutrientes. Este potencial es claramente expresado por su habilidad de sobrevivir bajo condiciones extremas, como son: el desarrollo en soluciones antisépticas y aún en agua bidestilada (31).

Los mecanismos de patogenicidad de este microorganismo aún

no están bien establecidos, pero se conoce que presenta: fimbrias, producción de hemolisinas, hidrofobicidad superficial (permite la adherencia bacteriana a la mucosa) y producción de proteasas, que al parecer están relacionadas con la producción de neumonía en animales de laboratorio. Tales enzimas activan el factor de Hageman y, como consecuencia, se aumenta la permeabilidad vascular (37,29). Otro factor que se suma a los antes mencionados, es la aparición de cepas resistentes a los agentes antimicrobianos como aminoglucósidos y beta-lactámicos. Dicha resistencia se debe a la presencia de enzimas modificadoras como betalactamasas y aminoglicosidasas (acetilantes, adenilantes, fosforilantes, etc.) y por la capacidad de modificar la barrera de permeabilidad; lo cual permite el desarrollo de cepas multiresistentes, que ejercen una presión selectiva en el ambiente hospitalario con predominio de estas cepas (3,13,32).

En México son pocos los trabajos realizados de tipo médico bacteriológico sobre S. marcescens; en una buena parte de estos trabajos publicados, las cepas han sido aisladas dentro de los hospitales y corresponden a variantes no pigmentadas, lo que dificulta su identificación rápida, ya que puede confundirse con otras enterobacterias como Enterobacter.

En un estudio muy amplio realizado en el hospital Infantil del DIF (Actual Instituto Nacional de Pediatría), con población -

infantil, desde lactantes hasta adolescentes, se analizaron 20199 muestras clínicas procedentes de exudados faríngeos, nasales, óti cos, vaginales, sangre, orina, leche materna, secreciones de heri das, instrumentos quirúrgicos, catéteres, así como cultivos de lí quido cefalorraquídeo (L.C.R.). Algunas de sus conclusiones indi can que aislaron 79 cepas de S. marcescens (39 pigmentadas y 40 no pigmentadas), procedentes de 57 pacientes atendidos tanto en - consulta externa como hospitalizados. La sensibilidad de los anti bióticos determinada por la técnica de Kirby-Bauer mostró que am - bos tipos de cepas eran resistentes a tetraciclina, ampicilina y gentamicina (10).

Otro trabajo fué el que llevó a cabo Borjas y Serrano a fi nes de 1978 en el Laboratorio de Bacteriología General del Hospi tal Infantil de México (HIM), con población Infantil, realizando aislamientos frecuentes de un microorganismo cuyas característi - cas hacían sospechar que fuera Serratia sp. A 200 de estos aisla mientos se les practicaron bioquímicas completas, obteniéndose co mo resultado la identificación de 160 cepas de S. marcescens y 40 de Enterobacter sp (4). Ante estos resultados se consideró - que el personal de laboratorio y médico que labora en hospitales debería ser más acusioso en la búsqueda o identificación de este microorganismo.

En otro trabajo realizado en octubre de 1985 se describe

un brote de bacteremias primarias nosocomiales (BNP) causado por S. marcescens en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán (INNSZ). Se realizaron 21 aislamientos clínicos de diferentes muestras (sangre, secreciones bronquiales, Líquido peritoneal y otros) que fueron - identificados con API-20E y tipificados por el método modificado de Grimont; se realizó sensibilidad antimicrobiana por el método de microdilución, encontrando que el biotipo más frecuente fué - A8b y el patrón que presentó fue de resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol y tobramicina (33).

En febrero de 1987, se presentó un brote de este mismo microorganismo en un servicio de neonatología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIM); en el que se detectaron 23 pacientes con septicemia, 14 de éstos desarrollaron meningoencefalitis, aunque también se presentaron otras infecciones como: conjuntivitis, abscesos dérmicos y neumonía. El microorganismo se aisló de punta de catéter, sondas nasogástricas y de cultivos realizados - de las manos del personal, lo que hizo sospechar que la vía de - transmisión de paciente a paciente fue a través de las manos del personal. Los tractos gastrointestinales y respiratorio de los - propios niños infectados y colonizados resultaron ser el reservorio más importante (17).

Esta investigación demuestra que S. marcescens es un -

agente potencialmente patógeno que puede ser responsable de infecciones graves en poblaciones susceptibles a la infección; por tal motivo es importante conocer las características de la relación huésped-parasito; bajo que condiciones se establece y si alguna de sus exoenzimas se ve involucrada en dicha relación.

Los primeros estudios en esta dirección se han realizado con cepas de S. marcescens de origen clínico aisladas en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, durante el año de 1992; a dichas cepas se les practicaron pruebas bioquímicas para confirmar su identidad y posteriormente se realizó su biotipificación, además de un perfil enzimático en donde se determinaron una serie de exoenzimas como son: proteasas, quitinasas, quitobiasas, esterases y nucleasas (25, 28).

La revisión bibliográfica mostró que casi no hay información sobre la relación huésped-parásito de S. marcescens, por lo tanto, la presente investigación se enfoca en esta dirección, con los siguientes objetivos.

