

00346

S
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION DE ANTIGENOS
ESPECIFICOS DE *Serratia marcescens* DE ORIGEN CLINICO.

T E S I S

Que para obtener el grado Académico de
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
p r e s e n t a

BIOL. IRMA CAÑEDO SOLARES

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. VICTOR RAFAEL CORIA JIMENEZ

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
ALLA DE ORIGEN

273660.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICO ESTE TRABAJO A

*A mi esposo Hector Luna P. y a
mis hijas Ixel e Irma Alejandra
con todo mi amor y porque son lo
más valioso de mi vida, por su
gran apoyo para lograr esta meta*

A mis padres por su apoyo incondicional

A mis hermanos y cuñadas, en memoria a Esther quien ha dejado un profundo vacío en la familia.

A mis suegros y cuñadas por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. V. Rafael Coría J. Jefe del Laboratorio de Bacteriología de la Torre de Investigación "Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría, con profundo respeto por el apoyo en la dirección de esta tesis.

Al Dr. Carlos Eslava C. Del Depto. De Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, por brindarme su apoyo en el asesoramiento para la realización de este trabajo.

Al técnico Jaime Torres M. del laboratorio de Bacteriología de la torre de Investigación "Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría por su participación para la realización de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe S. García de la Torre del Depto. De Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM por su asesoría en la estadística.

A la Dra. Ma. Cristina Sosa de Martínez del Depto. de Metodología de la Investigación.

Al Dr. Fortíno Solórzano Santos del Depto. de Infectología del Hospital Pediátrico del CMN- Siglo XXI por proporcionar los sueros de niños infectados.

Al Dr. José de Jesús Coría Lorenzo del Comité de Infecciones Hospitalarias del INP-SSa.

Al servicio del analizador automatizado del Instituto Nacional de Pediatría.

Al Depto de Informática de Medicina Experimental dirigido por el C. Carlos Alvarez García por su gran apoyo en la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Sara Frías V Subdirectora de Medicina Experimental de la torre de Investigación "Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría- SSa

Al laboratorio de Bacteriología de la Torre de Investigación "Joaquín Cravioto" del Instituto Nacional de Pediatría SSa por contribuir en mi formación y superación académica en el área de Bacteriología.

Agradezco al comité del Jurado

Dra. Cecilia Ximénez García

M.en C. Carlos Eslava Campos.

M.en C. Margarita Carmolina Ponce

M. en C. Victor Rafael Coría Jiménez

Dr. Angel Hipólito Manjarrez Hernández

Dra. Emma Isabel Melendro Lozano

Dr. Javier Torres López

INDICE

RESUMEN.....	1
1.0 INTRODUCCION.....	3
1.1 <i>Serratia marcescens</i> (Historia).....	3
1.1.1 Importancia clínica de <i>S. marcescens</i>	4
1.1.1.1 Importancia epidemiológica de <i>S. marcescens</i>	5
1.1.1.2 Aislamiento de <i>S. marcescens</i> en diversos brotes intrahospitalarios	6
1.1.2 Problemas de identificación.....	7
1.2 Métodos para la identificación y clasificación de <i>S. marcescens</i>	9
1.2.1 Biotipificación.....	9
1.2.2. Serotipificación.....	12
1.2.3 Proteínas de Membrana.....	14
1.3 Factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad.....	16
1.3.3 Proteasas.....	16
1.3.4 Hemolisinas.....	16
1.3.5 Adherencia.....	17
1.3.6 Citotoxinas.....	17

2.0 JUSTIFICACION.....	18
3.0 OBJETIVOS.....	19
4.0 HIPOTESIS.....	20
5.0 MATERIAL Y METODO.....	21
6.0 RESULTADOS.....	27
7.0 DISCUSIÓN.....	92
8.0 CONCLUSIONES.....	100
9.0 BIBLIOGRAFIA.....	101

RESUMEN

Serratia marcescens es un microorganismo oportunista, agente causal de infecciones nosocomiales de gran importancia en hospitales pediátricos.

Sin embargo, existe un subregistro de las infecciones causadas por esta bacteria por el hecho, entre otros, de no contar con un sistema de identificación y caracterización con alta especificidad accesible a cualquier laboratorio de diagnóstico.

OBJETIVO. El objetivo de este proyecto es analizar a las proteínas de membrana externa de cepas de *S. marcescens* para identificar algún componente que pueda ser utilizado como antígeno en la caracterización del microorganismo.

METODO. Se obtuvieron proteínas de membrana externa y proteínas totales de cepas de *S. marcescens* por solubilización con detergentes y ultracentrifugación diferencial, éstas se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE) y se caracterizaron por electroinmunotransferencia utilizando sueros de pacientes infectados y de individuos control.

RESULTADOS. Las cepas de *S. marcescens* mostraron una fracción proteica de aproximadamente 31 kDa la cual se observó de manera constante. Al realizar inmunotransferencia con las proteínas totales y proteínas de membrana externa se

encontró que el suero de pacientes infectados reconocían de manera constante dicha proteína. En los resultados obtenidos empleando sueros de individuos no infectados se demostró reacción con la proteína en sólo el 25% de los sueros. Al realizar el análisis estadístico se encontró que la frecuencia con que la banda de 31 kDa es reconocida por el suero de pacientes comparada con la frecuencia obtenida en individuos no infectados es distinta y estadísticamente significativa con una probabilidad de error de 0% ($p < 0.001$).

INTRODUCCION.

Serratia marcescens fue aislada y caracterizada por Bartolomeo Bizio en 1823 quien dió el nombre de *Serratia* al microorganismo en honor a Serafino Serrati. Krauf en 1902 fue el que denominó a la especie como *marcescens* del latín “que decae” lo anterior debido probablemente al pigmento fotosensible (prodigiosina) que algunas cepas elaboran (Gaughran 1969; Conrad y col 1970; Yu, L.V. 1979)

S. marcescens es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio, no esporulado, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae y a la tribu *Klebsielleae* El género *Serratia* se divide en cuatro especies clínicamente importantes *S. rabidea*, *S. odorifera*, *S. marcescens* y *S. liquefaciens* (Kelly y col. 1985).

Bertarelli en 1903 (referido por Yu, L. V. 1979) fue el primero en señalar la participación de *S. marcescens* en procesos patológicos. En 1913 Woodward y Clark describieron el primer reporte donde se encontró involucrada a *S. marcescens* en un paciente con infección pulmonar y en la década de los años 50 se reportaron algunos casos de infecciones urinarias. En 1951 en el Hospital de la Universidad de Standford ocurrió la primera descripción de infección nosocomial causada por *S. marcescens*, (referido por Yu, L. V 1979) posteriormente Rabinowitz y Shiffrin en 1952. reportaron un caso de septicemia por *S. marcescens*, más tarde en 1957 otros investigadores como Robinson y Woolle reportaron a *S. marcescens* como el agente infeccioso responsable de “pseuohemoptisis”y otros investigadores como

Patterson y col (referido por Yu, L.V. 1979) al analizar bacterias cromogénicas causantes de diversas infecciones encontraron que la mayoría correspondían a cepas de *Serratia*.

A partir de 1960 surge información referente a la participación de *S. marcescens* como un patógeno oportunista para el hombre; Mc Cormack y Kunin en 1966 (referido por Yu, L.V. 1979) encontraron que la transmisión del microorganismo se da por contaminación del ambiente, hecho que favorece la colonización de infantes y pacientes debilitados (Wilfert y col 1970, Wilhelmi y col. 1987, Williams y col. 1971)

Schaberg, R.D. y col. 1976; Grimont y Grimont 1978; Davis, J.T. y col 1970 han señalado la participación de *S. marcescens* como agente causal de infecciones nosocomiales. La importancia epidemiológica de *S marcescens* se debe también a su participación en diferentes brotes (Bollman y col. 1989; Bouza y col 1988; Lewis y col 1989; Okuda y col. 1984;Schaberg R.D y col. 1976; Saito y col. 1989; Smith y col. 1984; Yu 1979) y Conrad y col en 1970 al estudiar 176 pacientes con diferentes tipos de infecciones, en 26 de estos aislaron cepas de *S. marcescens*.

Davis, J. T. y col en 1970 aislaron 662 cepas de *S. marcescens* obtenidas de 314 pacientes el 97% de las cuales fueron aislados de tracto urinario; en otro estudio posterior realizado en Atlanta Georgia se aisló *S. marcescens* de 210 pacientes que presentaban infecciones de tracto urinario. Entre abril de 1973 y junio de 1975 en

Nashville, TN se aisló *S. marcescens* de 210 pacientes internados en diferentes hospitales, la mayoría con infecciones urinarias(Schaberg, R. D; y col. 1976)

Farmer y col en 1976 reportaron la importancia de *S. marcescens* intrahospitalaria y establecieron un modelo epidemiológico para el estudio de estas infecciones en el cual señalan que éstas son debidas a la contaminación del equipo de uso común y a la hospitalización prolongada, lo que permite la infección de pacientes susceptibles,inmunocomprometidos,pacientes de bajo peso principalmente en el area de neonatología . Farmer considera que la mayoría de las cepas de *S. marcescens* de origen clínico son apigmentadas.

En un estudio epidemiológico realizado en el período de febrero de 1987 a marzo de 1995 se aislaron 679 cepas de *S. marcescens* de 504 pacientes (reportado por Royo P. del Valle O, 1997) en este mismo año Ogtrop M.I. y col reportaron un brote en la Unidad Neonatal de Terapia Intensiva en 5 infantes de edad gestacional pretérmino de los cuales dos desarrollaron septicemia y conjuntivitis.

En 1997 Archiband, L. K. y col. estudiaron una serie de brotes relacionados con la contaminación extrínseca de detergentes y soluciones antisépticas refiriendo que existe un mayor riesgo de infecciones por la bacteria en las Unidades de Cuidados Intensivos por lo cual *S. marcescens* es considerado como un agente causal de infecciones nosocomiales de importancia creciente en hospitales pediátricos afectando principalmente a pacientes hospitalizados e inmunocomprometidos

En México también se ha reportado el aislamiento de *S. marcescens* en diversos brotes intrahospitalarios. En 1952 se describe el primer brote intrahospitalario en una sala de Pediatría aislándose *S. marcescens* de heridas, neumonías, casos graves de septicemia y meningoencefalitis (referido por Rodriguez, R. S. 1982)

En el periodo de 1968 a 1972 en el Hospital Infantil de México, se aisló *S. marcescens* de catéteres y hemocultivos. En este mismo hospital en 1978 se realizó el aislamiento de *S. marcescens* de hemocultivos de pacientes con septicemia y meningoencefalitis (Borjas, G. E. y col. 1981) En 1985 en la Unidad de Terapia Intensiva del Instituto Nacional de la Nutrición se presentó un brote asociado con infección por *S. marcescens* aislando el microorganismo de catéteres, soluciones desinfectantes y catéteres para presión venosa central (Volkow-Fernandez P. y col. 1993)

En 1988 Flores- Calderón y colaboradores en el Hospital General Gea González, en el servicio de Neonatología, describen un brote ocasionado por *S. marcescens* siendo aislada la bacteria de catéteres, exudados faríngeos, autopsias, líquido cefalorraquídeo y hemocultivos.

En el Instituto Nacional de Pediatría en los años 1988, 1989 y 1992 se presentaron brotes intrahospitalarios ocasionados por *S. marcescens* en los Servicios de Neonatología y en la Unidad de Terapia Intensiva, aislándose al microorganismo de hemocultivos, catéteres y autopsias (Coria-Jiménez y col 1994).

Así también se han presentado brotes intrahospitalarios por *S. marcescens* en el Hospital del Niño Poblano y en el Hospital “Dr. Ignacio Morones Prieto” de San Luis Potosí (Tello Zavala y col.1998. Lazo de la Vega y col. 1993). Los brotes más recientemente descritos se presentaron en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional del Siglo XXI en la Unidad de Cuidados Intensivos aislándose *S. marcescens* de catéteres, exudados faríngeos, autopsias, líquido cefalorraquídeo y hemocultivos (Coria Jiménez y col.1995; Miranda Novales y col. 1998) y en el Hospital Universitario de Puebla en 1998-1999 en la sala de Ortopedia, (M. Centeno, comunicación personal) y nuevamente en 1999 en el Hospital Infantil de México, asociada a la contaminación de una solución antiséptica (Perez-Miravete, comunicación personal).

Se considera que en nuestro medio existe un subregistro de las infecciones causadas por *S. marcescens*, lo anterior se apoya principalmente por no contar con sistemas de caracterización de la bacteria con alta especificidad y accesibles a cualquier laboratorio de diagnóstico.

Por otro lado, el mayor número de aislamientos de *S. marcescens* se realiza en los laboratorios de Bacteriología diagnóstica, en los cuales se considera como prueba definitiva para la identificación de *S. marcescens* a la producción de prodigiosina, sin embargo, una seria dificultad al respecto es el hecho de que un gran número de cepas de origen clínico no producen el pigmento característico del microorganismo

por lo que pueden confundirse en ocasiones con bacterias como *Enterobacter*, *Klebsiella*, y *E. coli*.

En un estudio realizado con 200 cepas de *S. marcescens* aisladas en el Hospital Infantil de México a fines de 1978, se observó que al practicarles un mayor número de pruebas bioquímicas el 80% de las cepas correspondían en realidad a *Enterobacter* (Borjas, G. E. y col. 1981)

Por otro lado en un reporte posterior en el cual se analizaron 323 cepas de *Enterobacter sp* de la colección del laboratorio de Bacteriología “Jorge Olarte” del Hospital Infantil de México aisladas en 1992 se encontró que el 20% de ellas eran *Serratia marcescens* y no *Enterobacter*.(Ramírez de Aguilar y col, 1997)

Existen varios métodos propuestos para la identificación y clasificación de *S. marcescens* y estos van desde los más sencillos que consideran sus características bioquímicas hasta otros más precisos como los patrones de resistencia a antibióticos, la producción de bacteriocinas, la producción de pigmento, la biotipificación, la serotipificación, la tipificación por fagos y los perfiles de proteínas de membrana externa. En el **(cuadro 1)** se presentan los brotes intrahospitalarios asociados a *S. marcescens* y reportados recientemente en México.

Biotipificación

La **biotipificación** fue propuesta por Grimont y Grimont y éste es el método más empleado para la clasificación de poblaciones grandes de *S. marcescens*. Este sistema emplea diversas pruebas bioquímicas como son la utilización de diferentes fuentes de carbono (benzoato, DL-carnitina, m-eritritol, etc.) , la prueba de reducción del tetrionato y la producción de prodigiosina lo que permiten clasificar a las cepas de *S. marcescens* en biogrupos y biotipos para realizar un análisis comparativo de poblaciones de bacterias aisladas de distintos sitios (Grimont y Grimont 1979).

Estudios de taxonomía numérica del género *Serratia* han permitido su clasificación en 7 biogrupos (A1,A2,A3,A4,A5,A6 y A8), éstos en conjunto con los patrones bioquímicos de cada uno de ellos han definido los siguientes 19 biotipos A1(a,b); A2(a,b); A3(a,b,c,d,) ;A4(a,b); A5 A6(a,b); A8(a,b,c); TCT, TT y TC.

Grimont y Grimont han considerado además la producción de pigmento definiendo los biotipos pigmentados A1a,A1b;A2a, A2b y A6a,A6b. Sin embargo también han señalado que existe variación genética de cepas de *S. marcescens* entre los diferentes biogrupos pigmentados y no pigmentados (Grimon, A.D.P y Grimon,1979).

Un estudio con cepas de *S. marcescens* de aislamientos clínicos del Hospital Pellegrin en Francia, de 1968 hasta 1975, mostró que los seis biotipos pigmentados

son raramente aislados de casos clínicos. Por otro lado 13 biotipos no pigmentados mostraron patrones particulares observándose además que estas bacterias se aislaban principalmente de infantes o del área de Neonatología.(Grimont y Grimont 1978).

Para la clasificación de *S. marcescens* se han propuesto pequeñas modificaciones al esquema de Grimont como es el caso del medio de crecimiento y el tiempo de incubación, estos cambios no tienen ninguna consecuencia al realizar la comparación de los biotipos caracterizados en otros laboratorios (Sifuentes-Osornio y col 1986).

Existen diversos estudios que han tratado de establecer los biogrupos y biotipos más comunes, en España en una investigación realizada entre 1973 y1979 el biogrupo más frecuente fue el A5/8, biotipo A8b y en Virginia, USA en 1982-83 el biogrupo más importante fue A1 y A4. (Sifuentes-Osornio y col.1986).

En México se ha realizado la biotipificación de *S. marcescens* de diferentes poblaciones clínicas aisladas en distintos periodos, en el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán con cepas aisladas en 1982 el biotipo A5/8 y biogrupo A8b fueron los más frecuentes (Sifuentes, O. y col 1986)

En el Hospital Infantil de México y el Instituto Nacional de Pediatría durante tres diferentes periodos, se reportó el biotipo A8d, el cual no había sido descrito anteriormente y que representó el 45.6% del total de cepas analizadas. Por otro

lado, el biogrupo A5/8 identificado en distintas poblaciones, resultó ser el más constantemente identificado representando el 59% de cepas aisladas de un brote de infección intrahospitalario en el Instituto Nacional de Pediatría. Otro brote ocurrido en el mismo hospital pero en diferente periodo mostró el biogrupo A8d en el 65.1 % de todas las cepas estudiadas, con esta información se puede proponer que los biotipos A8b y A8d de poblaciones de *S. marcescens* tienen un importante papel en México. (Coria-Jiménez y col 1992).

En 1998 Ramírez-Aguilar M. y col realizaron un estudio comparativo en dos poblaciones de *S. marcescens* de origen clínico (del Hospital Infantil de México y del Instituto Nacional de Pediatría) utilizando la identificación de biogrupos y biotipos de acuerdo al método de Grimont, los resultados obtenidos mostraron que en ambos Hospitales existía una diversidad poblacional, encontrando que los biogrupos mayoritarios eran A 5/8, el A2/6 y los menos numerosos son A3c, el A8a y el A8b.

En el brote de 1995 del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI el biogrupo A5/8 biotipo A8d fue el más numeroso (Miranda G. y col 1997) y en 1999 en el brote intrahospitalario del Hospital Universitario de Puebla, el biotipo A8a fue el biotipo único (Coria- Jiménez, comunicación personal).

En el (cuadro 2) se describen los biogrupos y biotipos de *S. marcescens* asociado a brotes intrahospitalarios en México.

Serotipificación

Hefferson M. y col en 1906 propusieron el uso de la tipificación serológica para realizar la clasificación de *S. marcescens*. (Michel A Gaston 1987), posteriormente en 1957 Davis y Woodward utilizando técnicas de coaglutinación en laminilla identificaron 24 antígenos somáticos O diferentes y 26 flagelares H. Más recientemente se reconoció que además de los antígenos antes referidos existen 14 variedades del antígeno capsular (K) (Michel A Gaston 1987)

Un análisis del lipopolisacárido (LPS) de *S. marcescens* mostró que el antígeno somático posee dos polímeros con diferentes unidades de repetición en los grupos terminales, un polisacárido ácido y uno neutro. Empleando ensayos de inmunotransferencia del LPS y revelando con diferentes sueros contra el antígeno O, Hezel y col mostraron que probablemente el polisacárido neutral corresponde a los antígenos O (Hezel, M. Aucken y col. 1997)

Desafortunadamente, la serotipificación empleando sueros contra el antígeno O es de uso limitado, debido principalmente a que existe una alta frecuencia de reactividad antigénica cruzada con el antígeno O14 de *E. coli* (Michel, A. Gaston 1987; Gaston, M. A. y Pitt, 1989). Lo anterior ha sugerido que probablemente antígenos capsulares u otros antígenos de superficie conducen a la reactividad antigénica cruzada no lográndose establecer el serotipo de las cepas.

Algunos investigadores (Gaston y Pitt 1989 han propuesto realizar la absorción de los sueros para obtener una mayor especificidad al identificar el antígeno O sugiriendo además el empleo de pruebas como la inmunotransferencia. Sin embargo la mayoría de los laboratorios de referencia consideran la propuesta poco práctica para la rutina de tipificación de aislados clínicos.

Hamadeh en 1990 fue el primero en proponer la caracterización de antígenos capsulares en cepas de *S. marcescens*, entre otras razones por sus características químicas, el tamaño de sus unidades de repetición, su carga de baja densidad y un alto peso molecular, así como la presencia de ácido glucurónico, ácido galácturónico, piruvato y algunos otros componentes ácidos que semejan a cápsulas de *Klebsiella sp* y *E. coli*, utilizando dichos antígenos se propuso una clasificación de 4 grupos antigénicos para el LPS y 5 grupos de antígenos K.

Aucken, H.M. y Wilkinson, S.G. en 1997 durante un estudio en el que se analizaron 29 cepas de *S. marcescens* mediante pruebas serológicas, encontraron tres tipos de antígenos K, en 12 cepas que fueron acapsuladas e identificaron 19 variedades de antígenos O y 14 tipos K, esto les permitió concluir que la tipificación mediante los antígenos de membrana externa de *S. marcescens* depende de la estructura química de la superficie de los LPS del organismo (Aucken HM, y Wilkinson SG. 1998)

Proteínas de membrana

Utilizando la electroforesis en geles de poliacrilamida se ha podido observar que se presentan hasta 12 bandas distintas de naturaleza proteica en la membrana externa de *S. marcescens* tres de ellas muy intensas con peso molecular de 42.9kDa, 34.6 kDa y 20.8 kDa (Larsen Skojol y Biedermann K. 1993)

Benz en 1988 reportó que la membrana externa contiene un número limitado de proteínas, algunas de estas proteínas las constituyen las porinas, en conjunto con éstas existen otras proteínas como las lipoproteínas que cubren funciones altamente especializadas (Braun 1975)

Malouin y col en 1990 reportaron la presencia de una proteína de 41 kDa, siendo ésta una porina de *S. marcescens*. Puig M. y col en 1993 realizando un análisis electroforético más minucioso observaron que esta proteína en realidad estaba constituida por cuatro fracciones que puede ser distinguidas en las OMPs de *S. marcescens* con pesos moleculares de 42, 40, 39 y 37 kDa referidos como Omp1, Omp2, Omp3 y OmpA respectivamente. Esta última fue descrita previamente por Cole y col 1982 y por Braun, G. y Cole 1984 (Puig y col. 1993)

Tada y Yamaguchi en 1990 empleando técnicas de solubilidad con detergentes y sonicación encontraron una proteína de membrana externa en *S. marcescens* de 47 kDa la cual disminuía cuando el tiempo de sonicación utilizado era menor, en estas condiciones se observó disminución de la proteína de 47kDa y la aparición de dos

fracciones más, una de 40 kDa y otra de 35 kDa. Mediante análisis por autorradiografía encontraron que la proteína de 47kDa y la de 40kDa son proteínas que se unen al calcio el cual es importante para la estabilización de la membrana entre LPS- proteína y LPS- fosfolípidos ya que la lisis osmótica es prevenida por las bajas concentraciones de calcio.

En otro estudio Hutsul, J., y col en 1993 reportaron mediante sistemas de inmunoquímica y biología molecular una porina de 41 kDa en cepas de *Serratia* la cual mostró relación con proteínas de membrana de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae. Esta porina resultó ser similar a las porina OmpF y OmpC de *E. coli*.

Mediante técnicas de inmunotrasferencia Gausch, J.F. y col en 1995 observaron una proteína de membrana externa (Omp4) de peso molecular de 17 kDa en cepas de *S. marcescens* la cual también está presente en otras enterobacterias, al parecer esta proteína está relacionada con la virulencia ya que se ha observado que confiere resistencia parcial contra bacteriocinas tanto en *S. marcescens* como en *E. coli*.

Recientemente Sanchez L; y col en 1997 reportaron que las porinas de membrana externa de *S. marcescens* tienen la función de osmorregulación y termorregulación para la resistencia intrínseca de los antibióticos beta-lactámicos.

Factores de virulencia de *S. marcescens*

El estudio de los mecanismos de patogenicidad de *S. marcescens* también ha adquirido gran importancia ya que es a través de su conocimiento profundo como se puede entender su participación en el daño al huésped.

Proteasas.- La producción de proteasas es un factor de virulencia importante del microorganismo tanto por su actividad citotóxica, como por su efecto supresor de la resistencia específica del huésped (Gordon, D. y col 1972; Grimont, P.A.D. 1978; Maeda, H.A. y col 1987; Molla y col. 1986; Hammer, H. 1984).

Sin embargo, investigadores como Traub, Spohr y Braun demostraron que cepas no productoras de proteasas y no invasivas, eran capaces de producir daño al huésped de igual manera que las que elaboran dichas proteasas, por lo anterior propusieron que deben existir otros mecanismos relacionados con la patogenicidad de la bacteria. En la actualidad no existe un consenso con relación al número de proteasas que produce *S. marcescens* y lo anterior tal vez se deba a que existe una gran variabilidad de dichas proteasas relacionada probablemente con las cepas estudiadas (Harstein, A. I y col 1984, Larose P.B. 1990, Lui, Y, Y1994)

Hemolisinas.- Otro factor de virulencia de *S. marcescens* es la presencia de la hemolisina dependiente del hierro, la cual está implicada en la expresión de factores de virulencia relacionados con la patogenicidad bacteriana (Poole, K. y col 1988; Keith y Volkmar 1988, Finlay y Falkow 1989). Al parecer el lipopolisacárido

tiene un papel importante en la estabilidad de la hemolisina unida a la membrana por lo que se sugiere que participa en la resistencia al suero de las cepas patógenas.

Adherencia.- Aunque se ha descrito poco sobre la adherencia o invasividad de cepas de *S. marcescens*, se sabe que el microorganismo presenta pilis de los cuales se han sugerido dos clases de adhesinas que le permiten adherirse a las células del huésped.(Yamamoto, T. Ariyoshi A, Amako K. 1985; Hejazi y Falkiner 1997)

Citotoxinas.- Hejazi, A y Falkiner, F. R. en 1997 y G. V. Carbonell y col. en 1997, utilizando cultivos de células Vero mostraron que 13 de 60 cepas de *S. marcescens* aisladas de muestras clínicas presentaron actividad citotóxica, el 92% de estas cepas se aislaron de infecciones intrahospitalarias. Aunque cinco de las cepas productoras de citotoxinas transfirieron plásmidos a *E. coli*, los plásmidos trasconjugados sólo confirieron resistencia a los antibióticos pero no la capacidad para producir citotoxinas sugiriendo que la información de dicha actividad no se encontraba en el plásmido. A pesar de los antecedentes mostrados, *S. marcescens* sigue siendo un microorganismo poco estudiado, debido entre otras razones a que no existe un método de tipificación específico que permita la identificación rápida y confiable, este problema posiblemente ocasiona que *S. marcescens* sea confundida con otras enterobacterias y su importancia como agente causal de infecciones sea subestimada.

JUSTIFICACION

Diferentes estudios epidemiológicos muestran la asociación entre infecciones hospitalarias y la presencia de *S. marcescens*, hecho que muestra la importancia de la identificación oportuna y la tipificación correcta de este microorganismo.

Existe un gran número de reportes que señalan a *S. marcescens* como agente causal importante de infecciones intrahospitalarias. También son conocidas las dificultades de muchos laboratorios para establecer su identidad, principalmente de las cepas apigmentadas de *S. marcescens*. Los procedimientos de laboratorio que existen para la identificación de la bacteria son poco específicos y algunos muy costosos o requieren de mucho tiempo para establecer la identidad del microorganismo.

Por lo antes expuesto, se hace necesario desarrollar sistemas de diagnóstico rápido que permitan realizar la identificación precisa y oportuna del microorganismo más aún si éste se encuentra asociado a una infección intrahospitalaria.

En este trabajo se propone realizar la caracterización de antígenos de la bacteria que sean específicos para el género *Serratia* con los cuales se podrían desarrollar sistemas de identificación de alta sensibilidad y especificidad y de aplicación práctica.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo es identificar antígenos de superficie de *S. marcescens* que sean específicos del microorganismo para evaluar su posible uso en el desarrollo de sistemas de diagnóstico rápido.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Obtener proteínas totales de membrana (PTM) y de proteínas de membrana externa (PME) de cepas de *S. marcescens* de origen clínico y de referencia.
- 2) Obtener proteínas totales de membrana y de membrana externa(PME) de cepas de diferentes enterobacterias (*E coli*, *Klebsiella* y *Enterobacter*)
- 3) Identificar por electroinmunotransferencia las proteínas de *S. marcescens* que pudieran ser específicas utilizando sueros de niños infectados durante dos brotes intrahospitalarios
- 4) Evaluar la especificidad de las proteínas identificadas con sueros de niños infectados, analizando por inmunoelectrotransferencia la respuesta contra dichas proteínas empleando sueros de niños no infectados.
- 5) Realizar análisis estadístico para validar resultados.

HIPOTESIS

Serratia marcescens presenta proteínas de superficie que funcionan como antígenos específicos que pueden ser utilizados para la identificación y caracterización de esta bacteria.

MATERIAL Y METODO

A.-Poblaciones bacterianas

i) Cepas bacterianas.-Se estudiaron 19 cepas de *S. marcescens* aisladas de diferentes brotes, 15 de estas cepas se aislaron en el Instituto Nacional de Pediatría en 1988, 1989 y 1992; 4 cepas en el Centro Médico Nacional Siglo XXI aisladas en 1995, así como la cepa *S. marcescens* (US-5) aislada y tipificada en Japón y una cepa de *S. marcescens* (NIMA) proporcionada por el laboratorio de Enzimas Microbianas del Instituto Politécnico Nacional. Además se incluyeron 8 cepas de Enterobacterias (3 *E. coli*, 3 *Klebsiella pneumoniae* y 2 *Enterobacter agglomerans*) aislados y caracterizados en el Hospital Infantil de México en 1997(Cuadro 3)

Las cepas se conservaron en medio de gelosa especial a 4°C hasta su uso.

B.-Sueros utilizados

1) Sueros de pacientes a los cuales se conoció con certeza el aislamiento de *S. marcescens*, obtenidos durante los brotes intrahospitalarios del Centro Médico Nacional Siglo XXI, estos sueros son de gran valor debido a que son sueros de niños neonatos de bajo peso que atraviezan por un cuadro infeccioso severo, por lo que se analizaron sólo 8 sueros, estos sueros fueron alicuotados y congelados a -20 °C para su conservación hasta su uso.

2) Sueros de individuos pediátricos no infectados, obtenidos de niños que no han

tenido antecedentes infecciosos atribuidos a *S. marcescens* y que son considerados como niños sanos de dos poblaciones, de Sonora y de Cuajimalpa de la cual contamos con 40 sueros y que fueron alicuotados y congelados a -20°C hasta su uso.

C)-Obteccion de proteínas totales de membrana. Las proteínas totales de membrana se obtuvieron creciendo la bacteria en caldo enriquecido de soya tripticasa (CASOY-SIGMA) e incubando en agitación constante a 150 rpm a 37°C durante toda la noche. El paquete bacteriano se obtuvo al centrifugar a 9000 g /10 minutos (Sorval SS-34), este paquete se lavó cuatro veces, la primera con TritonX-100 (Sigma), la segunda ocasión se lavó con Tris 20 mM pH 8, en tercera lavada se hizo con EDTA - Tris pH8 en estas ocasiones se centrifugó a 180,000 g por 45 minutos(Sorval T-865-1) a 4°C . La última lavada se hizo con SDS - Tris pH8 centrifugando a 180,000 g por 45 minutos en un rotor Sorval SW 50-1 a 4°C , al sobrenadante se le adicionaron inhibidores de proteasas como Fenil-metil maleimida, EDTA y N- metil-maleimida 100uM por cada ml del lisado (Keith Poole y col 1988).

D).-Obtencion de proteínas de membrana externa (PME).-Se creció la bacteria en caldo enriquecido (Casoy-Sigma) de 18 a 24 h a 37°C , después de la incubación se centrifugó el cultivo de 200ml que contenía aproximadamente 5×10^8 bacterias por mililitro a 9000 g /10 minutos (Sorval SS-34), se resuspendió la pastilla en 4

ml de agua destilada estéril, se sonicó el cultivo durante 3 tiempos de 30 segundos cada uno, en un sonicados (Cole Parmer sonic desintegrator) se centrifugó a 30000 g a 4°C por 10 min el sedimento se desechó y al sobrenadante se adicionó Sarkosyl al 2% (Sigma Chemical) dejando actuar por 30 minutos, se centrifugó a 80000 g X 1 hora a 4°C (Sorval SW50-1) y después de centrifugar, la pastilla se solubilizó en 200ul de SDS al 2% con Tris 20mM .(Larsen, B. S. y col. 1993)

Se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry, O.H. y col. 1951) utilizando como estándar albúmina sérica bovina (BSA).

E).-Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE). Se usó el método propuesto por Laemmli(Laemmli, U. K. 1970) utilizando geles de acrilamida al 12 %. En cada pozo se colocaron 30 ug /ml de proteína en amortiguador de carga con mercaptoetanol y se calentó a ebullición por 4 min, las condiciones de corrida fueron 200Volts, 100 mA y 30 Wats por 45 minutos, utilizando solución reguladora de corrida (Glicina, Tris base, y SDS, pH 8.3).

F).-Inmunotransferencia (Inmuno-blot) Se analizó la especificidad de las proteínas identificadas utilizando inmunodetección por el método de Towbin (Towbin y col 1979). Posteriormente a la electroforesis de las muestras se transfirieron éstas a una membrana de nitrocelulosa (Bio -Rad) las condiciones de corrida fueron 100 volts, 400 mA y 40 wats por 60 minutos;después de la transferencia, la membrana se dejó bloqueando toda la noche en leche descremada

al 5% en PBS pH 7.2 a 4°C ,se realizaron tres lavados con PBS – Tween 20 en agitación constante por 10 min. Las membranas se colocaron sobre un aplicador de multicanales (Bio- Rad) haciendo coincidir los carriles de éste en el sitio donde se encontraban los antígenos. La identificación se realizó empleando sueros a una dilución 1: 40 de niños infectados durante los brotes en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI y del Instituto Nacional de Pediatría así como sueros de niños no infectados. La membrana se incubó una hora a 37°C en agitación constante, posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBS-Tween 20, 10 minutos cada lavada, y se adicionó el segundo anticuerpo, anti- IgG humana, marcado con peroxidasa a una dilución 1: 50 y se incubó una hora a 37°C en agitación y por último se lavó tres veces con PBS- Tween 20. Para visualizar la reacción se reveló la membrana de nitrocelulosa con 4-cloronaftol y se determinó el peso molecular de cada banda midiendo las distancias de migración, obteniendo los Rf de cada banda y por interpolación en una curva estándar.

G).-Análisis de conglomerados.-También se analizaron nuestros resultados por inmunoanálisis de conglomerados (Larralde y col 1989) el cual es una forma clara de observar las frecuencias de reconocimiento de cada antígeno y de identificar los antígenos de reacción cruzada, empleando este sistema de análisis de esta manera es posible determinar qué antígeno es reconocido con mayor frecuencia por los sueros probados

H).-Análisis estadístico. Se determinó la frecuencia y especificidad de los antígenos de *S.marcescens* reconocidos por los dos grupos de sueros.

Para evaluar la significancia estadística entre las frecuencias de reconocimiento obtenidas en los grupos experimentales y los controles se utilizó la prueba exacta de Fisher.

DEFINICIONES OPERACIONALES

a).- Cepas intrahospitalarias.- Son cepas bacterianas aisladas de pacientes hospitalizados que cursan con una infección intrahospitalaria, de acuerdo a los criterios del CDC (“Infecciones que se presentan 72 horas después de la admisión del paciente y que no estaban infectado al momento del ingreso”).

b).- Sueros no infectados.- Son sueros de individuos que no han presentado ningún cuadro infeccioso o que no tengan antecedentes de enfermedades infecciosas recientes.

c).-Sueros de pacientes infectados.- Son sueros de los niños a los cuales se les aisló *S. marcescens* durante los brotes intrahospitalarios del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional SigloXXI y sueros de niños del Instituto Nacional de Pediatría con aislamiento de *S. marcescens*, referidos por el Comité de Infecciones Intrahospitalarias.

RESULTADOS

1.-Electroforesis de proteínas de membrana (SDS-PAGE) El análisis electroforético de proteínas totales de membrana y proteínas de membrana externa de las 21 cepas de *S. marcescens* y de las diferentes enterobacterias estudiadas se muestra en las **figuras 1a,1b y 2a, 2b**. Al comparar los patrones electroforéticos, de las enterobacterias con los patrones de *S. marcescens* encontramos que éstos son parecidos en el caso de las proteínas totales de membrana, pero los patrones electroforéticos de proteínas de membrana externa (PME) muestran diferencias.

Se estableció el peso molecular de las bandas proteicas comunes a *S. marcescens* y a las enterobacterias y se encontró que las proteínas con pesos entre 15 y 48 kDa fueron las más constantes y éstas se presentan en el **cuadro 4**, es necesario señalar que se encontró de manera constante una proteína de 31 kDa tanto en *S. marcescens* como en otras enterobacterias.

2.-Inmunotransferencia (Western-blot) El ensayo de inmunotrasferencia se realizó utilizando el suero de 4 niños infectados por *S. marcescens* del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional S-XXI, 4 sueros de pacientes infectados por *S. marcescens* del Instituto Nacional de Pediatría y 40 sueros de una población abierta, (no infectados).

a).- Proteínas totales de membrana (PTM) de *S. marcescens* reconocidas por sueros de pacientes infectados con *S. marcescens*

La **figura 3a,3b y 3c** muestran el reconocimiento de las proteínas totales de membrana de *S. marcescens*, aisladas en el CMN-SXXI, por los sueros de los pacientes del CMN-SXXI observando que aún cuando existe una variación en la respuesta frente a *S. marcescens* cuando comparamos ésta paciente a paciente, fue posible establecer patrones de reconocimiento semejantes en nuestros sueros.

Los sueros de los pacientes reaccionaron contra sus cepas y en estos casos la reacción contra las proteínas de 38, 35, 31,28,25 y 15 kDa se presentó de manera constante (**Cuadro 5**)

En las **figuras 4a y 4b (Cuadro 6)** se muestra el reconocimiento de las proteínas totales de membrana de *S. marcescens* aisladas del Instituto Nacional de Pediatría (INP) por los sueros de los niños infectados por *S. marcescens* del INP reaccionando éstos con las proteínas de 38, 35, 31, 28,25, 22 y 15 kDa.