2.4. OBJETIVOS

2.4.1. Seleccionar las cepas que aparentemente presenten una mayor virulencia clínica, aisladas de productos biológicos durante el año de 1992.

- 2.4.2. Determinar para cada una de las cepas la dosis letal al-50 por ciento (DL_{50}) en un modelo animal experimental.
- 2.4.3. Paralelamente evaluar la actividad proteolítica que presentan las cepas a ensayar y correlacionarlo con su patogenicidad clínica.
- 2.4.4. Búsqueda del órgano blanco en el modelo animal experimental.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MICROORGANISMOS Y SU CONSERVACION

3.1.1. CEPAS DE TRABAJO

En el presente trabajo se utilizaron 9 cepas clasificadas en principio como S. marcescens, procedentes de aislamientos clínicos efectuados en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez", durante 1992. Las características de las cepas se resumen en la Tabla II.

Es importante aclarar que la cepa 301-H, se incluyó con el propósito de comparar el comportamiento de una cepa de reciente aislamiento con las cepas mantenidas en el cepario.

3.1.2. CEPA DE REFERENCIA

Se utilizó la cepa de Serratia marcescens Wf, mutante - apigmentada, altamente quitinolítica y proteolítica, donada por el laboratorio de Enzimas Microbianas de la ENCB-IPN.

TABLA II SELECCION DE CEPAS DE APARENTE MAYOR VIRULENCIA CLINICA				
CLAVE	FUENTE DE AISLAMIENTO	MOGRUPO Y BIOTIPO	PATRON DE SUSCEPTIBILIDAD POR MIC. AK, QM, CFZ	EVOLUCION DE CASOS
86-D	BRONCOASPIRADO	A5/B-ABB	S. S. S	DEFUNCION POR CHOQUE SEPTICO
182-H	HEMOCULTIVO	A2/B-ABA	S. S. S	INSUFICIENCIA RENAL CRONICA, LUPUS ERMEMATOSO, DEFUNCION
253-D	ABSCESO	A5/B-ABA	R. R. S	DEFUNCION POR CHOQUE SEPTICO
254-H	HEMOCULTIVO	A3-A3c	R,R,S	INSUFICIENCIA CARDIACA EGRESO POR MEJORIA
386-D	ABSCESO	TCT-TC	R. R. S	DEFUNCION POR CHOQUE SEPTICO
577-D	ABSCESO	A5/B-ABA	R. R. S	ENF. GRANULOMATOSA DEFUNCION POR CHOQUE SEPTICO
632-D	OCULAR	AUXOTROFA	R. R. S	EGRESO POR MEJORIA
969-D	BRONCOASPIRADO	A5/B-ABB	S. S. S	CARDIOPATIA CONGENITA BRONCONEUMONIA EGRESO POR MEJORIA
301-H	HEMOCULTIVO	---	---	----

DE RECIENTE AISLAMIENTO (1994)

3.1.3. CONSERVACION DE LAS CEPAS

Las diferentes cepas se sembraron por estría en placas de agar tergitol y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. De una colonia típica se hizo resiembra en viales conteniendo medio inclinado de agar simple y se incubó a 37 °C/24 horas. Se conservaron a temperatura ambiente, haciendo las resiembras periódicas necesarias, para contar siempre con bacterias frescas y viables.

3.2. HOSPEDERO EXPERIMENTAL

Se emplearon ratones machos con un peso aproximado de 20 a 30 g, de 3 a 4 semanas de edad, de la cepa NIH, procedentes del Bioterio de los Laboratorios Nacionales de Salud, SSA.

3.3. PREPARACION DEL INOCULO

El inóculo fue preparado a partir del crecimiento de la bacteria después de 18 horas de incubación. Se ajustó a una concentración previamente establecida (10^8 UFC/ml) y partiendo de esta se realizaron diluciones en caldo Mueller-Hinton. De cada

dilución se hicieron lecturas en el espectrofotómetro a 540 nm y cuenta viable en placa.

3.4. DETERMINACION DE DL₅₀

De las diluciones 10^8 a 10^4 se inocularon 0.5 ml por vía endovenosa (vena caudal) a un grupo de 6 ratones por dilución. A las 24 horas se anotó el número de ratones vivos y muertos obtenidos en cada caso, a los animales muertos se les practicó la autopsia; las observaciones se mantuvieron por 10 días. Este procedimiento se repitió para las 9 cepas de trabajo.

El análisis de los resultados se hizo por el método de Reed-Muench.

3.5. BUSQUEDA DE ORGANO BLANCO

Se inoculó 0.5 ml de cada una de las diluciones 10^8 y 10^7 por vía endovenosa a un grupo de 6 ratones para cada dilución de las cepas 301-H, 192-H, 577-D y la de referencia. Se realizó la autopsia de 2 ratones por cada dilución a las 24, 72, 144 y 288 horas, procediendo a extraer en condiciones de esterilidad el ri

hígado y bazo, los cuales fueron pesados y triturados en agua destilada estéril para obtener una suspensión homogénea y poder hacer cuenta viable en placa. El peso del órgano se determinó por peso húmedo.