En las **figuras 5a y 5b (Cuadro 7)** se presenta el reconocimiento de las proteínas totales de membrana de *S. marcescens* aisladas del CMN-SXXI con los sueros del INP, en estos casos prevalecen las bandas de 38, 35, 31,29,25,20 y 15 kDa.

b).-Proteínas de membrana externa (PME) de *S. marcescens* reconocidas con sueros de pacientes infectados por *S. marcescens*

En las **figuras 6a y 6b (Cuadro 8)** se muestra el reconocimiento de las proteínas de membrana externa de cepas *S. marcescens* aisladas del CMN-SXXI, con sueros de los pacientes del CMN-SXXI observandose reconocimiento con proteínas de 38, 35, 33,28,25,20 y 15 kDa. Al realizar el reconocimiento antigénico con las PME de cepas de *S. marcescens* aisladas del INP y probadas con sueros del INP observamos que no todas reconocen la banda de 38, 35,28, y 15 kDa, sin embargo la banda de 31 kDa permanece como se muestra en las **figuras 7a y 7b (Cuadro 9)**.

En la **figura 8 (Cuadro 10)** se muestra el reconocimiento antigénico de proteínas de membrana externa en cepas de *S. marcescens* del CMN-SXXI con sueros de niños infectados por *S. marcescens* del INP el cual se observan las proteínas de 38,35,31,28,25,y 15 kDa.

Las frecuencias del reconocimiento antigénico de los sueros de los pacientes infectados con *S. marcescens* con proteínas totales de membrana y proteínas de membrana externa de *S. marcescens* muestran que la banda de 31 kDa está presente en ambos grupos por lo que hace suponer que esta banda es una proteína de membrana externa (**Cuadro 13**).

c).-Proteínas totales de membrana (PTM) de *S. marcescens* reconocidas con sueros de pacientes no infectados por *S. marcescens*

La figura 9a ,9b y9c (Cuadro 11) muestra el reconocimiento de las proteínas de membrana externa de *S. marcescens* por los sueros de los niños no infectados observándose un escaso reconocimiento antigénico comparado con los reconocimientos al usar sueros de pacientes infectados,tanto para la banda de 31 kDa como para otras bandas observando que algunos sueros reconocen las bandas de 38, 35,28,20 y 15 y la banda de 31 kDa sólo se observó con 7 sueros de los 40 analizados.

d).-Proteínas de membrana externa (PME) reconocidas con sueros de pacientes no infectados por *S. marcescens*

En las figuras 10a, 10b,10c y 10d (Cuadro 12) se muestra los patrones de reconocimiento de proteínas de membrana externa de *S. marcescens* con los sueros de los niños no infectados, observando entre otras una baja reacción con la fracción de 31 kDa en 10 de 40 sueros (25%) mientras que la respuesta frente a esta proteína de los sueros de niños infectados fue de 100%.

e).- Proteínas de otras enterobacterias frente a sueros de pacientes infectados y no infectados por *S. marcescens*

Para conocer si las bandas proteicas identificadas en *S. marcescens* eran específicas del microorganismo, se procedió a evaluar la respuesta de los sueros tanto contra extractos de proteínas totales de membrana como contra proteínas de membrana externa de diferentes enterobacterias, observando que efectivamente si está presente en *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. agglomerans*.

En las **figuras 11a y 11b (Cuadro 14)**, se muestra el reconocimiento con proteínas totales de membrana (PTM) de cepas gram negativas con sueros infectados por *S. marcescens* reconociéndose la banda de 31 kDa en cepas de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *E. agglomerans* que fueron reconocidas por 2 sueros infectados. En el caso de *K. pneumoniae*, se trabajaron extractos de tres cepas distintas y se observó que la proteína de 31 kDa fue reconocida cuando se emplearon extractos de Proteínas totales de membrana y sólo un suero fue capaz de reaccionar con una banda de 31 kDa de extractos de membrana externa (**Cuadro 20**).

En las **figuras 12a, 12b, 12c, 12d y 12e (Cuadro 15, 16, 17, 18 y 19 respectivamente)** se presenta el reconocimiento de las proteínas de membrana externa de las cepas Gram negativas con sueros de niños infectados; en algunos casos que estas cepas reconocen una banda de 31 kDa semejante a la banda de 31 kDa en *S. marcescens* reconocida con los sueros infectados en una proporción de

37.5% y 100% respectivamente lo cual nos hace suponer que se trata de dos bandas distintas.

También se realizó el reconocimiento de las proteínas totales de membrana **figuras 13a y 13 b** y proteínas de membrana externa **figuras 14a, 14 b y 14c** (**Cuadros 21,22, 23 y 24**) de las cepas Gram negativas con sueros de niños no infectados, en el caso de las PTM se aprecia un escaso reconocimiento, no observamos la banda de 31 kDa y la banda que se presentó con mayor frecuencia fue la de 35 kDa en una proporción del 67.5%. En el caso de las PME de las Gram negativas con los sueros no infectados la banda de 31 kDa sólo la reconocieron 4 sueros de 40 (10%)(**Cuadro 25**).

Así encontramos que los sueros de los niños infectados y no infectados fueron capaces de reconocer una proteína de 31 kDa en Enterobacterias con frecuencias del 37.5% y 10 % respectivamente; lo que es distinto a lo encontrado en *S. marcescens* donde las frecuencias fueron del 100 % para sueros infectados y 25 % para no infectados por la prueba exacta de Fisher (**Cuadro 26**).

Al comparar las frecuencias de reconocimiento de los sueros infectados y no infectados para la proteína de 31 kDa de *S. marcescens* o de las otras Enterobacterias, encontramos que éstas son estadísticamente distintas, tanto para el grupos de los sueros infectados, como los sueros del grupos de no infectados, el cual resultó por la prueba exacta de Fisher ($p < 0.08$) (**Cuadro 27**)

Estas diferencias en la capacidad de reconocimiento de las proteínas de 31 kDa de *S. marcescens* y de las enterobacterias, así como el hecho de que sean reconocidas en proteínas totales de membrana ó en proteínas de membrana externa sugieren que estas proteínas son efectivamente distintas al menos desde el punto de vista de la antigenicidad.

3.- Análisis de conglomerados

Para comparar gráficamente las frecuencias de reconocimiento antigénico de las proteínas de membrana de *S. marcescens* por parte de sueros de pacientes infectados y no infectados, decidimos utilizar el análisis de conglomerados propuesto por Larralde y Ximénez, 1992. Adicionalmente este sistema de análisis permite identificar tanto a los antígenos de reacción cruzada como aquellos antígenos específicos del microorganismo que nos interesa estudiar.

En la **figura 15a** se presenta el reconocimiento antigénico de proteínas de membrana externa de *S. marcescens* efectuado por los sueros de niños infectados y no infectados, en este caso los sueros infectados reconocen a las proteínas de 35, 38 y 31 kDa con una frecuencia del 100 %, pero de ellas sólo la proteína de 31 kDa es reconocida con una baja frecuencia por parte de los pacientes no infectados.

En la **figura 15b** se comparan las frecuencias de reconocimiento entre sueros no infectados contra *S. marcescens* y sueros infectados contra enterobacterias; para

este caso, la proteína de 31 kDa demostró ser poco reconocida tanto por los sueros no infectados con una frecuencia de (10%) como por los sueros infectados empleando extractos de enterobacterias con una frecuencia de (37%).

En la **figura 15c** se comparan las frecuencias de reconocimiento empleando extractos de *S. marcescens* con sueros de pacientes infectados con una frecuencia del 100% con la obtenida por extractos de enterobacterias contra sueros infectados frecuencia del (37.5%), las proteínas de 31 y 38 kDa resultan ser las que proporcionan un sistema más específico ya que ambas dan una alta respuesta en *S. marcescens* y pobre enterobacterias.

4.- Análisis estadístico

Al realizar el análisis estadístico de los resultados antes referidos contra la proteína de 31 kDa de *S. marcescens*, comparando la respuesta de sueros de niños no infectados contra la de los infectados, se observó por la prueba exacta de Fisher una $p < 0.0001$, indicando que la diferencia entre el porcentaje de veces que se identifica la banda de 31 kDa en el grupo de sueros infectados es estadísticamente significativa (**Cuadro 26**)

Con respecto a la respuesta observada con el suero de niños no infectados contra la proteína de 31 kDa tanto de Gram- negativas como contra la de *S. marcescens* no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ya que por la prueba

exacta de Fischer nos da una $p= 0.081$. (**Cuadro 27**).

Para validar la posible utilización de la fracción proteica de 31 kDa para identificar cepas de *S. marcescens* se realizó la prueba de sensibilidad y especificidad (**Cuadro 28**)

Como puede observarse, al realizar la detección de la banda de 31 kDa en cepas de *S. marcescens* empleando sueros infectados se observó una sensibilidad del 100%, con una especificidad del ensayo del 75%.

La sensibilidad del 100% nos indica que la utilidad de la banda de 31 kDa para detectar sueros de pacientes infectados por *S. marcescens* es del 100% con una probabilidad de error del 25%.

Al establecer los valores predictivos positivos se encontró que estos eran del 44%, es decir que la probabilidad de que un suero de niño infectado sea positivo a *S. marcescens* es del 44%. Por otro lado los valores predictivos negativos fueron del 100% es decir, la confiabilidad de que una prueba sea negativa es del 100% (**Cuadro 27**)

Por lo que podemos decir que *S. marcescens* presenta una banda de 31 kDa que podría ser específica ya que se presenta con una frecuencia altamente significativa, la cual nos podría servir como un marcador en la caracterización de este microorganismo.

Cuadro 1.- *Serratia marcescens* como agente causal de infecciones intrahospitalarias en México.

Institución	Referencia
Hospital Gea González	Flores-Calderón, 1988
Instituto Nacional de Pediatría 1988, 89,92	Coria-Jiménez, 1991, 1992
Hospital del Niño Poblano	Tello-Zavala, 1993
Hospital Central Dr. Ignacio Morones T.; S.L.P.	Lazo de la Vega, 1993
Instituto Nacional de la Nutrición	Volkow-Fernández, 1993
Hospital Infantil de México Federico Gómez	Ramírez de Aguilar, 1993
Hospital de Pediatría, C. M. N. Siglo XXI	Solorzano-Santos, 1995
Hospital Universitario de Puebla	M. Centeno, 1999
Hospital Infantil de México Federico Gómez	A. González y A. Pérez-Miravete, 1999

Cuadro 2.- Biogrupos y Biotipos de *S. marcescens* asociados a brotes intrahospitalarios

año	Institución (año)	n	Biogrupo	Prop.	Biotipo	Prop.
1977	Instituto Nacional de Pediatría	12	A 5/8	0.499	A 5	0.416
1978	Hospital Infantil de México, Federico Gómez	56	A 5/8	0.558	A 5	0.250
1988-89	Instituto Nacional de Pediatría	108	A 5/8	0.928	A 8d	0.651
1992	Instituto Nacional de Pediatría	33	A 5/8	0.649	A 8b	0.457
1992	Hospital Infantil de México, Federico Gómez	65	A 5/8	0.292	Auxotrofos	0.169
1993	Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán	21	A 5/8	0.857	A 8b	0.428
1993	Hospital del Niño de Puebla	1	A 2/6	1.000	A 6a	1.000
1995	Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI	65	A 5/8	0.864	A 8d	0.864
1997	Hospital de Zona, Querétaro	9	A 5/8	0.880	A 8a	0.880
1999	Hospital Universitario de Puebla	60	A 5/8	0.910	A 8a	0.910

Cuadro 3.- Origen de las cepas estudiadas.

ORIGEN	AÑO	CEPAS (N°)
C.M.N .S XXI	1995	<i>S. marcescens</i> (4)
I.N.Ped	1988, 1989 Y 1992	<i>S. marcescens</i> (15)
I. P. N.	1996	* <i>S. marcescens</i> (NIMA) (1)
Japón	1996	** <i>S. marcescens</i> (US-5) (1)
Hosp. Inf. Méx. (H I M)	1997	<i>E. coli</i> (3)
Hosp. Inf. Méx. (H I M)	1997	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (3)
Hosp. Inf. Méx. (H I M)	1997	<i>Enterobacter agglomerans</i> (2)

*PIGMENTADA BIOTIPO A2B

** NO PIGMENTADA BIOTIPO TCT

PERFIL ELECTROFORETICO DE PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

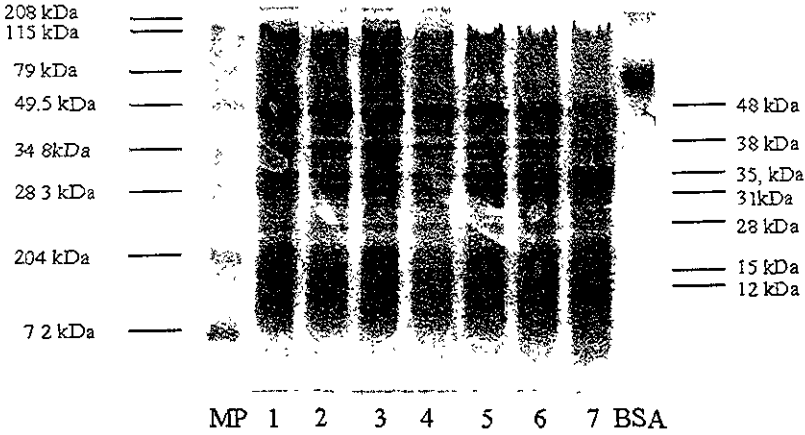


Fig. 1a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 55H); carril 2 (56H); carril 3 (cepa 75C); carril 4 (Cepa 80H); carril 5 (cepa 81H); carril 6 (cepa 58H); carril 7 BSA (albúmina sérica bovina).

PERFIL ELECTROFORETICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

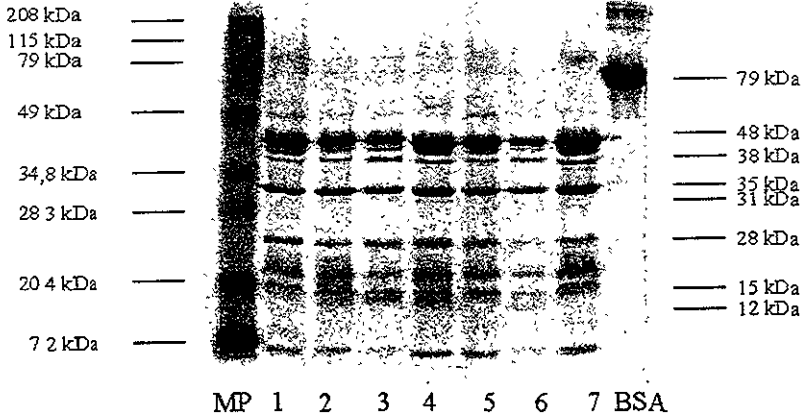


Fig. 1b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 48C); carril 2 (55H); carril 3 (cepa 56H); carril 4 (Cepa 75C); carril 5 (cepa 93H); carril 6 (cepa 80H); carril 7 (81H); carril BSA (albúmina sérica bovina).

PERFIL ELECTROFORETICO DE PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA EN DIFERENTES CEPAS GRAM NEGATIVAS

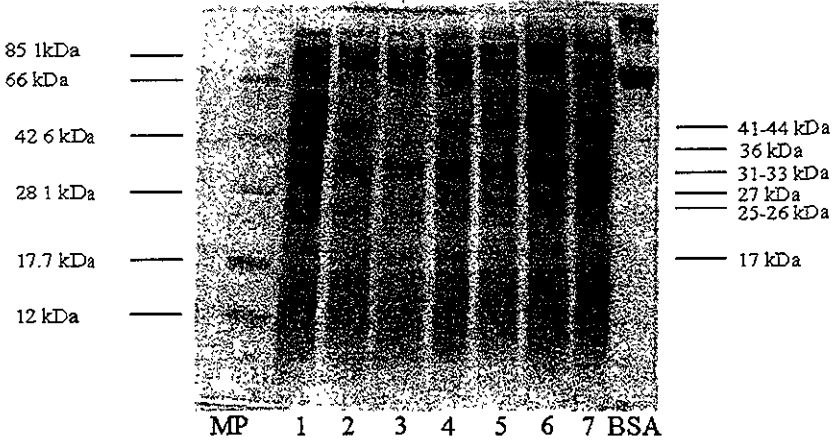


Fig. 2a. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-2 (cepas de *E.coli*); carriles 3-4 (cepas de *Klebsiella pneumoniae*); carriles 5-6 (cepas de *Enterobacter agglomerans*); carril 7 (Cepa 75C de *S. marcescens*); carril BSA (albúmina sérica bovina).

PERFIL ELECTROFORETICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM NEGATIVAS

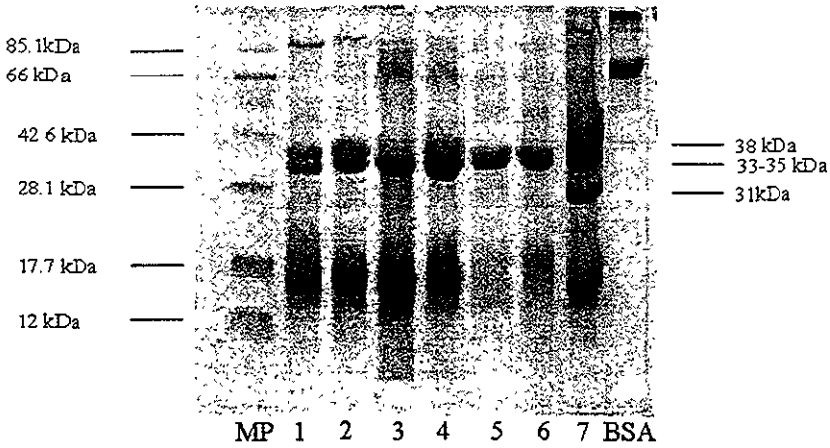


Fig. 2b. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-2 (cepas de *E. coli*); carriles 3-4 (cepas de *Klebsiella pneumoniae*); carriles 5-6 (cepas de *Enterobacter agglomerans*); carril 7 (Cepa 75C de *S. marcescens*); carril BSA (albúmina sérica bovina).