El número de microorganismos vivos en el inóculo infectante y en el tejido homogeneizado de los animales infectados, se determinó por cuenta viable; se realizaron diluciones en tubo con agua destilada estéril, sembrando cada dilución en placas de agar nutritivo. La cuenta de colonias se realizó a las 24 horas, en aquellas placas que presentaron de 30 a 100 colonias preferentemente, calculando el número total de colonias (expresado como unidades viables de Serratia) por gramo de órgano (22).

Es importante aclarar que se revisó toda la anatomía del animal y en caso de que algún otro órgano presentara lesiones, también se sembraba.

3.6. MEDIOS DE CULTIVO

3.6.1. MEDIO SINTETICO BASAL

Este fue empleado para propagación de las cepas. Su composición para 1000 ml de agua destilada es: 0.625 g de citrato diamónico; 0.250 g de glicerol, (9). Se ajustó el pH final a 7.0.

3.6.2. ESTUDIOS CINÉTICOS DEL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Las cepas seleccionadas y la de referencia se sembraron en el medio sintético basal adicionado con gelatina al 0.386 % y se incubaron a 28 °C con agitación a 180 rpm. La actividad proteolítica se determinó mediante el método de Kunitz en alícuotas tomadas a las 0, 6, 14, 18, 24 y 30 horas.

El crecimiento bacteriano se determinó espectrofotométricamente a 610 nm, en alícuotas tomadas en los tiempos ya antes mencionados.

Para asegurar que todas las cepas ensayadas se encontraran en las mismas condiciones metabólicas y fueran inoculadas en la misma proporción, se sembraron previamente en 2 períodos sucesivos de 18 horas en medio con gelatina, tomando 1 ml para inocular el mismo medio, pero fresco. Es importante aclarar que la relación utilizada entre el medio y el volumen del matraz fue de 1/5 y la proporción inóculo-volumen del medio fue 1 ml de inóculo para 25 ml de medio. Estas relaciones se conservaron para todos los casos en el presente trabajo.

3.7. DETERMINACION DE PROTEASAS POR EL METODO DE KUNITZ (19)

Se empleó caseína al 1% como sustrato, midiendo la actividad como incremento de la absorbencia a 280 nm, debido a la liberación de péptidos y aminoácidos solubles que absorben a esta longitud de onda. Una unidad de proteasa es la cantidad de enzima - que libera 1 ug de tirosina por minuto (14).

4. RESULTADOS

4.1. DETERMINACION DE DL_{50} EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATON

La DL_{50} de 9 cepas de S. marcescens seleccionadas de diferentes aislamientos clínicos se evaluó inoculando por vía endovenosa cada suspensión bacteriana de la cepa en estudio a un grupo de ratones, manteniéndolos en observación por 10 días.

En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos, en donde puede apreciarse que existen diferencias entre cada una de las cepas. La 969-D y 89-D tienen una DL_{50} más pequeña, pero en ambos casos no fue posible apreciar daño en los órganos, debido a que hay muerte a las 24 horas, por lo tanto, no se considera que exista alguna lesión característica y sólo se observó un gran congestionamiento en todos los órganos; sin embargo, en el caso de las cepas 192-H, 301-H, 254-H 253-D y 396-D que presentan una DL_{50} mayor en un exponente logarítmico, se observa la formación de abscesos principalmente en riñones, aunque en la cepa 192-H, también se localizan abscesos en hígado. En las cepas 632-D y 577-D no se observó ningún deterioro orgánico en los ratones y su DL_{50} es mayor.

TABLA III COMPARACION DE DL₅₀ EN 9 CEPAS DE *S. MURCIENSES* ESTUDIADAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATON

CLAVE	VALOR OBTENIDO DL ₅₀ UFC/ml	* DAÑO OBSERVADO EN ORGANO BLANCO
989-D	5.53×10^6	MUERTE EN 24 h CON LESIONES CONGESTIVAS GENERALIZADAS
89-D	5.57×10^6	MUERTE EN 24 h CON LESIONES CONGESTIVAS GENERALIZADAS
192-H	3.16×10^7	ABSCESO EN RIÑONES E HIGADO
301-H	3.16×10^7	ABSCESO EN RIÑON
254-H	4.43×10^7	ABSCESO EN RIÑON
253-D	2.50×10^7	ABSCESO EN RIÑON
396-D	3.16×10^7	ABSCESO EN RIÑON
632-D	3.90×10^8	N E G A T I V O
577-D	5.63×10^8	N E G A T I V O

* OBSERVADOS DURANTE 10 DIAS

4.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA EN CEPAS DE S. marcescens

Paralelamente se evaluó la actividad proteolítica extracelular de 9 cepas de S. marcescens, con la finalidad de conocer - la posible relación existente entre la actividad proteolítica y - la DL₅₀. Dicha actividad se evaluó en medio sintético con gelatina, utilizando S. marcescens Wf como cepa de referencia.