Cuadro 4. Peso molecular de diferentes proteínas de membrana identificadas por SDS-PAGE obtenidas de cepas de Enterobacterias y *S. marcescens*

ORIGEN	PROTEINAS PESO. MOL (kDa)
	*(n°)
<i>S. marcescens</i> (C.M.N S XXI)	(4) 48,38, 35, 33, 31*, 28, 20, 15, 12
<i>S. marcescens</i> (I.N.Ped)	(15) 48,38, 35, 33, 31*, 28, 20, 15, 12
<i>S. marcescens</i> NIMA (I. P. N.	(1) 48,35, 33, 26, 22, 20, 19, 13, 10
<i>S. marcescens</i> U S-5 (Japón)	(1) 48,38, 36, 31*, 26, 22, 17, 10
<i>E. coli</i> (H. I. M.)	(3) 45,38, 36, 33, 31*, 22, 19, 17, 15, 10
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (H. I. M.)	(3) 45,36, 25, 19, 17, 15, 10
<i>Enterobacter agglomeras</i> (H.I. M)	(2) 45,38, 36, 33, 28, 25, 19, 15, 12

* banda de 31 Kda

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL CMN-S. XXI

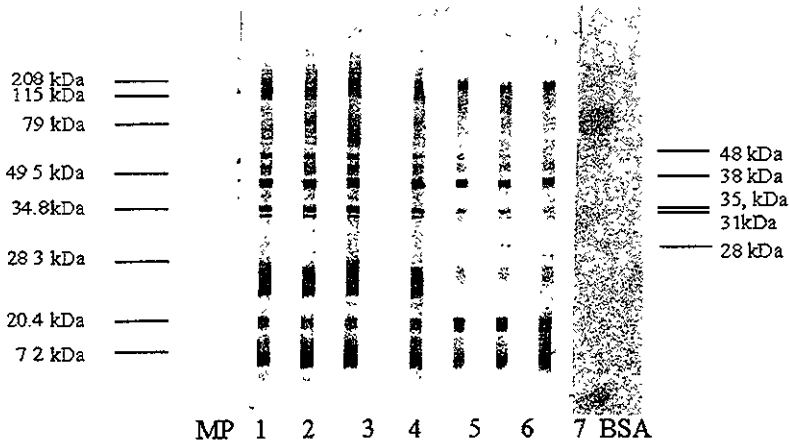


Fig. 3a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 55H); carril 2 (56H); carril 3 (cepa 93H); carril 4 (Cepa 75C); carril 5 (cepa 80H); carril 6 (cepa 81H); carril 7 (cepa 48C); BSA (albúmina sérica bovina). carriles 1-4 (cepas reconocidas con suero 2 infectado); carriles 5-7 (cepas reconocidas con suero 5 infectado)

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DES. *marcescens* CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL CMN-S. XXI

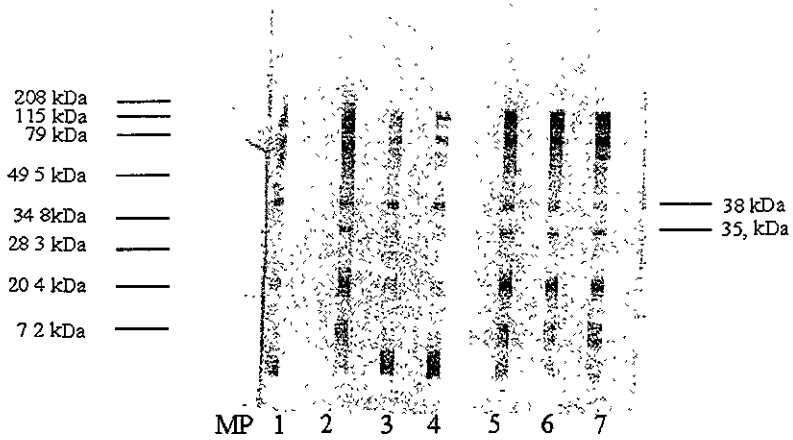


Fig. 3b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 1saA); carril 2 (1saA); carril 3 (cepa 58C); carril 4 (Cepa 75C); carril 5 (cepa 75C); carril 6 (cepa 95H); carril 7 (cepa 159H); carriles 1-3-4 (cepas reconocidas con suero 1 infectado CMN); carriles 2-5-6-7 (cepas reconocidas con suero 6 infectado CMN)

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL CMN-S. XXI

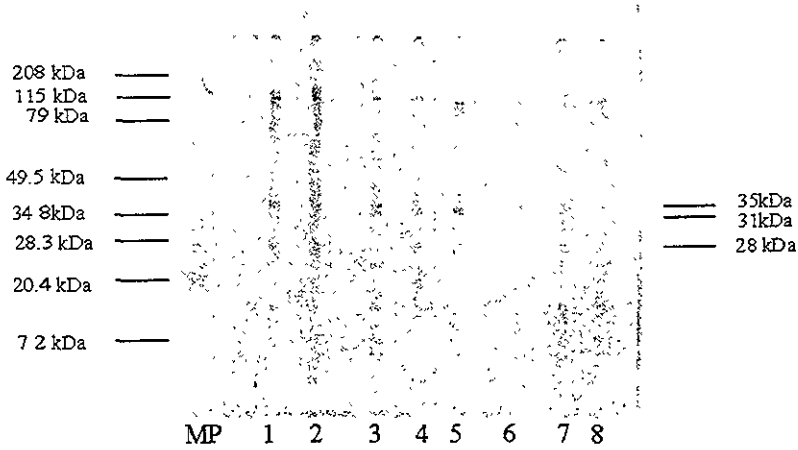


Fig. 3c. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 58C); carril 2 (95H); carril 3 (cepa 80H); carril 4 (cepa 81H); carril 5 (cepa 58C); carril 6 (cepa 75C); carril 7 (cepa 80H); carril 8 (cepa 81H); Carriles 1, 2, 5 y 6 cepas reconocidas con suero 1 infectado CMN; carriles 3, 4, 7 y 8 cepas reconocidas con suero 5 infectado CMN.

Cuadro 5.- Antígenos de proteínas totales de membrana de *S. marcescens* del C.M.N. Siglo XXI reconocidas con sueros del C. M. N. Siglo XXI

PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA

Cepas de <i>S. marcescens</i>	55H	56H	93H	75C	80H	81H	48C	58	75C	75C	95H	159H	58C	75C	80H	81H	58C	75C	80H	81H
		66		66																
			61																	
	48	48	48	48																
	38	38	38	38	38	38	38		38	38	38	38								
	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	31	31	31	31	31	31	31		31				31	31	31	31	31	31	31	31
													27	27	27	27	27	27	27	27
	26	26	26	26																
							25	25	25	25										
							17	17	17											
															19	19	19	19	19	19
	15	15	15	15	15	15			16	15				15					16	16
	S. marc. vs / suero 2 del CMN Siglo XXI				S. marc. vs / suero 5 del CMN Siglo XXI				S. marc. vs / suero 1 del CMN Siglo XXI	S. marc. vs / Suero 6 del CMN Siglo XXI			S. marc. vs / suero 1 del CMN Siglo XXI	S. marc. vs / suero 5 del CMN Siglo XXI	S. marc. vs / suero 1 del CMN Siglo XXI	S. marc. vs / suero 5 del CMN Siglo XXI				

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL INP CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL INP

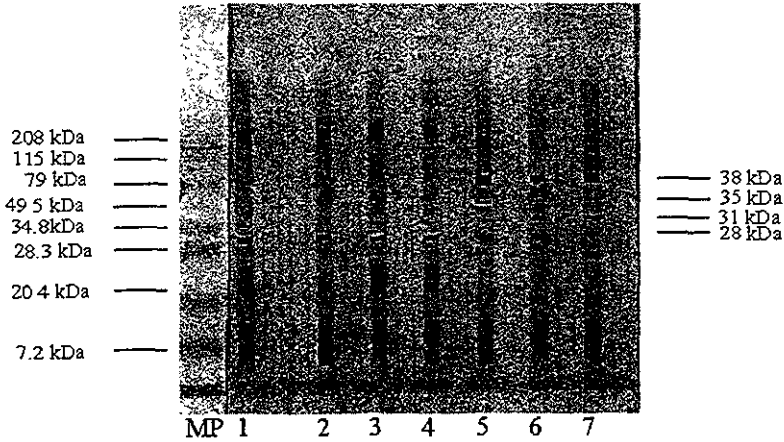


Fig. 4a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 84); carril 2 (cepa 85); carril 3 (cepa 120); carril 4 (cepa 125); carril 5 (cepa 136); carril 6 (cepa 148); carril 7 (cepa 133). Carriles 1-4 cepas reconocidas con suero 2 INP; carriles 5-7 cepas reconocidas con suero 3 INP.

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL INP CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL INP

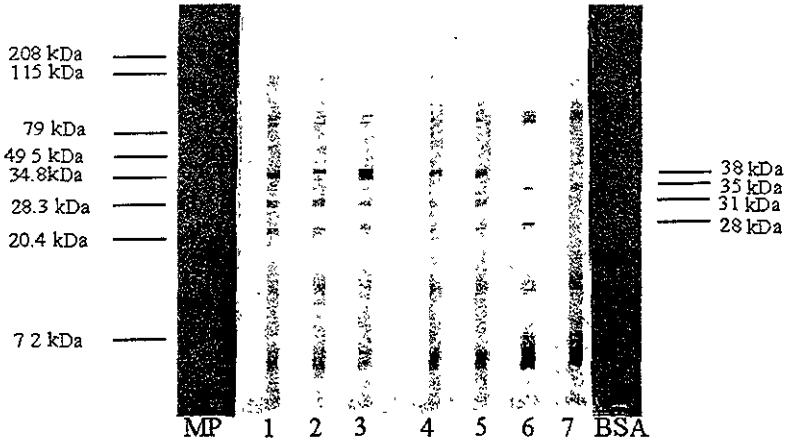


Fig. 4b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 4); carril 2 (cepa 5); carril 3 (cepa 79); carril 4 (cepa 74); carril 5 (cepa 75); carril 6 (cepa 97); carril 7 (cepa 82); carril 8 (BSA). Carriles 1-5 cepas reconocidas con suero 3 INP; carriles 6-7 cepas reconocidas con suero 4 INP.

Cuadro 6.- Antígenos de proteínas totales de membrana de *S. marcescens* del I.N.P. reconocidas con sueros de niños del I.N.P.

PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA

Cepas de <i>S. marcescens</i>	1988						1989				1992				
	76	4	5	79	74	75	97	82	84	85	120	125	136	148	133
	63	63	63	63	63	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	38	38	38	38	38	38	38	38					38	38	38
		35	35	35	35	35	35	35	-	-	-	-	35	35	35
	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
	-	-	-	-	-	-		-							
	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28	28
	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	-	22	22	22	22	22	22	22	-	-	-	-	-	-	-
	19						-	-	19	19	19	19	19	19	19
							-	-	15	15	15	15	15	15	15
	12						-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. marc.</i> vs/suer o 3 Pac. I.N.P.	<i>S. marc. vs / suero 3</i> Pac. I.N.P.						<i>S. marc. vs / suero 4</i> Pac. I.N.P.			<i>S. marc. vs / suero 2</i> Pac. I.N.P.		<i>S. marc. vs / suero 3</i> Pac. I.N.P.			

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL CMN CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL INP

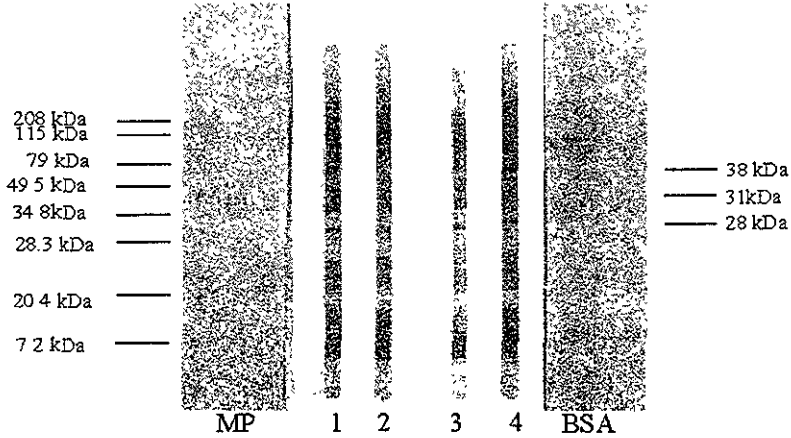


Fig. 5a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 55H); carril 2 (cepa 56H); carril 3 (cepa 93H); carril 4 (cepa 75C); carril 8 (BSA) carriles 1-4 cepas reconocidas con suero 1 INP infectado.

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES EN
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS DEL INP

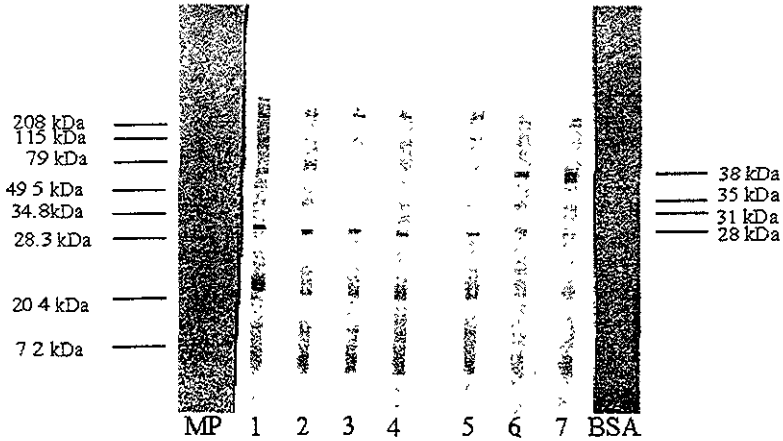


Fig. 5b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 75C); carril 2 (cepa 80H); carril 3 (cepa 81H); carril 4 (cepa 48C); carril 5 (cepa 95H); carril 6 (cepa 159H); carril 7 (cepa 76 INP); carril 8 (BSA). Carril 1 cepa reconocida con suero 1 INP; carriles 2-5 cepas reconocidas con suero 2 INP; carriles 6-7 cepas reconocidas con suero 3 INP.

Cuadro 7.- Reconocimiento antigénico de proteínas totales de membrana en cepas de *S. marcescens* del C.M.N. Siglo XXI con sueros de niños infectados del INP.

PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA

Cepas de <i>S. marcescens</i>	55H	56H	93H	75C	75C	80H	81H	48C	95H	159H	76
	63	63	63				63	63		63	63
				55							
	38		38	38	38	38				38	38
		36			35	35	35	35	35	35	35
	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31	31
	28	28	28	28	29	29	29	29	29	29	29
	25	25	25								
	22	22	22								
	20	20	20	20	20	20	19	19	20	19	19
	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
	S. marc. vs/suero 1 Pac. I.N.P.					S. marc. vs/suero 2 Pac. I.N.P.				S. marc. vs/suero 3 Pac. I.N.P.	

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS POR *S. marcescens* DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA(PME) EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

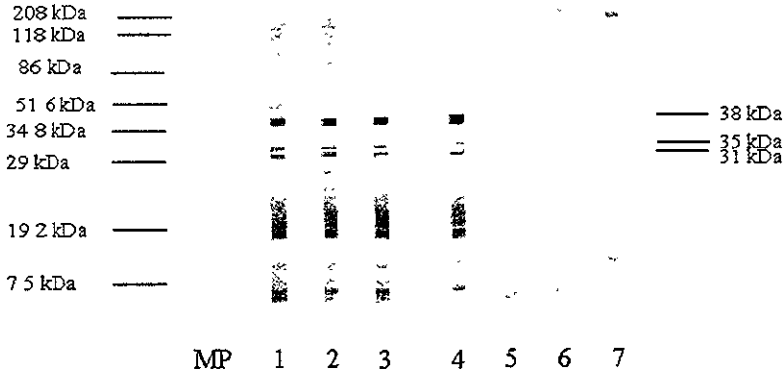


Fig. 6a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 55H); carril 2 (cepa 56H); carril 3 (cepa 93H); carril 4 (Cepa 75C); carril 5 (cepa 80H); carril 6 (cepa 81H); carril 7 (cepa 48C). Carriles 1-4 cepas reconocidas con suero 2 infectado CMN; carriles 5-7 cepas reconocidas con suero 5 infectado CMN.

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS
 POR *S. marcescens* DEL CMN E INP DE PROTEINAS DE MEMBRANA
 EXTERNA(PME) EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

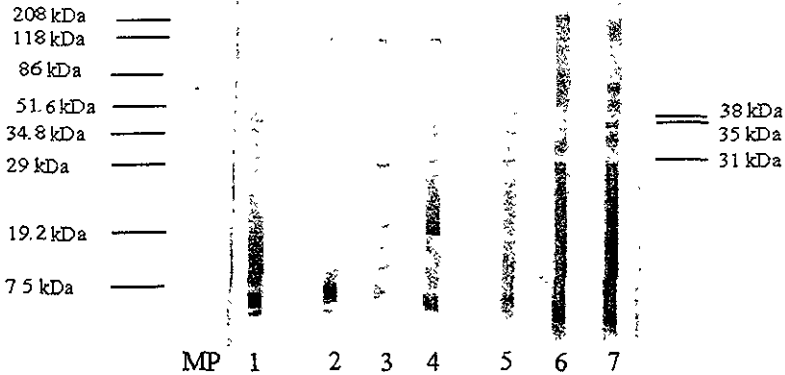


Fig. 6b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 95H); carril 2 (cepa 159H); carril 3 (cepa 58C); carril 4 (Cepa 58C); carril 5 (cepa 75); carril 6 (cepa 97); carril 7 (cepa 82). Carriles 1-2 cepas reconocidas con suero 6 infectado CMN; carriles 3-4 cepas reconocidas con suero 1 infectado CMN; carril 5 cepa reconocida con suero 3 infectado INP; carriles 6-7 cepas reconocidas con suero 4 infectado INP.

Cuadro 8.- Reconocimiento antigénico de proteínas de membrana externa en cepas de *S. marcescens* del CMN Siglo XXI y del INP con sueros de niños infectados del CMN y del INP

PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

Cepas de <i>S. marcescens</i>	55H	56H	93H	75C	80C	81H	48C	95H	159H	58C	58C	75	97	82
-	-	-	-	-	-	-	-							
38	38	38	38	38	38	38	38	38					38	38
35	35	35						35	35	35	35	35	35	35
31	31	31	31	31	31	31	31	31		31	31	31	31	31
28	28	28	28											
										25	25			
15	15	15	15	15	15	15	15			15				
<i>S. marc.</i> vs/suero 2 CMN				<i>S. marc.</i> vs/suero 5 CMN				<i>S. marc.</i> vs/suero 6 CMN		<i>S. marc.</i> vs/suero 1 CMN		<i>S. marc.</i> vs/suero 4 INP		

**RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS
POR *S. marcescens* DEL INP DE PROTEINAS DE MEMBRANA
EXTERNA(PME) EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL INP**

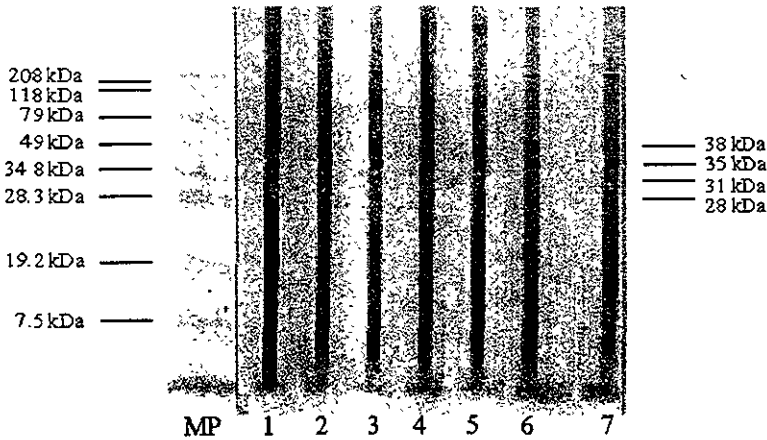


Fig. 7a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 95H); carril 2 (cepa 159H); carril 3 (cepa 76); carril 4 (Cepa 4); carril 5 (cepa 5); carril 6 (cepa 79); carril 7 (cepa 74). Carriles 1-2 cepas reconocidas con suero 1 infectado INP; carriles 3-7 cepas reconocidas con suero 3 infectado INP.