En la Fig. 1, se muestran las cinéticas de producción de - proteasas de las 6 cepas que presentaron niveles inferiores a la cepa de referencia; puede apreciarse que en un intervalo de 30 ho - ras S. marcescens Wf presenta una curva en campana, alcanzando - el máximo nivel a los valores de 13 UP/ml en 24 horas de incuba - ción, para posteriormente presentar una caída a las 30 horas.

Las cepas de aislamiento clínico ofrecen una curva aproxi - madamente sigmoide, alcanzando los valores máximos de la activi - dad a las 24 horas de incubación. La capacidad proteolítica de - las cepas en orden ascendente es 577-D, 396-D, 301-H, 253-D, - 254-H y 89-D. Ninguna de ellas produce tanta enzima como la cepa de referencia y además puede apreciarse que la actividad proteolí - tica decae a las 30 horas. Dentro de este grupo la cepa más pro - teolítica fue la 89-D que a las 24 horas dió 11 UP/ml.

En la Fig. 2, se presentan los resultados obtenidos en el

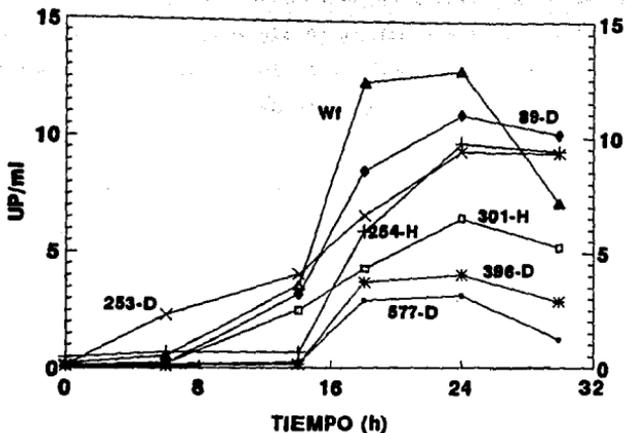


Fig. 1, Actividad proteolítica de *S. marcescens*. Se estudiaron 9 cepas, cuya actividad fue inducida en un medio con gelatina al 0.386%. En esta figura se muestran los resultados obtenidos con las 6 cepas que dieron una actividad inferior a la cepa de referencia (*S. marcescens* WF).

bloque de 3 cepas que mostraron mayor actividad que la bacteria - de referencia, la cual presenta un máximo a valores de 13 UP/ml - en un tiempo de 24 horas. Así 632-D produce aproximadamente - 16 UP/ml a las 18 horas, 969-D 21 UP/ml en el mismo tiempo y - 192-H 27 UP/ml a las 24 horas.

Puede apreciarse además que la actividad tiende a decaer a las 30 horas aún en la cepa control.

4.3. DETERMINACION DEL CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE S. marcescens

Para conocer en que fase del crecimiento microbiano se presentaba la actividad proteolítica se realizó espectrofotometricamente una curva de crecimiento de cada una de las cepas, en medio sintético con gelatina, a diferentes intervalos de tiempo.

En la Fig. 3, puede apreciarse que la cepa de referencia - (S. marcescens Wf) inicialmente presentó un crecimiento logarítmico, el cual empieza hacerse asintótico después de las 24 horas de incubación.

En el caso de las cepas de trabajo tenemos que 192-H, - 301-H, 969-D y 253-D presentaron un crecimiento muy semejante a - la cepa de referencia que es logarítmico hasta las 24 horas. Las cepas 89-D, 632-D, 254-H y 396-D tienen un crecimiento más lento.

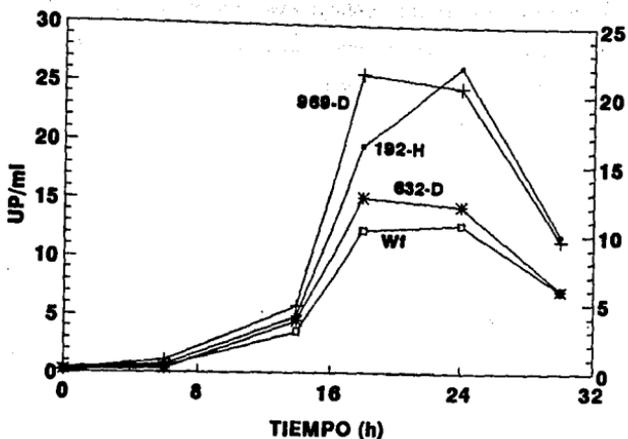


Fig. 2, Actividad proteolítica de S. marcescens. Se estudiaron 9 cepas, cuya actividad fue inducida en un medio con gelatina al 0.386%. En este caso se muestran los resultados obtenidos con aquellas cepas que presentaron mayores niveles de enzima que la cepa de referencia (S. marcescens Wf).

pero en 3 de ellas no se alcanza a observar una disminución del crecimiento aún a las 30 horas de incubación. La cepa 577-D fue la que creció más lentamente presentando una curva asintótica desde las 14 horas.

Estos resultados confirman que la producción de proteasas está asociada al crecimiento del microorganismo.

4.4. BUSQUEDA DE ORGANISMO BLANCO EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE RATON POR INFECCION DE Serratia marcescens

Se conoce que S. marcescens es un patógeno oportunista - capaz de producir daño en humanos y animales de laboratorio, tomando ésto como base, se trató de evaluar las posibilidades de colonización y el daño ocasionado a un grupo de ratones, al inocular por vía endovenosa una suspensión bacteriana (10^8 y 10^7) de S. marcescens, determinando la colonización y el daño a diferentes intervalos de tiempo. En este caso se emplean 4 cepas de S. marcescens que presentaron distinta actividad proteolítica - (192-H, 301-H, 577-D y Wf).

La Tabla IV presenta los resultados obtenidos con la cepa más proteolítica la 192-H. En este caso se aprecia que el riñón es el órgano que mayor UFC/ml presentó a las 24 y a las 72 horas.

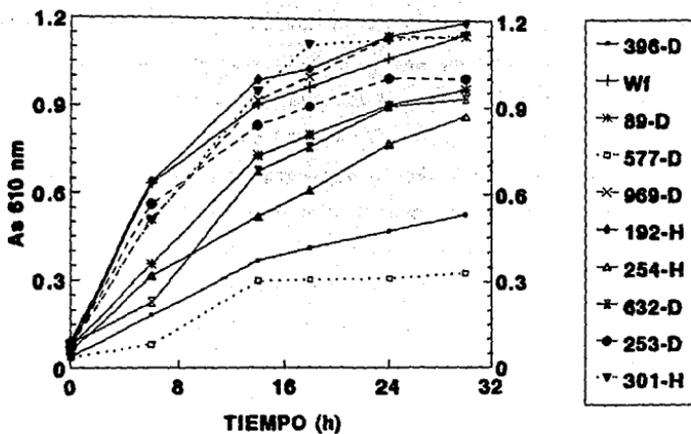


Fig. 3, Curva de crecimiento de *S. marcescens*. Se estudiaron 9 cepas, cuyo crecimiento fue inducido en un medio con gelatina al 0.386%.

El daño aquí se determinó por la aparición de abscesos, que cubren la mayor parte del órgano a las 72 horas; a las 144 y 288 horas en los ratones sobrevivientes no se observó ningún daño y la bacteria no se logró recuperar. El bazo fue el segundo órgano colonizado y por último las UFC/ml más bajas se obtuvieron en hígado, en ambos casos no se presentó ningún daño. La colonización del riñón, bazo e hígado se presentó en forma inmediata y persistió durante 72 horas con la consecuente formación de abscesos en riñón. Los sobrevivientes después de este tiempo superaron la infección y eliminaron la población infectante. Es importante mencionar que a las 72 horas un ratón presentó conjuntivitis y otro tuvo abscesos en corazón, aunque no se realizó cuenta viable en ningún caso.

La Tabla V muestra a la cepa 301-H la cual presentó una actividad proteolítica intermedia, en este caso se observó que a las 72 horas el riñón tuvo una cuenta elevada de UFC/ml, pero no se apreció ningún daño, a las 144 horas no hubo desarrollo y como consecuencia no hubo daño, pero a las 288 horas hubo desarrollo de UFC/ml al mismo tiempo que aparecieron abscesos en algunas partes del riñón. Parecería que se hubieran seleccionado formas virulentas dentro de la población inicial de baja virulencia.

En el hígado aunque las UFC/ml fueron más bajas, a las 288 horas hubo formación de abscesos; en el bazo no se localizó

**TABLA IV ENSAYO PARA BUSQUEDA DE ORGANO BLANCO EN MODELO
 EXPERIMENTAL DE RATON POR INFECCION DE
Serratia marcescens H-192**

ORGANO	INOCULO UFC/0.5ml	HORAS	UFC/g ORGANO	DAÑO OBSERVADO
RIÑON	10 ⁸	24	1.72 X 10 ⁶	NO HAY DAÑO
HIGADO	10 ⁸	24	350,000	PRESENTA ZONAS BLANQUESINAS
BAZO	10 ⁸	24	164,000	NO HAY DAÑO
RIÑON	10 ⁷	24	103,164	NO HAY DAÑO
HIGADO	10 ⁷	24	777	NO HAY DAÑO
BAZO	10 ⁷	24	16,367	NO HAY DAÑO
RIÑON	10 ⁷	72	89,765	ABSCESOS
HIGADO	10 ⁷	72	890	NO HAY DAÑO
BAZO	10 ⁷	72	12,191	NO HAY DAÑO
CORAZON	10 ⁷	72	-- --	ABSCESOS
OJOS	10 ⁷	72	-- --	CONJUNTIVITIS
RIÑON	10 ⁷	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10 ⁷	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10 ⁷	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10 ⁸	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10 ⁸	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10 ⁸	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO

**TABLA V ENSAYO PARA BUSQUEDA DE ORGANO BLANCO EN MODELO
 EXPERIMENTAL DE RATON POR INFECCION DE
Serratia marcescens 301-H**

ORGANO	INOCULO UFC/D.5ml	HORAS	UFC/g ORGANO	DAÑO OBSERVADO
RIÑON	10^8	72	1.04×10^6	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	72	7,771	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	72	8,183	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	72	888,000	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	72	11,656	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	72	4,092	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	288	2.2×10^5	ABSCESO
HIGADO	10^7	288	67,705	ABSCESO
BAZO	10^7	288	359,842	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO

ningún daño aún a los 12 días.