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS
POR *S. marcescens* DEL INP DE PROTEINAS DE MEMBRANA
EXTERNA(PME) EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL INP

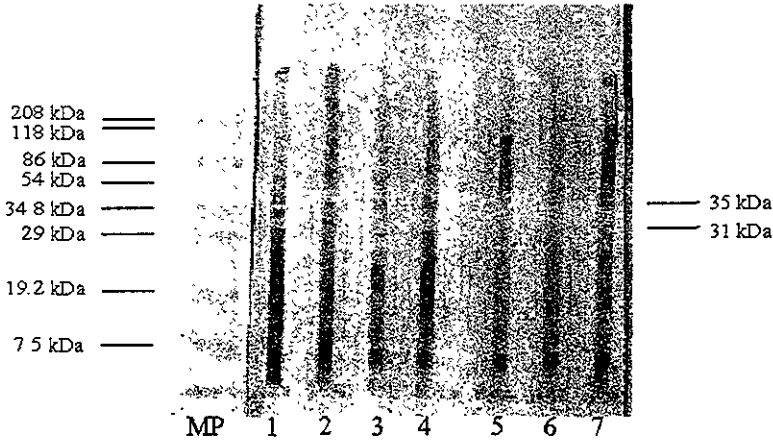


Fig. 7b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 84); carril 2 (cepa 85); carril 3 (cepa 120); carril 4 (Cepa 125); carril 5 (cepa 136); carril 6 (cepa 148); carril 7 (cepa 133). Carriles 1-4 cepas reconocidas con suero 2 infectado INP; carriles 5-7 cepas reconocidas con suero 3 infectado INP.

Cuadro 9.- Reconocimiento antigénico de proteínas de membrana externa en cepas de *S. marcescens* del I.N.P. con sueros de niños infectados del I.N.P.

PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

Cepas de	1988					1989				1992				
<i>S. marcescens</i>	95H	159	76	4	5	79	74	84	85	120	125	136	148	133
								50	50			50	50	50
	45				44	44	44					44	44	45
	38		38			38	38							
	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
	31			31	31		31	31	31	31	31	31	31	31
	28	28	28	28	28	28	28							
	-	-						25	25	25	25	25	25	25
	19	19	19	19			20	-	-	-	-	-	-	-
	-	-					15	15	15	15	15	15	15	15
	<i>S. marc.</i> vs/suero 1 INP		<i>S. marc.</i> vs/suero 3 INP					<i>S. marc.</i> vs/suero 2 INP			<i>S. marc.</i> vs/suero 3 INP			

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS
 POR *S. marcescens* DEL INP DE PROTEINAS DE MEMBRANA
 EXTERNA(PME) EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL CMN

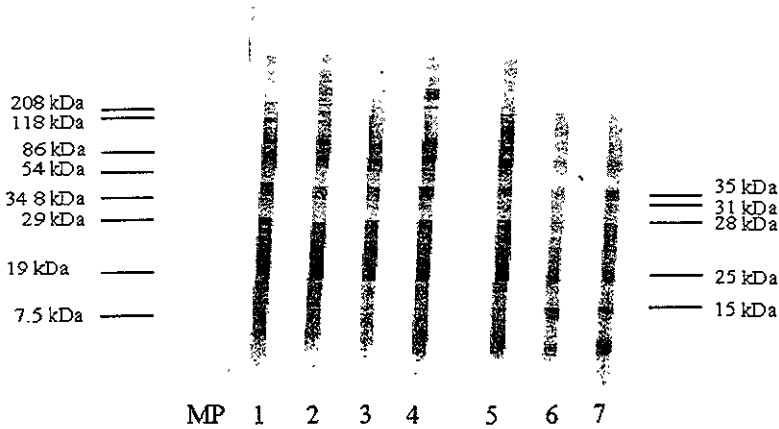


Fig. 8. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 55H); carril 2 (cepa 56H); carril 3 (cepa 93H); carril 4 (Cepa 75C); carril 5 (cepa 80C); carril 6 (cepa 81H); carril 7 (cepa 48C). Carriles 1-4 cepas reconocidas con suero 1 infectado INP; carriles 5-7 cepas reconocidas con suero 2 infectado INP.

Cuadro 10.

Cepas de <i>S. marcescens</i>	55H	56H	93H	75C	80C	81H	48C
	38	38	38	38	38	38	38
	35	35	35	35	35	35	35
	31	31	31	31	31	31	31
	28	28	28	28	28	28	28
	25	25	25	25	25	25	25
	15	15	15	15	15	15	15
	<i>S. marc.</i> vs/suero 1 INP				<i>S. marc.</i> vs/suero 2 INP		

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO
INFECTADOS POR *S. marcescens* CON PROTEINAS TOTALES DE
MEMBRANA EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL CMN

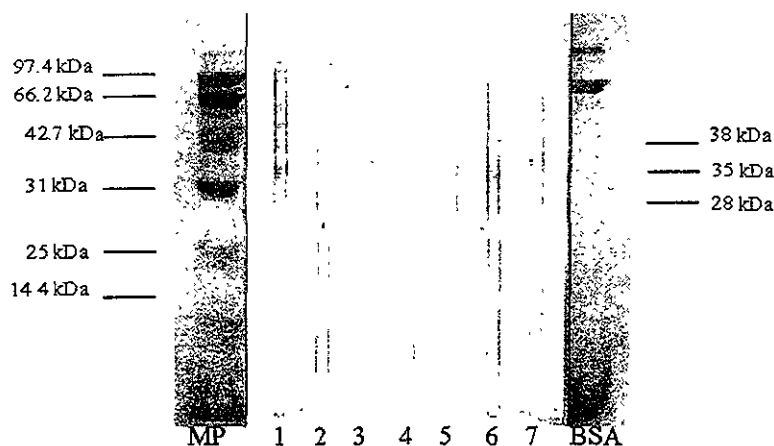


Fig. 9a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa NIMA); carril 2 (cepa 55H); carril 3 (cepa 56H); carril 4 (Cepa 58C); carril 5 (cepa 93H); carril 6 (cepa 75C); carril 7 (cepa 80H); BSA. Carriles 1-7 cepas reconocidas con sueros no infectados (14, 16, 17, 18, 19, 20 y 101 respectivamente).

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS POR *S. marcescens* CON PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL CMN

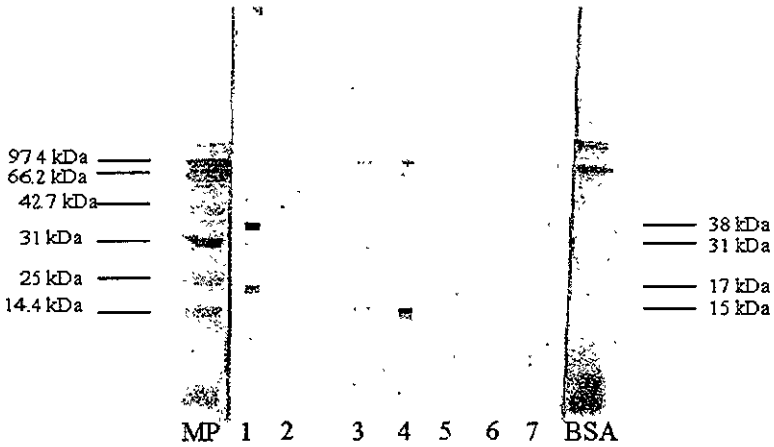


Fig. 9b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa US5); carril 2 (cepa 81H); carril 3 (cepa 48C); carril 4 (Cepa 95H); carril 5 (cepa 159H); carril 6 (cepa 75C); carril 7 (cepa 80H); BSA. Carril 1 cepa reconocida con suero 2 infectado CMN; carriles 2-7 cepas reconocidas con sueros no infectados (448, 449, 493, 116, 132 y 471 respectivamente).

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS POR *S. marcescens* CON PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA EN DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* DEL CMN

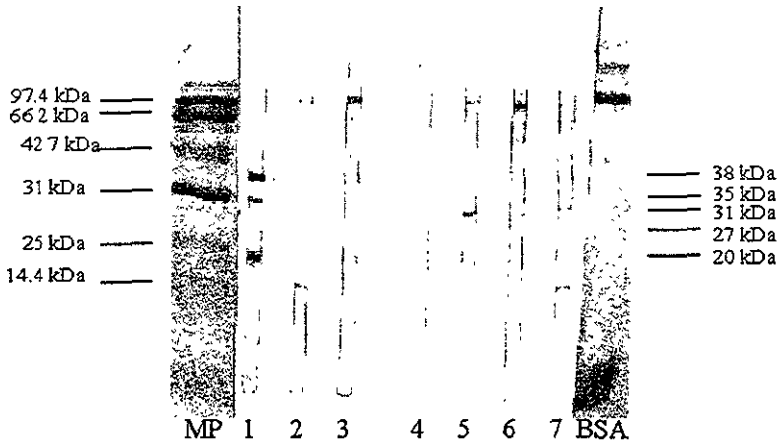


Fig. 9c. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa US5); carril 2 (cepa 55H); carril 3 (cepa 56H); carril 4 (Cepa 58C); carril 5 (cepa 93H); carril 6 (cepa 75C); carril 7 (cepa 80H); BSA. Carril 1 cepa reconocida con suero 2 infectado CMN; carriles 2-7 cepas reconocidas con sueros no infectados (133, 159, 136, 183, 142 y 128 respectivamente).

Cuadro 11.- Reconocimiento antigénico de proteínas totales de membrana *S marcescens* con sueros no infectados

Cepas de <i>S. marcescens</i>	NIMC A	55 H	56 H	58 C	93 H	75 C	80 H	US 5 H	81 H	48 C	95 H	159 H	75 C	80 H	US 5 H	55 H	56 C	58 C	93 H	75 C	80 H	
			38				38								38							
	38							35							35	35						
	35						31	31		31					31							
		28	28		28	28									27						27	27
										15					20							
sueros no infectados	14	16	17	18	19	20	101	5 CMN- SXXI	448	449	493	116	182	471	2 CMN- SXXI	133	159	136	183	142	128	

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA(PME)DE DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

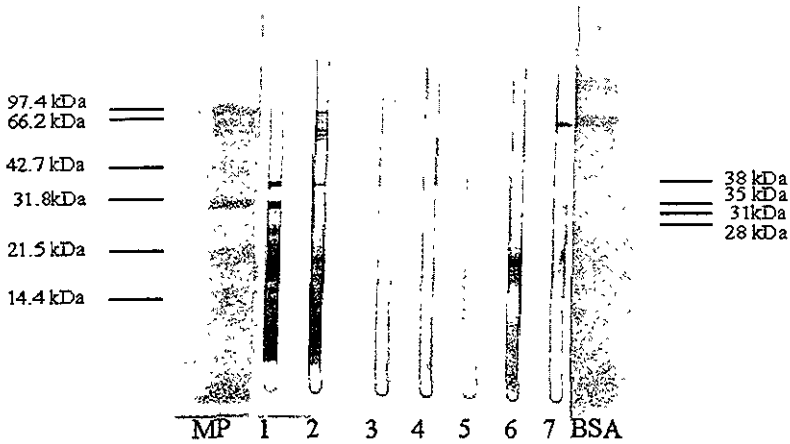


Fig. 10a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa US5H); carril 2 (cepa USS); carril 3 (cepa 58C); carril 4 (Cepa 55H); carril 5 (cepa 56H); carril 6 (cepa 93H); carril (cepa 80H); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 2 infectado; carriles 2-7 cepas reconocidas con sueros no infectados (133, 159, 136, 183, 142 y 128 respectivamente)

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO
INFECTADOS DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

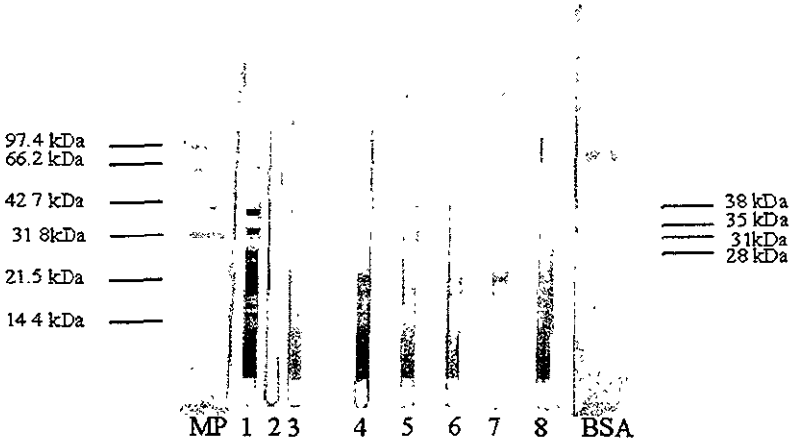


Fig. 10b. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-4 (cepas USS); carril 5 (cepa SSC); carril 6 (cepa SH); carril 7 (cepa SH); carril 8 (cepa SH); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 5 infectado CMN; carriles 2-8 cepas reconocidas con sueros no infectados (419, 422, 411, 115, 101 y 184 respectivamente).

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO
INFECTADOS DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA(PME)
DE DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

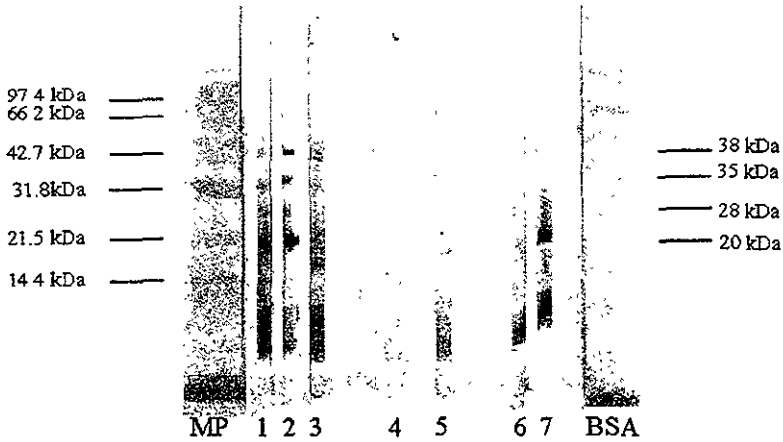


Fig. 10c. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-2 (cepa US5); carril 3 (cepa 58C); carril 4 (Cepa 55H); carril 5 (cepa 56H); carril 6 (cepa 93H); carril 7 (cepa 75C); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 1 infectado CMN; carril 2 cepa reconocida con suero 2 infectado CMN; carriles 3-7 cepas reconocidas con sueros no infectados (2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente)

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS NO
INFECTADOS DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA(PME)DE
DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens*

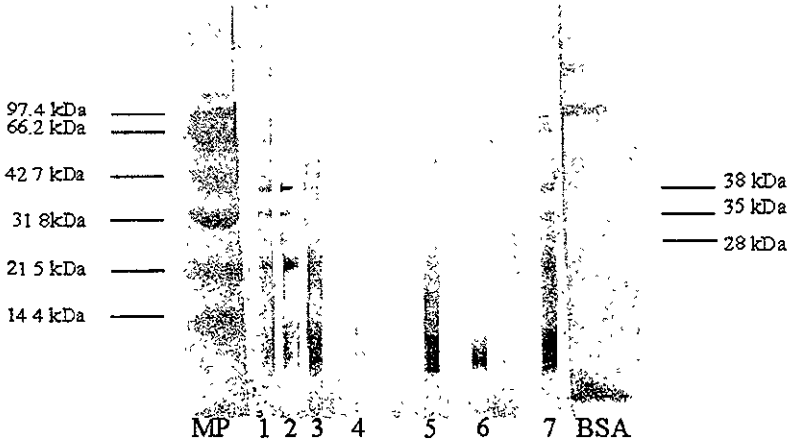


Fig. 10d. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-2 (cepa US5); carril 3 (cepa 58C); carril 4 (Cepa 55H); carril 5 (cepa 56H); carril 6 (cepa 93H); carril 7 (cepa 75C); BSA (albúmina sérica bovina). Carriles 1-2 cepas reconocidas con suero 2 infectado CMN; carriles 3-7 cepas reconocidas con sueros no infectados (8, 9, 10, 11 y 12 respectivamente).

Cuadro 12. Frecuencia con la que el suero de niños infectados y no infectados por *S. marcescens* reacciona contra diferentes proteínas de membrana externa de *S. marcescens*.

PES/MOL (kDa)	<i>S. marcescens</i> s. Infectados		<i>S. marcescens</i> s. Normales	
	No.	%	No.	%
38	8/8	(100%)	25/40	(62%)
35	8/8	(100%)*	32/40	(80%)
31	8/8	(100%)*	10/40	(25%)
28	5/8	(62%)*	21/40	(52%)*
25	5/8	(62%)*	25/40	(62%)*
19	4/8	(50%)*	16/40	(40%)
15	5/8	(62%)*	13/40	(32%)

Cuadro 13.- Reconocimiento antigénico de proteínas totales de membrana y de membrana externa en cepas de *S. marcescens* del CMN Siglo XXI e INP con sueros infectados del CMN. Y del INP comparados con el reconocimiento en sueros no infectados

		Peso molecular (kDa)																					
		PROTEÍNAS TOTALES DE MEMBRANA												PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA									
		38	35	31	29	28	27	26	25	20	19	17	15	12	38	35	31	28	27	25	22	19	15
SUEROS		8/8	8/8	8/8	3/8	5/8	2/8	1/8	6/8	4/8	2/8	4/8	5/8	2/8	8/8	8/8	8/8	5/8	1/8	5/8	1/8	4/8	5/8
	(9)																						
	%	100	100	100	37	62	25	12.5	75	50	25	50	50	25	100	100	100	62	12.5	62	12.15	50	62
SUEROS		6/40	9/40	7/40		13/40	1/40	3/40	12/40		3/40	2/40	7/40		3/40	32/40	10/40	21/40	4/40	25/40	13/40	16/40	13/40
	(40)																						
	%	15	22.5	17.5		32.5	2.5	7.5	30		7.5	5	17.5		62	80	25	52	10	62	32	40	32

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS EN PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA DE
DIFERENTES CEPAS GRAM NEGATIVAS

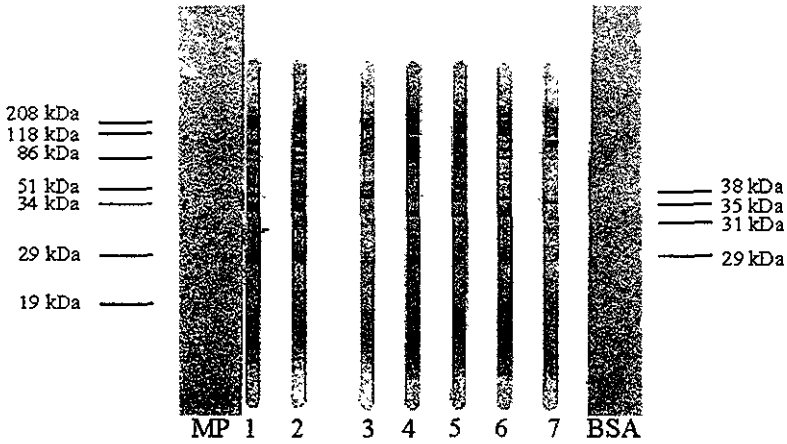


Fig. 11a. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-3 (cepas *E. coli*); carriles 4-5 (cepas *K. pneumoniae*); carriles 6-7 (cepas *E. agglomerans*); BSA (albúmina sérica bovina). Carriles 1, 2, 4, 5 y 6 cepas reconocidas con suero 2 infectado CMN; carriles 3 y 7 cepas reconocidas con suero 5 infectado CMN.

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON SUEROS DE NIÑOS
INFECTADOS EN PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA DE
DIFERENTES CEPAS GRAM NEGATIVAS

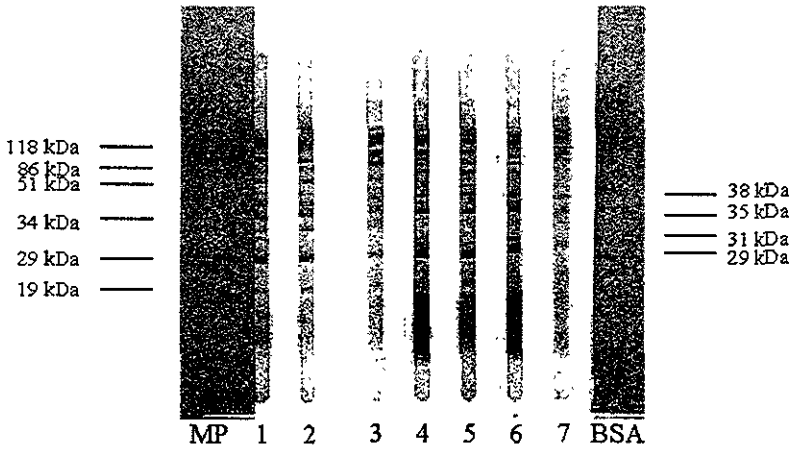


Fig. 11b. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-3 (cepas *E. coli*); carriles 4-5 (cepas *K. pneumoniae*); carriles 6-7 (cepas *E. agglomerans*); BSA (albúmina sérica bovina). Carriles 1, 2, 4, 5 y 6 cepas reconocidas con suero 2 infectado INP; carriles 3 y 7 cepas reconocidas con suero 3 infectado INP.

Cuadro 14.- Proteínas totales de membrana de cepas Gram negativas reconocidas con sueros infectados del C.M.N. y del I.N.P

<i>E. coli</i> : 529	<i>E. coli</i> : 501	<i>E. coli</i> : 502	<i>K. pneumoniae</i> : 745	<i>K. pneumoniae</i> : 745	<i>E. agglomerans</i> : 454	<i>E. agglomerans</i> : 455	<i>E. coli</i> : 529	<i>E. coli</i> : 501	<i>E. coli</i> : 502	<i>K. pneumoniae</i> : 746	<i>K. pneumoniae</i> : 745	<i>E. agglomerans</i> : 454	<i>E. agglomerans</i> : 455
102	102				102		100	100		100	100	100	100
50	50	50	50	50	50	50	50	50		50	50		50
33	33		33	33	33		33	33					
31	31			31								31	
29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29
						15	15	15	15		15	15	
19	19			19									
Vs. Suero 2	Vs. Suero 5 CMN	Vs. Suero 2 CMN				Vs. Suero 5	Vs. Suero 2	Vs. Suero 3 INP	Vs. Suero 2 INP				Vs. Suero 3
CMN	CMN	CMN				CMN	INP	Suero 3 INP	INP				INP

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS DE *S. marcescens* Y GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS

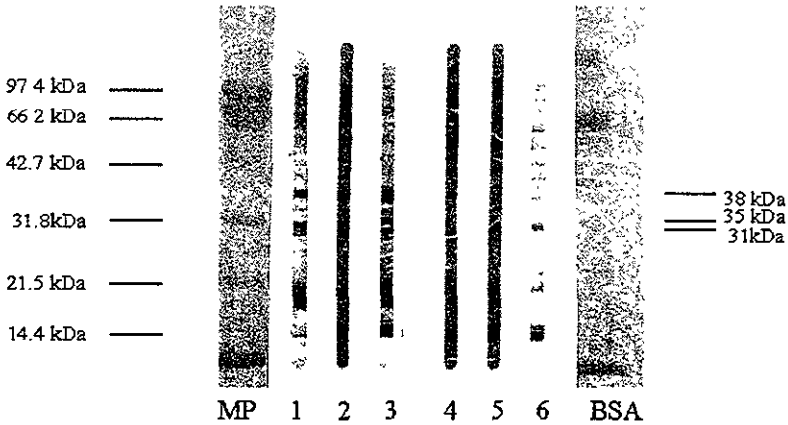


Fig.12a. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 55H); carril 2 (cepa 56H); carril 3 (US5); carril 4 (cepa *K pneumoniae*); carril 5 (cepa *E. coli*); carril 6 (cepa *Enterobacter agglomerans*); BSA (albúmina sérica bovina). Carriles 1, 3 y 5 cepas reconocidas con suero 2 infectado CMN; Carriles 2, 4 y 6 cepas reconocidas con suero 2 infectado INP.

Cuadro 15

55H	56H	US-5	<i>K.pneumoniae</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.agglomerans</i>
66	66	66	66	66	66
			50	50	50
			45	45	45
38	38	38	38	38	38
35		35		35	35
	31	31	31	31	31
29					
26	26	26	26	26	26
			22		
21	21	21	21	21	21
		20			
suero 2 CMN	suero 2 INP	suero 2 CMN	suero 2 INP	suero 2 CMN	suero 2 INP

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS

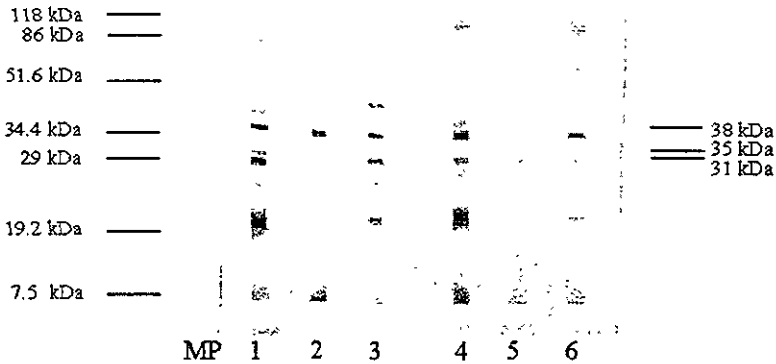


Fig. 12b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa 75C); carril 2 (cepa *K pneumoniae*); carriles 3-4 (cepas *E. coli*); carriles 5-6 (cepas *E agglomens*); carriles 1, 3 y 4 cepas reconocidas con suero 2 infectado CMN, carril 2 cepa reconocida con suero 1 infectado CMN, carril 5-6 cepas reconocidas con suero 6 infectado CMN.

Cuadro 16

<i>S. marcescens</i> 75C	<i>K. pneumoniae</i> 546	<i>E. coli</i> 529	<i>E. coli</i> 529	<i>E. agglom.</i> 455	<i>E. agglom.</i> 455
72					
		66	66		
61			52		
			45		
38	38	38	38		
35					
31		31	31	31	31
16		15	15		15
suero 2 CMN	suero 1 CMN	suero 2 CMN	suero 2 CMN	suero 6 CMN	suero 6 CMN

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. marcescens* Y GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS INFECTADOS.

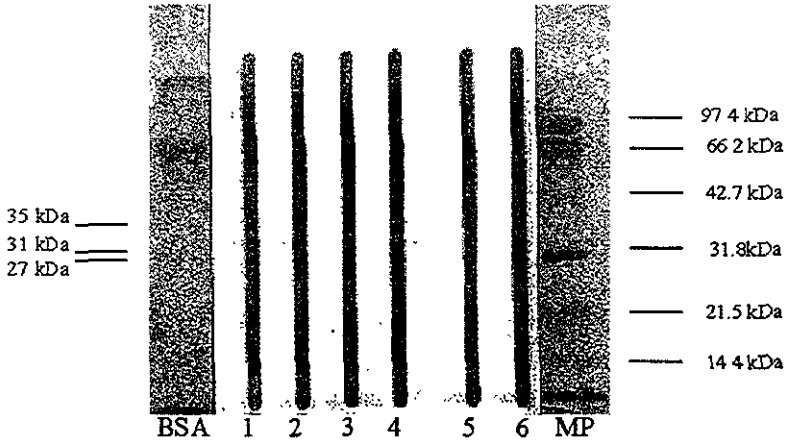


Fig. 12c. BSA; carril 1 (cepa *E agglomerans*); carril 2 (cepa *E. coli*); carril 3(cepa *K pneumoniae*); carril 4 (cepa US5); carril 5 (cepa 56 H); carril 6 (cepa 55H); MP (marcador de peso molecular). Carriles 1, 3 y 5 cepas reconocidas con suero 3 infectado INP, carriles 2, 4 y 6 cepas reconocidas con suero 2 infectado del CMN.

Cuadro 17

<i>E. agglomerans</i>	<i>E. coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	US-5	56H	55H
		45			
35	35	35	35	35	35
33	33	33	33	33	33
			31		
27	27	27	27	27	27
		25	25	25	25
22	22		22	23	22
suero 3 INP	suero 2 CMN	suero 3 INP	suero 2 CMN	suero 3 INP	suero 2 CMN

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS

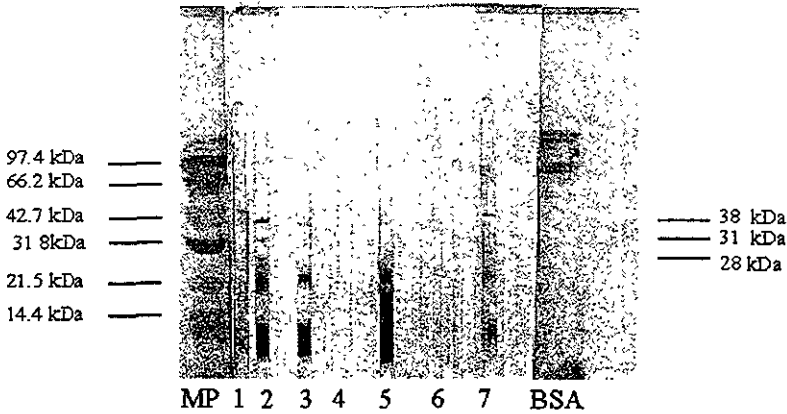


Fig. 12d. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-2 (cepas US5); carriles 3-4 (cepas *E. coli*); carriles 5-6 (cepas *K. pneumoniae*); carril 7 (cepa NIMA); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 448 no infectado; carriles 2, 3 y 5 cepas reconocidas con suero 2 infectado CMN; carriles 4 y 6 cepas reconocidas con suero 5 infectado CMN; carril 6 cepa reconocida con suero 98 no infectado.

Cuadro 18

US-5	US-5	<i>E. coli</i> 529	<i>E. coli</i> 510	<i>K. pneumoniae</i> 546	<i>K. pneumoniae</i> 745
	38				
		35		35	
	31				
	27				
	25				
	20	20		20	
				17	
	10	10		10	
suero 448 N	suero 2 CMN	suero 2 CMN	suero 5 CMN	suero 2 CMN	suero 5 CMN

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS INFECTADOS

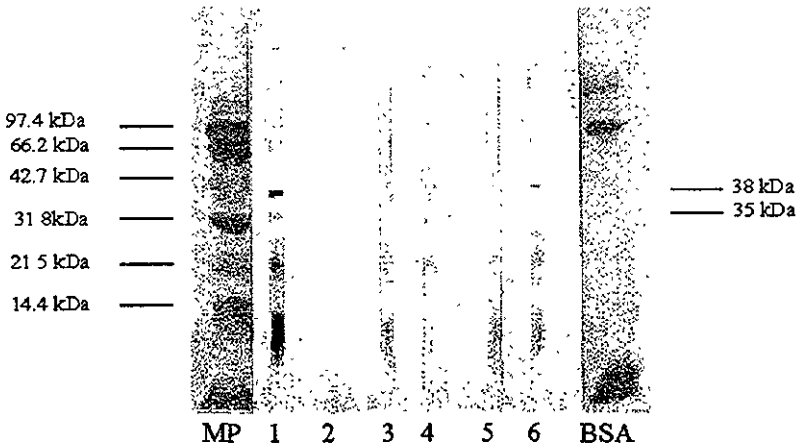


Fig. 12e. MP (marcador de peso molecular); carriles 1, 6 (cepa NIMA); carriles 2-3 (cepas *E. Coli*); carriles 4-5 (cepa *K. pneumoniae*); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 2 infectado CMN; carril 2 cepa reconocida con suero 2 INP; carril 3 cepa reconocida con suero 3 infectado INP; carril 4 cepa reconocida con suero 1 infectado INP; carril 5 cepa reconocida con suero 4 infectado INP; carril 6 cepa reconocida con suero 98 no infectado.

Cuadro 19

NIMA	<i>E. coli</i>	<i>E. Coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	NIMA
38					
33					33
30					
21		20	20		20
suero 2 CMN	suero 2 INP	suero 3 INP	suero 1 INP	suero 4 INP	suero 98 N

Cuadro 20.- Reconocimiento antigénico de proteínas totales de membrana y proteínas de membrana externa de cepas Gram negativas con sueros de infectados.

PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA

Peso molecular (kDa)	<i>B. pertussis</i>			<i>B. coli</i>			<i>E. agglomerans</i>	
	46	74S	76T	52S	50T	50S	45A	45S
	2 CMN 2 INP	2CMN 2 INP		2CMN, 2 INP	2CMN, 2 INP	5CMN, 3INP	2CMN, 2 INP	5CMN, 3 INP
31 kDa	(+) (-)	(+) (-)		(+) (-)	(-) (-)	(-) (-)	(-) (+)	(-) (-)

PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA

	2 INP, 1CMN, 2 CMN	3 INP, 5 CMN	1 INP, 4 INP	2CMN (3 rept), 2CMN	2CMN, 3 INP, 5 CMN	2 CMN, 3 INP	3 INP, 3INP	6 CMN, 6 CMN
31 kDa	(+) (-) (-)	(-) (-)	(-) (-)	(+) (-)	(-) (+) (-)	(-) (-)	(+) (-)	(+) (+)

ESTA TESIS NO SE ALCR
 DE LA BIBLIOTECA

**RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES DE
MEMBRANA DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS
DE NIÑOS NO INFECTADOS**

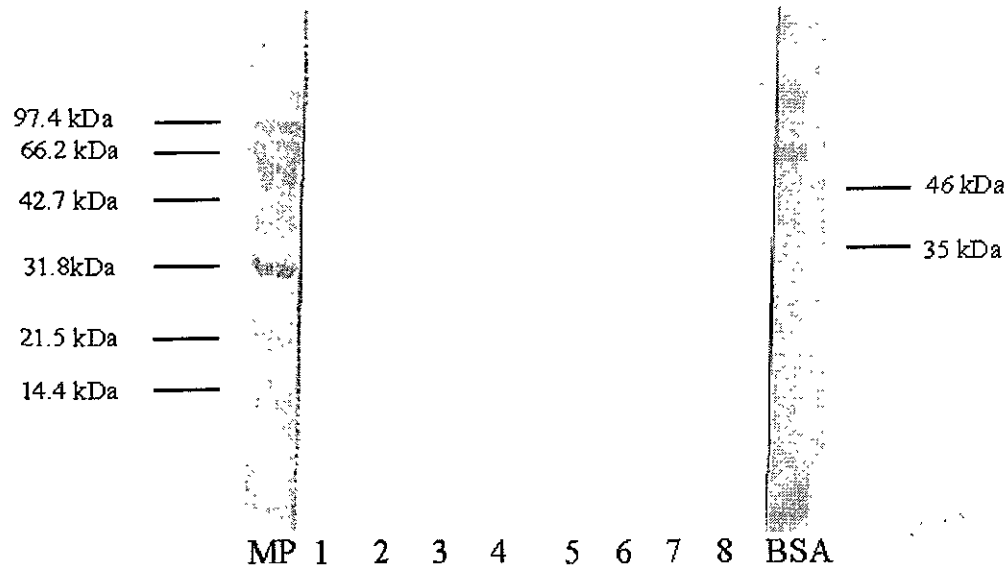


Fig. 13a. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-3 (cepas *E. Coli*); carriles 4-6 (cepas *K pneumoniae*); carriles 7-8 (cepas *E. agglomerans*); BSA (albúmina sérica bovina). Carriles 1-8 cepas reconocidas con suero no infectado (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente).

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS TOTALES DE MEMBRANA DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS

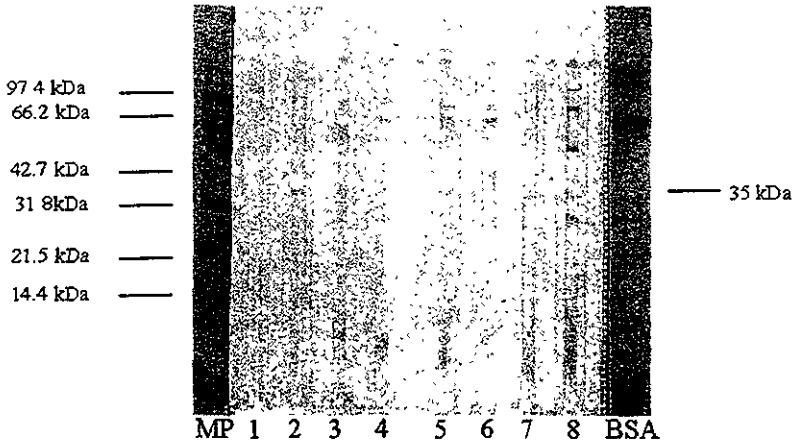


Fig. 13b. MP (marcador de peso molecular); carriles 1-3 (cepas *E. Coli*); carriles 4-6 (cepas *K pneumoniae*); carriles 7-8 (cepas *E. Agglomerans*); BSA (albúmina sérica bovina). Carriles 1-8 cepas reconocidas con suero no infectado (14, 16, 17, 18, 19, 20, 101 y 448 respectivamente).

Cuadro 21

	Pesos moleculares (kDa)			
	66	46	38	35
Sueros no infectados (40)	10/40	2/40	3/40	27/40
	24.5	5	8	68

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS

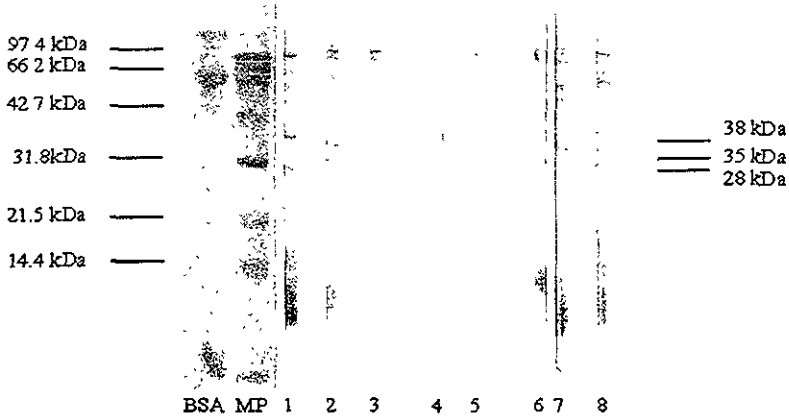


Fig. 14a. BSA (albúmina sérica bovina); MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa US5); carriles 2-4 (cepas *E. coli*); carriles 5-6 (cepas *K. pneumoniae*); carriles 7-8 (cepas *E. agglomerans*). Carriles 1-8 cepas reconocidas con sueros no infectados (411, 411, 115, 101, 184, 158, 448 y 449 respectivamente).

Cuadro 22.