Los resultados de la Tabla VI muestran a la cepa 577-D fue la menos proteolítica, pero aún en este caso, el riñón tuvo la mayor colonización, sin presentar ninguna lesión.

En el bazo no hubo desarrollo y no se observó ninguna lesión.

En la Tabla VII se exhiben los resultados obtenidos con la cepa de referencia S. marcescens WF, en este caso el riñón resultó ser el más colonizado, presentando lesiones a las 288 horas, y aunque en el hígado se reportan UFC/ml no se localizaron abscesos. En el bazo no se presentó ninguna lesión. Aquí encontramos el mismo fenómeno observado con la cepa 301-H, la emergencia tardía de una población colonizante y la consecuente aparición de abscesos a las 288 horas.

La Fig. 4, muestra el porcentaje de invasión de los 3 órganos estudiados. este porcentaje es mayor en los riñones y nulo en el bazo, debido a que a lo largo del ensayo no se localizó ninguna lesión en dicho órgano.

**TABLA VI ENSAYO PARA BUSQUEDA DE ORGANO BLANCO EN MODELO
 EXPERIMENTAL DE RATON POR INFECCION DE
Serratia marcescens 577-D**

ORGANO	INOCULO UFC/0.5ml	HORAS	UFC/g ORGANO	DAÑO OBSERVADO
RIÑON	10^8	72	35,000	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	72	777	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	72	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	72	35,000	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	72	777	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	72	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^8	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO

**TABLA VII ENSAYO PARA BUSQUEDA DE ORGANO BLANCO EN MODELO
 EXPERIMENTAL DE RATON POR INFECCION DE
Serratia marcescens Wf**

ORGANO	INOCULO UFC/0.5ml	HORAS	UFC/g ORGANO	DAÑO OBSERVADO
RIÑON	10^8	24	$1,204 \times 10^6$	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	24	23,312	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	24	491,000	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	24	34,388	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	24	1,554	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	24	8,184	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^8	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
HIGADO	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	144	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	288	$2,360 \times 10^6$	ABSCESOS
HIGADO	10^7	288	196,000	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	288	52,000	NO HAY DAÑO
RIÑON	10^7	288	126,743	ABSCESOS
HIGADO	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO
BAZO	10^7	288	SIN DESARROLLO	NO HAY DAÑO

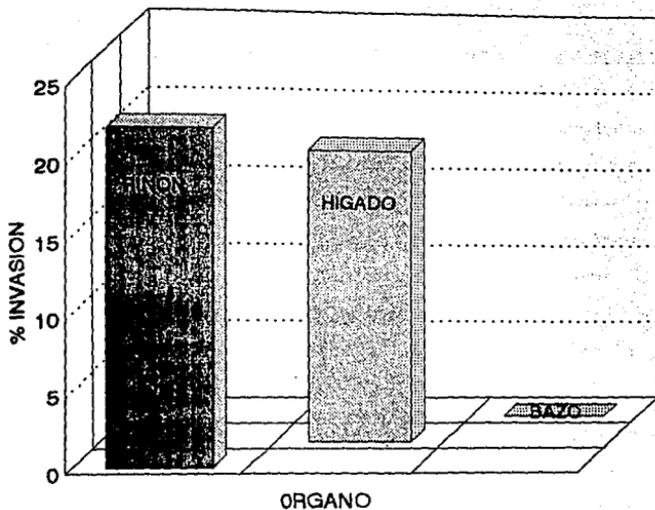


Fig. 4, Porcentaje de invasión de los tres órganos estudiados (riñón, hígado y bazo).

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Investigaciones previas han demostrado que S. marcescens es un microorganismo que presenta una gran capacidad exo-enzimática, además de ser un patógeno oportunista capaz de producir daño en humanos y animales, por lo que ha ido adquiriendo mayor importancia día a día, sobre todo en el ámbito intrahospitalario. Por lo anterior resulta de gran interés, conocer los mecanismos de patogenicidad y su posible relación existente con alguna de las exo-enzimas que produce. El experimento de David Lyerly sugiere la participación de las proteasas de S. marcescens en la producción de neumonía en ratón (21).

En este contexto el trabajo representa el inicio de una investigación tendiente a explorar la relación entre la producción de proteasas del microorganismo y el daño o muerte ocasionados en animales de experimentación. El estudio fue realizado con 9 cepas seleccionadas por su historial clínico (Tabla II) e intenta relacionar la actividad proteolítica que presenta cada cepa con su efecto nocivo en ratón, encontrando que ambos aspectos no están muy vinculados ya que se esperaba que al ir aumentando la actividad proteolítica, la DL_{50} fuera más pequeña y mayor el daño observado, esto no ocurrió en todos los casos por lo que puede pensarse que no únicamente las proteasas están involucradas en la

producción de lesiones en el animal, y que hay otro u otros mecanismos que participan en la producción de dicha lesión como son su actividad hemolítica, hidrofobicidad superficial, etc. (7,3).