US-5	<i>E. coli</i> 95	<i>E. coli</i> 63	<i>E. coli</i> 56	<i>K. pneumoniae</i> 95	<i>K. pneumoniae</i> 92	<i>E. agglom.</i> 63	<i>E. agglom.</i> 56
95	95	63	56	95	92	63	56
63	63	63	47	63	47	47	47
56	56	35	33	56	33	33	33
		30					
	23						
17							
	13		13				
suero 411 N	suero 411 N	suero 115 N	suero 101 N	suero 184 N	suero 158 N	suero 448 N	suero 449 N

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS

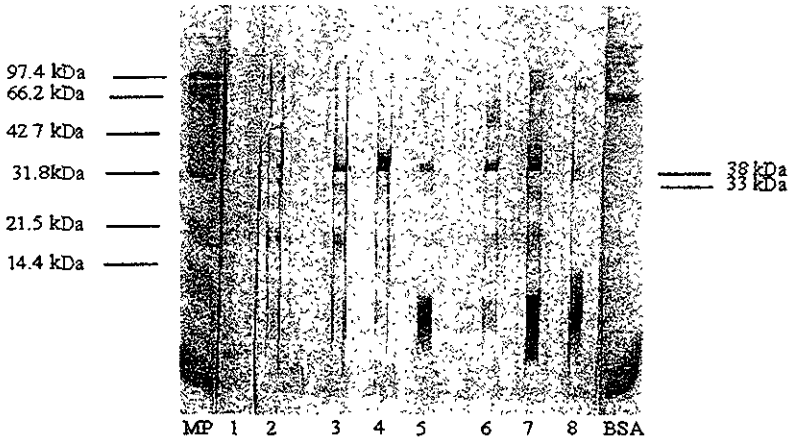


Fig. 14b. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa NIMA) carriles 2-4 (*E.coli*); carriles 5-6 (cepas *K pneumoniae*); carriles 7-8 (cepas *E agglomens*); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 5 CMN; carriles 2-8 cepas reconocidas con sueros no infectados (15, 16, 17, 18, 19, 20 y 133 respectivamente).

Cuadro 23

NIMA	<i>E. coli</i> 529	<i>E. coli</i> 501	<i>E. coli</i> 502	<i>K pneumoniae</i> 546	<i>K pneumoniae</i> 745	<i>E. agglom</i> 454	<i>E. agglom</i> 455
	38	38	38	38	38	38	38
							35
	33	33	33	33	33	33	33
	22	22			22	22	
							16
				14		14	14
suero 5 CMN	suero 15 N	suero 16 N	suero 17 N	suero 18 N	suero 19 N	suero 20 N	suero 133 N

RECONOCIMIENTO ANTIGENICO DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA (PME) DE DIFERENTES CEPAS GRAM-NEGATIVAS CON SUEROS DE NIÑOS NO INFECTADOS

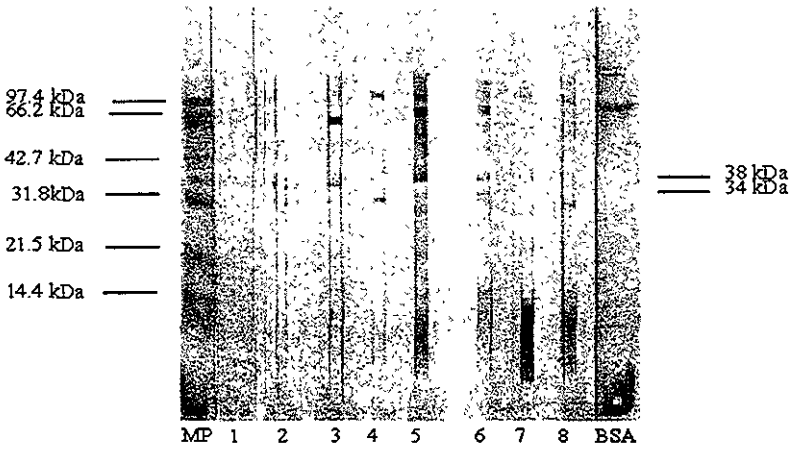


Fig. 14c. MP (marcador de peso molecular); carril 1 (cepa US5) carriles 2-4 (cepas *E.coli*); carriles 5-6 (cepas *K pneumoniae*); carriles 7-8 (cepas *E agglomens*); BSA (albúmina sérica bovina). Carril 1 cepa reconocida con suero 2 CMN; carriles 2-8 cepas reconocidas con sueros no infectados (159, 139, 183, 142, 128, 419 y 422 respectivamente).

Cuadro 24

US-5	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>	<i>K pneumoniae</i>	<i>K pneumoniae</i>	<i>E agglom</i>	<i>E agglom</i>
	38	38	38	38	38	38	
	34		34		34		34
				22			
					16		
				15		15	
suero 2 CMN	suero 159 N	suero 136 N	suero 183N	suero 142 N	suero 128 N	suero 419 N	suero 422 N

Cuadro 25. Frecuencia con la que el suero de niños infectados y no infectados por *S. marcescens* reacciona contra diferentes proteínas de membrana externa de *S. marcescens*.

kDa	Gram-/s. Infectados		Gram-/s. Normales	
	nº	%	nº	%
35	4/8	50	27/40	67
31	3/8	37.5	4/40	10
28			6/40	15
25			4/40	10
19	4/8	50	1/40	2
15	3/8	37	7/40	17

Fig. 15a FRECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. marcescens* CON SUEROS INFECTADOS Y NO INFECTADOS

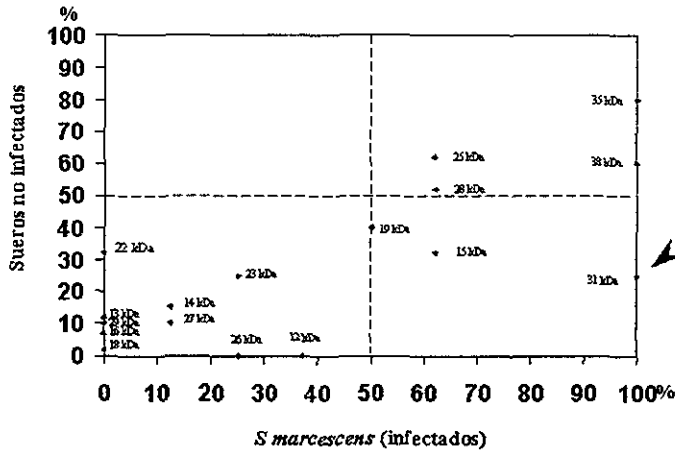


Fig. 15b FRECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE GRAM-NEGATIVOS CON SUEROS INFECTADOS Y NO INFECTADOS

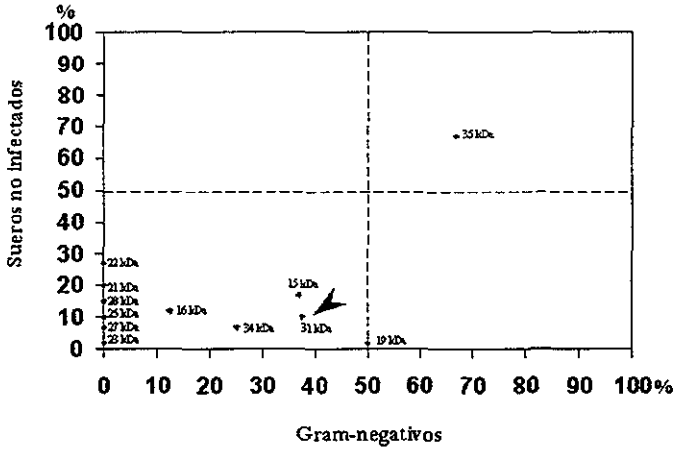
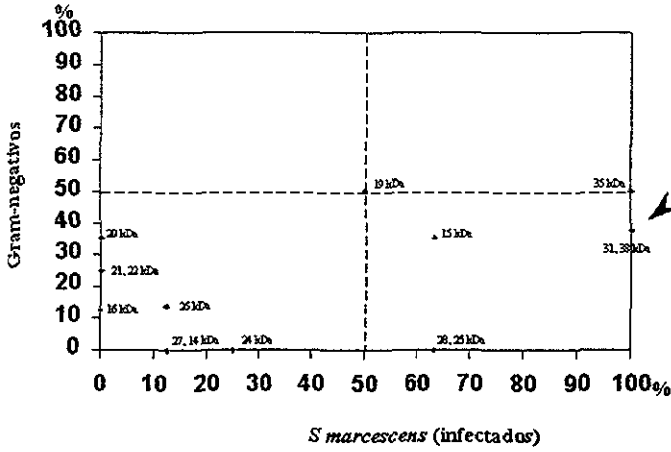


Fig. 15c FRECUENCIAS DE RECONOCIMIENTO ANTIGENICO CON PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *S. marcescens* Y GRAM NEGATIVAS CON SUEROS INFECTADOS



Cuadro 26.- Frecuencias de reconocimiento de cepas de *S. marcescens* con sueros infectados y no infectados por *S. marcescens*.

Infectados por *S. marcescens*

	con serratia (+)	sin serratia (-)	total
c/ respuesta (+)	8	10	18
s/ respuesta (-)	0	30	30
total	8	40	48

Porcentajes de reconocimiento

	con serratia (+)	sin serratia (-)	total
c/ respuesta (+)	100	25	37.5
s/ respuesta (-)	0	75	62.5
total	100	100	100

$p = 0.0001$

Análisis estadístico realizado por prueba exacta de Fisher

Cuadro 27.- Frecuencias de reconocimiento de sueros infectados y no infectados para la proteína de 31kDa en cepas de enterobacterias.

Infectados Eterobacterias

	c/enter (+)	s/enter (-)	total
c/respuesta (+)	3	4	7
s/respuesta (-)	5	36	41
total	8	40	48

Porcentaje de reconocimiento

	c/enter (+)	s/enter (-)	total
c/respuesta (+)	37.5	10	14.6
s/respuesta (-)	62.5	90	85.4
total	100	100	100

p= 0.08

Análisis estadístico realizado por prueba exacta de Fisher

Cuadro 28.- Prueba de sensibilidad y especificidad para conocer la validez de la banda de 31 kDa de *S. marcescens*.

S	=	$\frac{8}{8}$	=	1 X 100	=	100 %
E	=	$\frac{30}{10 + 30}$	=	30/40	=	.75 = 75 %
VPP	=	$\frac{8}{18}$	=	0.44	=	44%
VPN	=	$\frac{30}{30}$	=	1	=	100%

Prueba de validación diagnóstica comparando la respuesta del suero de niños infectados y no infectados contra la proteína de 31 kDa de las cepas de *S. marcescens*

DISCUSION

Serratia marcescens es una bacteria causante de infecciones, principalmente en hospitales. En México, Cornack y Kunin en 1966 referido por Wilhellmi y col. 1987; Williams y col.

S. marcescens tiene participación activa en infecciones que incluyen bacteriemias, septicemias e infecciones principalmente en hospitales. Pedriátricos. Herrera y col en 1998 describen varios casos registrados en 1996. En México en 1998 se reportaron infecciones donde se aisló *S. marcescens*.

Algunos laboratorios bacteriológicos a nivel nacional comensal que se aísla frecuentemente de

Una de las posibles causas por las que se reportan estas infecciones importante es por un subregistro de las infecciones por este microorganismo, como consecuencia de

Hasta el momento no existe un sistema de laboratorio para identificar cepas no pigmentadas, ya que los brotes clínicos y generalmente son comunitarios (de Aguilar y col 1997).

Ante estos problemas se plantea la necesidad de desarrollar métodos que permitan la identificación rápida y adecuada de *S. marcescens* empleando procedimientos con alta especificidad, accesibles a cualquier laboratorio de diagnóstico.

Los métodos inmunológicos permiten la identificación rápida y específica de microorganismos. Hasta el momento existe poca información en la literatura con respecto al empleo de métodos inmunológico para la identificación de *S. marcescens* (Traub y col. 1981, 1983, 1986 y 1990)

El diagnóstico inmunológico es importante por su rapidez y costo, no obstante para implementar estos procedimientos, es indispensable contar con antígenos específicos que puedan ser utilizados para dicho propósito.

En este trabajo se realizó la identificación de proteínas de membrana externa de cepas de *S. marcescens* de origen clínico con el propósito de identificar antígenos que pudieran ser utilizados para la identificación del microorganismo.

Existe poca información en la literatura sobre el empleo de proteínas de membrana externa para tal propósito, los primeros reportes sobre el estudio de las proteínas de membrana de *S. marcescens* fueron descritos por Cole y col 1982; Braun y col 1984; Gutmann y col 1985; Sawai y col 1987 y Malouin y col 1990, quienes han referido que existe alta homología entre las proteínas de *S. marcescens* y las expresadas por otras bacterias. Lo anterior fue establecido mediante el análisis de las secuencias amino terminal de las proteínas y por el aislamiento del

lipopolisacárido, al cual se le ha atribuido ser la causa de la reacción antigénica cruzada entre las proteínas de *S. marcescens* y otras Enterobacterias.

Hotstra y col en 1980, usando antisuero específico contra una proteína (porina) de 38 a 42 kDa de *E. coli*, observaron que esta proteína presentaba reacción cruzada con proteínas de *S. marcescens*, *Salmonella typhimurium* y *Citrobacter freundii*.

En 1990 Traub y Bauer lograron, con técnicas de inmunotransferencia, identificar proteínas con reacción cruzada en particular proteínas de peso molecular de 117, 95, 91, 71, 68, 38 y 33 kDa . En 1992 Singh y col utilizando antisueros monoclonales observaron reacción antigénica cruzada entre proteínas de membrana externa de bacterias entéricas incluyendo *S. marcescens*, contra varios epítopes de *Salmonella typhimurium*. (Pauplet y col 1991; Warobec y col 1988; Gerbl Pieger y col 1991) lo anterior apoya la sugerencia de que la reacción antigénica cruzada que se presenta entre enterobacterias es debida a homología estructural en la secuencia no lineal de la porción del extremo carboxilo terminal de la proteína, el cual es el responsable de la conservación de la estructura B- hélice.

Utilizando PAGE-SDS e inmunotransfrecnia, ambos sistemas de alta resolución que facilitan la identificación y caracterización de los contenidos de proteínas de una muestra se establecieron los patrones electroforéticos tanto para proteínas totales de membrana como para proteínas de membrana externa de las diferentes cepas estudiadas.

Al comparar los patrones electroforéticos obtenidos entre cepas de *S. marcescens* aisladas en el Hospital Pediátrico del Centro Médico Nacional S-XXI en 1995 y cepas aisladas en el Instituto Nacional de Pediatría en 1988-1989 observamos que existe un patrón electrofóretico constante así como alta reproducibilidad tanto en las proteínas totales de membrana como de las proteínas de membrana externa de las diferentes cepas de *S. marcescens* incluidas en el estudio (**Cuadro 2**). Algunas de las bandas identificadas fueron similares a las reportadas previamente en la literatura (Piug, M. Y.col 1992; Larsen, S.B. y col 1993) destacando bandas de peso molecular de 38, 35, 33, 31, 28, 19, y 15 kDa. Esta observación nos permite considerar que la población de cepas de *S. marcescens* estudiada fue homogénea y dichos métodos fueron eficientes para el aislamiento e identificación de las proteínas de membrana externa.

Dentro de las proteínas más constantes en la población estudiada se identificó una banda proteica de 31 kDa de peso molecular que no ha sido reportada previamente por otros autores se observó que dicha proteína estaba en todas las cepas de *S. marcescens* analizadas, encontrándose que su expresión era constante al realizar varias réplicas del ensayo.

En los ensayos de inmunotransferencia, al analizar proteínas de *S. marcescens* observamos variaciones en la respuesta de las diferentes bandas encontradas con los sueros de los pacientes infectados por *S. marcescens* a pesar de la cual se

identificaron antígenos comunes en las poblaciones bacterianas estudiadas los cuales fueron reconocidos con una elevada frecuencia por los sueros empleados los antígenos comunes en las cepas de *S. marcescens* fueron antígenos de 38,35,31,28,25,20,17 y 15 kDa para el caso de las proteínas totales de membrana y los antígenos de 38,35,31,28,19 y 15 kDa cuando se analizaron las proteínas de membrana externa (Cuadro13) la frecuencia con la que mayoría de estas bandas fueron reconocidas por los sueros de niños infectados fue superior al 50%

Se estudió la respuesta de los sueros de los pacientes tanto contra las cepas aisladas de ellos mismos como contra extractos de proteínas de membrana obtenidos a partir de cepas diferentes.

Cuando se compararon los patrones de reconocimiento fue posible establecer la presencia constante de varias proteínas así como la elevada frecuencia de reconocimiento de la proteína de 31 kDa de membrana externa la que comenzó a perfilarse como un candidato susceptible de ser empleado para la identificación específica de *S. marcescens*. Esta proteína de 31 kDa fue reconocida por todos los sueros de los pacientes infectados y de todas las cepas de *S. marcescens* estudiadas (frecuencia 100%).

Al comparar los patrones de reconocimiento antigénico entre sueros de pacientes infectados por *S. marcescens* y pacientes no infectados, se demostró que existen varios antígenos susceptibles de ser reconocidos en ambos casos, proteínas de

38,35,31,28,25,20 kDa de peso molecular fueron identificadas por ambos tipos de suero, lo que evidenciaba una baja especificidad para la identificación de un proceso infeccioso por *S. marcescens* ya que tal respuesta podría ser debida a una respuesta inespecífica, por reacción cruzada, entre antígenos de diferentes bacterias.

Como ya ha sido reportado previamente por diferentes investigadores (Gaston y Pitt 1989,Hutsul, J y col.1993, Gausch J F y col. 1995,Larsen S B 1993;Hostra y col 1980;Singh y col 1992.) se observó que las diferentes Enterobacterias presentan bandas proteínicas comunes a *S. marcescens* que fueron reconocidas por los dos grupos de sueros infectados y no infectados utilizados (**Cuadro 25**).

Para establecer si la proteína de 31 kDa identificada era específica de *S. marcescens* o era un antígeno común entre las enterobacterias, se analizaron extractos de proteínas totales de membrana y de membrana externa de diferentes enterobacterias. Se encontró que *E coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *E. agglomerans* al igual que *S. marcescens* presenta una banda de 31 kDa con la cual reaccionan los sueros de niños infectados y no infectados. Al determinar la frecuencia de reconocimiento se encontró evidencias de que tal proteína es diferente a la de *S. marcescens*. Para el caso de *K. pneumoniae*, la proteína de 31 kDa reconocida por los dos grupos de sueros infectados y no infectados no parece ser de membrana externa debido a la disminución de las frecuencias de reconocimiento

cuando se emplean extractos de membrana externa ó de proteínas totales de membrana (**Cuadro 20**)

Al emplear el sistema gráfico de Larralde y Ximénez para la identificación de los antígenos específicos de *S. marcescens*, se demostró que la PME de 31 kDa es un antígeno de elevada especificidad (100%), que tiene una baja frecuencia de reconocimiento inespecífico por parte de sueros de pacientes no infectados al ser probados contra extractos de otras enterobacterias (37.5%) y con una respuesta discreta en el caso de los sueros no infectados probados contra extractos de *S. marcescens* (10%). Todo esto se presenta en las **figuras 15a,15b y 15c** con las frecuencias de reconocimiento antigénico relevantes de las proteínas de membrana de *S. marcescens* y los antígenos con reacción cruzada de *S. marcescens* con otras Gram-negativas, el cual permite la identificación de fracciones específicas e inmunogénicas.

Lo anterior sugiere que aunque *S. marcescens* y *E. coli* presentan una proteína del mismo peso molecular, ésta es antigénicamente diferente.