Considerando que cualquier apreciación de la virulencia de un patógeno requiere la observación sobre un órgano blanco en el que se comprueba la acumulación de una población bacteriana y la consecuente lesión que ésta acarrea, se empleó la técnica de Mc. Cune et. al. (22), observándose que en todos los casos hay una colonización preferente del riñón que se manifiesta entre las 24 y 72 horas, a pesar de que en algunos casos no se muestran lesiones macroscopicamente apreciables. Posteriormente la población desaparece, o al menos disminuye hasta pasar desapercibida durante las siguientes horas, sin embargo, en las observaciones efectuadas con las cepas 301-H y Wf hay recrudescencia de la infección y la formación de abscesos lo que hace pensar que durante la fase de eclipse hubiera la selección de una cierta población de mayor virulencia.

Las observaciones anteriores nos llevan a pensar que aun que la prueba no es recomendable para cuantificar virulencia dado los resultados irregulares observados, sí evidencia la selectividad del tejido renal, en donde Serratia encuentra condiciones apropiadas para su crecimiento. La observación puede sugerir que

en casos de infección en humanos este órgano debe ser escrupulosamente estudiado.

Otro factor importante fue la elección de la población animal de experimentación, que en este caso presentó un cierto grado de heterogeneidad en la respuesta. Aún cuando esta heterogeneidad trató de restringirse al procurar que los animales utilizados presentaran el mismo peso, la misma edad e igual sexo, posiblemente existió variación en el estado fisiológico del animal, lo que dió como resultado diferencias en la susceptibilidad a la infección. Una forma de tratar de disminuir dicha variabilidad sería utilizar inmunosupresores, para tratar de abatir la respuesta inmune - hasta un mismo punto, buscando obtener una respuesta más homogénea.

En base a lo anterior puede concluirse que S. marcescens es un microorganismo capaz de producir daño tanto en animales de laboratorio como en humanos. La Tabla VIII muestra que las enzimas proteolíticas que presenta esta bacteria, pueden estar involucradas en la virulencia, debido a que ejercen un efecto exotóxico en el organismo y pueden llegar a causar en algunos casos lesiones en animales, predominando el daño en riñón; aunque también este hecho es apoyado por el efecto observado en la cepa WF, que - aún siendo una cepa de laboratorio, que ha sido cultivada por mu-

chos años en medios artificiales, también causó daño en los animales, y en este caso se habla de una cepa altamente proteolítica. Se sospecha una causa multifactorial en la producción de lesiones en la que pueden contribuir factores de virulencia como fimbrias, hemolisinas, aerobactinas y proteasas aún cuando no se conoce si es un sólo tipo de proteasas o un grupo de éstas las que están involucradas y de cuál de ellas depende su patogenicidad.

TABLA VIII COMPARACION DE TRES CEPAS <i>Serratia marcescens</i>			
CEPA	LD ₅₀	UP/ml	DAÑO OBSERVADO
192-H	3.16×10^7	27	CONJUNTIVITIS ABSCESES EN CORAZON Y RIÑON
301-H	3.16×10^7	7	ABSCESES EN HIGADO Y RIÑON
577-D	5.63×10^8	3	NO HAY DAÑO
Wf	---	13	ABSCESES EN RIÑON

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Ambrosio, R.E., A.J. Van Myk & H.C. De Klerk. 1979 Antibiotic resistant Serratia marcescens Infection in a hospital S.A. Med. J. 55: 584-587.
- 2.- Barrios Sánchez, M. 1982 Estudios bioquímicos con cepas de Serratia marcescens de origen clínico. Tesis Profesional E.N.C.B.-IPN.
- 3.- Bollman R. & E. Halle. 1989 Nosocomial infections Due to Serratia marcescens clinical findings antibiotic susceptibility patterns and fine typing. Infection 17: 294-300.
- 4.- Borjas, G.E. & P.G.D. Serrano. 1981 Aislamiento de Serratia marcescens en infecciones hospitalarias. Rev. Lat. Amer. Microbiol 23: 1-5.
- 5.- Buchaman, R.E. & N.E. Gibbons. 1984 Bery's Manual of - determinative Bacteriology. 8a. Ed. The Williams y Wilkins Co Baltimore, E.U.A.: 290-326.
- 6.- Burton, D.J. & R.B. Scheffer. 1980 Serratia infection in a patient with bilateral subcondyalar impacted third molars and associated dentigerous cysts: report of case. J. Oral. Surg 38: 135-138.

- 7.- Carbonell, V.G. & M.C. Vidotto. 1992 Virulence factors in Serratia marcescens: Cell-bound hemolysin and aerobactin - Brazilian J. Med. Biol. Res 25: 1-8.
- 8.- Carmona Huerta, C. 1980 Comparación bioquímica de cepas - pigmentadas y apigmentadas de Serratia marcescens. Tesis Profesional, E.N.C.B.- IPN.
- 9.- Castañeda-Agulló, M. 1956 Studies on the biosynthesis of - extracellular proteases by bacteria. J. Gen Physiol 89: 396-375.
- 10.- Chávez, Alvarez Y. 1977 Frecuencia de aislamiento de Serratia marcescens pigmentada y no pigmentada en población infantil. Tesis Profesional, E.N.C.B.-IPN.
- 11.- Chávez Camarillo, G. & R. Cruz Camarillo. 1984 El sistema quitinolítico de Serratia marcescens. Rev. Lat. Amer. Microbiol 26: 203-215.
- 12.- Cooper, R. & J. Mills. 1980 Serratia endocarditis Arch. Intern. Med. 140: 199-202.
- 13.- Coria Jiménez R. & C. Ortiz Torres. 1994 Aminoglycoside - resistance patterns of Serratia marcescens strain of clinical origin. Epidemiol Infect. 112: 125-131.
- 14.- Cruz Camarillo R. & M.C. García Ramos. 1968 Aislamiento y

- purificación de una proteasa extracelular de Serratia marcescens Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol. 10: 115-125.
- 15.- Cullen C. J. 1994 The Miracle of Bolsena. ASM News 60(4): 187-191.
- 16.- Grimont D. A. & F. Grimont. 1976 Biotyping of Serratia marcescens and its use in epidemiological studies. Journal of Clinical Microbiology: 73-83.
- 17.- Flores Calderón J., E. Escobedo Chávez & G. Franco del Río. 1988 Brote epidémico por Serratia marcescens en un servicio de neonatología. Bol. Med. Hosp. Infantil Méx. 45: 512-516.
- 18.- Fowler, H.W. & F.G. Fowler 1969 The works of Lucian of Samosata four volumes C. Press, Oxford, England 1905. Tomado de Gaughran, E.R.L. from superstition to science: The history of a bacterium Trans N.Y. Acad. Sci. 31: 3-24.
- 19.- Kunitz, M. 1974 Soy bean trypsin inhibitor; II general properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-310.
- 20.- Lowell, D.J.J. & D.J. Bidel. 1977 Tween 80 medium for differentiating non pigmented Serratia from other Enterobacteriaceae J. Clin. Microbiol. 2: 245-247.
- 21.- Lyerly, D.M. & A. Kreger. 1983 Importance of Serratia

- protease in the pathogenesis of experimental Serratia marcescens pneumonia. Infect. Immun. 40: 113-119.
- 22.- Mc Cune M.R., P. Dince & J.C. Batten. The effect of antimicrobial drugs on an experimental Staphylococcal infection - in mice. Ann. N.Y. Acad. Sci. 65: 91-102.
- 23.- Melo, P. 1969 Memoria sulla polente rossa. Giornals Dell - Italiana literature Del Da Río 18: 333-341. Tomado de -
Gaughrans E.R.L. from superstition to science: The history of a bacterium Trans N.Y. Acad. Sci. 31: 3-24.
- 24.- Monreal, J. & E.T. Reese. 1969 The chitinase of Serratia marcescens. Can. J. Microbiol. 15: 689-696.
- 25.- Nava Fonseca R. 1995 El perfil de enzimas extracelulares como criterio coadyugante en la identificación de Serratia marcescens. Tesis Profesional E.N.C.B.-IPN.
- 26.- Nestle, M. & M.K. Roberts 1969 An extracellular nuclease - from Serratia marcescens I purificatin and some properties of the enzyme. J. Biol. Chem. 244: 5213-5219.
- 27.- Nestle, M. & W.K. Roberts 1969 An extracellular nuclease - from Serratia marcescens II Specificity of the enzyme. J. Biol. Chem. 244 (19): 5219- 5225.
- 28.- Ramírez Aguilar M. Comunicación personal.

- 29.- Rosenberg, Mel. 1984 Isolation of pigmented and nonpigmented mutants of Serratia marcescens with reduced cell surface hydrophobicity. J. Bacteriol. 160: 480-482.
- 30.- Sifuentes Osornio J. & M.G. Ruiz-Palacios. 1986 Analysis of epidemiologic markers of nosocomial Serratia marcescens isolates with special reference to the Grimont biotyping system. J. Clin. Microbiol. 23: 230-234.
- 31.- Szewzyk V., R. Szewzyk & T.A. Stenstrom. 1993 Growth and survival of Serratia marcescens under aerobic and anaerobic conditions in the presence of materials from blood bags. J. Clin. Microbiol. 31: 1826-1830.
- 32.- Traub W.H. & D. Baver 1987 Outer membrane protein alterations in Serratia marcescens resistant against aminoglycoside and B-lactam antibiotics. Chemotherapy 33: 172-176.
- 33.- Volkow-Fernández P., S. Ponce de León-Rosales & J. Sifuentes-Osornio. 1993 Epidemia de bacteremias primarias por una cepa endémica de Serratia marcescens en una unidad de terapia intensiva. Salud Pública de México. 35: 440-447.
- 34.- Williams, T.W., J.E. Sailer, J. Viroslav, V., N. Glasgow & N. Moreland. 1971 Serratia marcescens as a postoperative pathogen. Am. J. Surg. 122: 64-69.

35.- Yu, V.L. 1979 Serratia marcescens historical perspective
and clinical review. J. Med. (England) 300: 887-893.