De acuerdo al análisis estadístico demuestra que aunque la frecuencia de reactividad contra las proteínas de *S. marcescens* de ambos grupos de sueros mostró pequeñas diferencias, el reconocimiento contra una banda de 31 kDa con los sueros de niños infectados por *S. marcescens* fue muy superior (100%) que la mostrada por los sueros de niños no infectados en los cuales la proporción fue de

sólo un 25% (10 de los 40 sueros) con una alta significancia estadística ($p=0.0001$).

Se determinaron los valores de sensibilidad , especificidad, valores predictivos positivos y valores prédicivos negativos para el caso de las PME de 31 kDa de *S. marcescens* (**Cuadro28**)y demostró que esta proteína si bien resulta ser un antígeno de elevada sensibilidad, posee una moderada especificidad.

Así, esta PME de 31 kDa parece ser un candidato adecuado para el diseño de sistemas de identificación específicos de *S. marcescens*, en la medida en que se emplearan sistemas que incrementase la especificidad de esta proteína propuesta.

Para ello, se plantea la posibilidad de iniciar estudios de identificación de epítopes de la proteína de membrana externa de 31 kDa susceptibles de ser utilizados para incrementar la especificidad de esta proteína, sin menoscabo de la sensibilidad demostrada .

Consideramos conveniente realizar estudios con sueros de niños con un control más estricto para eliminar la posibilidad de que hayan sido infectados por *S. marcescens*.

CONCLUSIONES

- 1.- Se encontraron patrones electroforéticos semejantes, tanto de proteínas totales de membrana como de proteínas de membrana externa, en las 21 cepas de *S. marcescens* estudiadas; las bandas proteicas presentes de manera constante fueron de 38, 35, 31, 28 y 15 kDa.
- 2.- En el caso de las Enterobacterias incluidas en este estudio, los patrones electroforéticos de sus proteínas totales de membrana fueron semejantes a los de *S. marcescens*, pero los patrones de proteínas de membrana externa mostraron una mayor diversidad.
- 3.- Se identificó en *S. marcescens* una proteína de membrana de 31kDa la cual fue reconocida por todos los pacientes infectados; aparentemente ésta es una proteína de membrana externa característica de *S. marcescens*.
- 4.- Se demostró que la proteína de 31 kDa de membrana externa de *S. marcescens* tiene una elevada sensibilidad y una adecuada especificidad como marcador antigénico de esta bacteria.
- 5.- Finalmente, se propone la utilización de esta proteína de membrana externa de 31 kDa de *S. marcescens* como candidato para el desarrollo de una técnica de identificación del microorganismo específica, sensible y de bajo costo.

REFERENCIAS

- Archibald, LK; Corl, A. Shah, B; Shulte, M; Arduino, MJ; Agüero, S; Fisher, DJ; Stechenberg, BW; Bonerje, SN; Javis, W R. (1997). *Serratia marcescens* outbreak associated with extrinsic contamination of 1% chlorxylenol soap. *Infect. Control Hosp. Epidemiol Oct .18: (10) 7049*
- Aucken, HM; Wilkinsen, SG; Pitt, T.I. (1997) Identification of capsular antigens in *Serratia marcescens*. *J. Clin Microbiol 35: (1) 59-63*
- Aucken, HM; Wilkinsen, SG; Pitt, T.I. (1998) Re evaluation of the serotypes of *Serratia marcescens* and separación in two schemes based on lipopolysaccharide (O) and capsular polysaccharide (K) antigens . *Microbiology 144: (Supl 3) 639-53.*
- Borjas, G. E; Serrano, P.G.D.1981 Aislamiento de *S. marcescens* en infecciones hospitalarias del Lab. Hospital Infantil de México. XII Congreso Nacional de Microbiología, Mérida Yucatán.
- Bouza, E., M. García de la Torre, A. Eric, E. Cercenado, E. Loza y M. Rodríguez Créixemes. (1989) Bacteriemia por *Serratia*. *Infectología 8: (8) 405- 420.*
- Bollman, R. Halle, E. Sokolowska T Kohler, W Grauel, E L. Bicholz, P. Klare, I

Tschápe, H. y Witte, W. (1989) Nosocomial infections due to *Serratia marcescens* clinical findings antibiotic susceptibility patterns and fine typing. *Infection* **17**: 294-300

Boquete, T. Vindel A; Martin- Bourgon C; Azanedo Y; Saez- Nieto JA (1996) Epidemiological markers of *Serratia marcescens* isolates nosocomial infections in Spain (1981- 1991) *Microbiologia* **12**: (4) 607- 12

Benz, R. (1988) Structure and function of porins from gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 359-393

Braun , V. (1975) Covalent lipoprotein from outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **45**: 335-377

Braun, G. y Cole S.T. (1984) DNA sequence analysis of the *Serratia marcescens* OmpA gene: implications for the organization of a enterobacterial outer membrane protein . *Mol. Gen. Genet* **195**: 321- 328

Coria-Jiménez. V.R. Ortiz Torres C. Cruz Camarillo R. (1992) Biotyping of *Serratia marcescens* strains of clinical origin. *Rev Lat-amer Microbiol* **34**:253-8.

Coria-Jiménez ,V.R. L Villa-Tanaka and C. Ortiz-Torres (1991) Partial characterization of *Serratia marcescens* nosocomial strains. *Arch. Invest. Med.* **22**:273-278.

Coria- Jiménez, V. R. and Ortiz - Torres C. (1994) Partial characterization of *S. marcescens* strains of clinical origin Epidemiol Infect. **112**: 125- 131.

Coria-Jiménez, V.R. Reyes-Reyes, R. E. Cañedo Solares I. Ortiz-Torres, MC., Solorzano- Santos,F., Diaz- Ponce, H.(1995) Caracterización inicial de cepas de *S. marcescens* de origen intrahospitalario Resumen V foro de Investigación Científica INPed.

Cole, S.T., Sonntag, I., and Henning, U. (1982) Cloning and expression in *Escherichia coli* K-12 of the genes for major outer membrane protein OmpA from *Shigella dysenteriae*, *Enterobacter aerogenes* , and *Serratia marcescens* . J. Bacteriol. **147**: 145-150

Carbonell, G. V. Alfieri, AF. Alfisi AA; Vidotto MC; Ievy CF; Darini AI; Yanaquita RM. (1997) Detection of cytotoxic activity on Vero Cell in clinical isolates of *Serratia marcescens* Braz J. Med. Biol. Res **30**: 119 1291-8

Davis, J. T. M.D.,Foltz, E. M.D., Blakemase, S.W. (1970) *Serratia marcescens* A pathogen of increasing clinical importance. J. Am. Med. Assoc. **214**: 2190- 2192

Farmer, J.J., B Davis and F. Hickman (1976) Detection of *Serratia* outbreaks in Hospital.Lancet ii. 455-459

Farmer III (1976) Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. **23**: 218-225

Flores Calderon, J. Escobedo- Chavéz, E. Franco Del Río, G. Ortega Guzmán, S., Lavallo- Villalobos, A. y Moncada- Barrón D. (1998). Brote epidémico por *Serratia marcescens* en un servicio de Neonatología. Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx. **45**: 512- 516

Gaston, M.A y Pitt, T. (1989) O- antigen specificities of the serotype strains of *Serratia marcescens* J. Clin Microbiol **27**: (12) 2697-2701

Gargallo-Viola, D. (1989) Enzyme polymorphism, prodigiosin production, and plasmid fingerprints in clinical and naturally occurring isolates of *Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol **27**:(5) 860-868.

Gaughran, E. R. (1969) From Superstition to science: The history of a bacterium. Transact. N. Y. Acad, Sciences **31**: (1) 3-24

Gausch JF; Ferrer S, Enfedaque J; Viejo MB; Reque M. (1995) A 17 kDa outer-membrane protein (Omp4) from *Serratia marcescens* confers partial resistance to bacteriocin 28 b when expressed in *Escherichia coli* Microbiology **141** 109 2535-42

Grimont, P. A. D. and Grimont, F.(1978) Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. J. Clin. Microbiol **8**:73-83

Grimont, P.A.D., and Grimont F S Le Minor, B. Davis and F. Pigache. (1979) Compatible result obtained from biotyping and serotyping in *Serratia marcescens*. J. Clin- Microbiol. **10**:425-432.

Gordon. D., M.D. Christensen, and B. Sheldon (1982) Epidemic *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. Importance of the gastrointestinal tract as a reservoir. Infect. Control. **3**:127.

Hamedeh, R.M., R. Mandrell and J. Mc. Lead. (1990) Immunophysical characterization of human isolates of *S. marcescens*. J. Clin. Microbiol. **28** (1). 20-26

Hammer H. (1984) *Serratia marcescens* in neonatal intensive care unit- a 5 year analysis. Pediatric. Grenzgeb. **23**: 299-303.

Hartstein, A.I., V.H. Morthland, J.W. Rourke, R. Sykes, and A.L. Rashad (1993) Plasmid DNA Analysis biotyping, and antibiotic susceptibility as subtyping tests for *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. Diagn. Microbiol Infect. Dis. **16**:35-41

Haddy RT, Mann BI; Nadkarni DD; Cruz RF; Flshoff D.J.; Buendia FC; Domers TA, Oberheu AM (1996). Nosocomial infection in the community hospital: severe infection due to *Serratia* species. J. Fam. Pract **42**: (3) 273- 7

Hejazi A; Falkiner FR.(1997) *Serratia marcescens* J. Med. Microbiol **46**: (11) 903-12

Hazel M. Aucken, Stephen G. Wilkinson and Tyrone L. Pitt (1997) Identification of capsular antigens in *Serratia marcescens* . J. Clin. Microbiol **35**: (1) p 59-63.

Hutsul, J., Worobec, E., Parr, T.R, Jr. y Becker, G. W. (1993) Comparative analyses of *Serratia* spp. outer membrane porin proteins. Can J. Microbiol **39**:442-447

Farmer J.J.III (1972) Epidemiological differentiation of *Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. **23**: 218-225.

Kelly, MT., D.J. Brenner and J.J. Farmer (1985) *Enterobacteriaceae*.En: Lennette, E.A., A. Babws, W. J. Hauster and H.J. Shadomy (eds) Manual of Clinical Microbiology. American Society for Microbiology. Washington. USA.263-277

Larsen S. B. Biedermannk (1993) Isolation and characterization of the outer membrane proteins of *Serratia marcescens* W225 . Anal. Biochemistry **214**: 212-222

Larose P.,B. Picard,Thibault, M. Grimint F y Pitt, (1990) Nosocomial *Serratia marcescens* individualized by five typing methods in a regional hospital. J. Hosp. Infect **15**: 167-172.

Lyerly, D.,A. Kregger (1983) Importance of *Serratia* protease in the pathogenesis of experimental *Serratia marcescens* pneumonia . Infect. Immun. **40**:(1) 113-119

Lewis, A.M., Stephenson, J.R., Garner,J., A. Afshar, F., y Tabaqchali. (1989)An hospital outbreak of *Serratia marcescens* in neurosurgical patients Epidem. Inf. **102**: 69-74

Lazo de la Vega S., J. M. Ruíz, G. Bocanegra G. Estrada, S. Varela, M.C.Girand (1993). Brote de septicemia nosocomial por *Serratia marcescens* multirresistentes. Enf. Infecc. Microbiol. **13**: 26-31

Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Randal, A. L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol. Chem. **193**: 265-275

Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of the bacteriophage T4 Nature **227**: 680-685

Larralde C., Montoya R. M. , Selutta E., Diaz M.L. Gorenzensky T. and Col Torti E. (1989) Decipherencing Western blots of Tapeworm antigens (*Taenia solium* , *Echnococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) Reacting with sera from Neurosysticercosis and Hydatid disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. **40**: 282-290.

Liu, Y., Y. Lau, B.S. Hu, J. Shir, M. Cheung, Z Shi, and W. Tsai. (1994). Use of PCR to study epidemiology of *Serratia marcescens* isolates in nosocomial infection. J. Clin Microbiol. **32**: 1935-1938.

Maeda, H.A. Molla, T. Oda, and T. Katssuki. (1987) Internalization of *Serratia* protease in to cells as an enzyme - inhibitor complex 2 with alfa -2-macroglobulin and regeneration of protease activity and cytotoxicity. J. Biol. Chem. **262**: (23) 10946-10950

Miranda-Novales, M.G., Gordillo-Perez, M.G., Solórzano Santos, F., Y Canos-Miranda, B., Villasis- Keever, M.A., Villegas- Silvia. (1998) Case control study of an outbreak of *S. marcescens* in a neonatal intensive care unitl Rev Invest. Cin. **50**: (1) 13-8.

Miranda ,G., Kelly, C., Solórzano, F., Leños, B., Coria, R., Patterson, J. E. (1997) Use of pulsed-field gel electrophoresis typing to study an outbreak of intensive due to *Serratia marcescens* in Neonatal Intensive Care Unit. J. Clin. Microbiol **34**: 3138-41

Michael, A., Gaston and Tyronel, L., Pitt. (1987) O- antigen specificities of the serotype strains of *Serratia marcescens* J. Clin. Microbiol **27**: (12) 2697-2701

- Molla, A., Matsumoto, K. Oyamada, I. Katssuki, T. and Maeda, H. (1986) Degradation of protease inhibitors immunoglobulins and other serum protein by *Serratia* protease and its toxicity to fibroblasts in Culture. *Infect. Immun.* **53**: (3) 522-529
- Molouin, F., Campbell, G.D., Halpenny, M., Becker, G.W., and Parr, T.R. (1990) Outer membrane and porin characteristics of *Serratia marcescens* grown in vitro and in rat intraperitoneal diffusion chambers. *Infect. Immun* **58**: 1247-1253
- Ogrtop, MI Van Zoeren-Grobbeen D., Verbakel- Salomons FM; Bouenop 1997. *S. marcescens* infections in neonatal departments: descriptions of an outbreak and review off the literature. *J. Hosp.Infect.* **36**: (2) 95-103
- Okuda, T., N. Endo, Y. Osada, and Zen- Yoji H (1984) Outbreak of nosocomial urinary tract. infections caused by *Serratia marcescens* *J.Clin. Microbiol* **20**:(4) 691-695.
- Puig, M. Fuste C. and Viñas, M. (1993) Outer membrane protein from *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbil* **39**: 108-111
- Poole, K., E. and V. Braun (1988) Iron regulation of *Serratia marcescens* hemolysin gene expression. *Infect Immun* **56**: (11) 2967-2971

Ramírez de Aguilar. M.L. Perez Miravete A; Ortiz- Herrera M Coria Jiménez R.(1998) Aislamiento de poblaciones de *Serratia marcescens* de origen clínico en dos institutos pediátricos. Bol. Hosp. Inf. Méx. **55** (1) 24-28

Royo, P., del Valle, O. Baquet, T., (1997) Epidemiology of *Serratia marcescens* between 1987 and 1995 at Vall d'Hebrán Hospital. Enf. Infec. Microbiol. Clin. **15** (10) 519-27.

Rodriguez R.S. (1982) Infecciones cruzadas, un problema intrahospitalario creciente. Bol. Med. Hosp. Inf. Mèx.**39**:775-777

Sanchez, I., Ruiz, N., Leranoz, S., Viñas, M., Ruig, M., (1997) The role of outer membrane in *Serratia marcescens* intrinsic resistance to antibiotic . Microbiologia **13**: (3) 315- 20.

Schaberg, D. R., Alfaord, H. R. Anderson, R, Farmer III J.J. Melly M.A., and Schaffner, W. (1976) An outbreak of nosocomial infections due to multiply resistant *Serratia marcescens* evidencie of iterhospital spread. J. Infect. Dis **134**: 181-188.

Sifuentes–Osornio, J y G Ruiz-Palacios, GM. Gröschell, D.H.M. (1986) Analysis of epidemiological marker of nosocomial *Serratia marcescens* isolates with special reference to the Grimont biotyping system. J. Clin Microbiol. **23**: (2) 230--234

- Smith, P.J.D. Brookfield, D. Shau and J. Gray (1984) An outbreak of *Serratia marcescens* infection in a neonatal unit. Lancet. **1**: 151-153.
- Saito, H.L. Elting G. Bodey and P. Berkey (1989) *Serratia* bacteremia. Review of 118 cases, Rev. Infect. Dis. **11**: (6) 912-920.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Nat. Acad. Sci. **76**: 4350-4354.
- Tada, Y y Yamaguchi, J. (1990) A mayor outer membrane protein of *Serratia marcescens* which was easily solubilised and to bend to calcium FEMS Microbiology Letters **70**: 115-118
- Tello-Zavala, M.C., Posadas-López, M. Gutierrez, Brito. (1993) Brote de bacteremia nosocomial por *S. marcescens* debida a solution antiséptica. Enf. Infec. Microbiol. 313-371
- Traub, W. H., M. Spohr and Bauer, D. (1983) Resistance plasmid and protease independent murine virulence of a multiple-drug-resitant strain of *Serratia marcescens* .Zbl. Bakt. Hyg. A. **256**: 184-1195
- Traub, W.H. Bauer, D. Humoral antibody response of rabbits against experimental *Serratia marcescens* septicemia Int J. Med. Microbiol **273** (4) 481-91

Volkow-Fernandez P S. Ponce de Leon; Sifuentes-Osornio, J. Calva Mercado, J.J. Ruiz Palacios, G.M y Cerbon, M.A (1993) Epidemia de bacteremias primarias por una cepa endémica de *S. marcescens* en la Unidad de Terapia Intensiva. Sal. Públ. México. **33**: 440-447

Wilfert, J.N., F.F, Barrett, W.H. Ewing, M. Finland and E.H. Kass (1970) *Serratia marcescens*, biochemical serological and epidemiological characteristics and antibiotic susceptibility of strains isolated at Boston City Hospital . Appl. Microbiol. **19**: 345-352

Wilkowske, J. C ; Washington , J.; Williams, J. M. and Ritts R. E. Jr (1970) *Serratia marcescens* biochemical characteristics antibiotic susceptibility patterns and clinical significance. J. Am. Med. Assoc. **214**: (12) 2157-2162

Wilhelmi, I. Bernaldo de Quiroz, J. CL. Romero- Vivas, J. Duarte, J.. Rojo E.and Bouza, E. (1987) Epidemic outbreak of *Serratia marcescens* nfection in a cardiac surgery unit. J. Clin. Microbiol. **25**: (7) 1298-1300

Williams, T.W., J.E. Salier , J. Viroslav, V. Knigth, N, Glasgow, and N. Moreland, (1971) *Serratia marcescens* as a post- operative pathogen. Amer. J. Surgery **122**: 64-68.

Ximenez, C. Sosa, O. Leyva, O. Moran, P. Melendro, E. I. (1992) Western blot of *Entamoeba histolytica* antigenic fractions reactivity analysis with seru from intestine amebioses patients. *Ann of Trop. Med and Para.* **86**: 121-127

Ximenez, C. Leyva, O. Moran, P. Ramos, F. Melendro, E.I. (1993) *Entamoeba histolytica*: Antibody response to recient and post invasive events. *Ann. Trop. Med and Para.* **87**: 31-39

Yu, V.L (1979) *Serratia marcescens* historial perspectives and clinical, review N. *Engl. J. Med* **300**: (16) p 887-893.

Yamamoto, T. Ariyoshi, A. Amako, K. (1985) Fimbria-mediated adherence of *Serratia marcescens* US-5 strain to human urinary bladder surface. *Microbiol Immunol* **29**: 677-681.