



T 599.25  
ALO  
met

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉTODOS FENOTÍPICOS Y GENOTÍPICOS  
DE ANÁLISIS INTRAESPECÍFICO

EN *Serratia marcescens*.



TESIS DOCTORAL

R- 21.818

ROBERTO ALONSO FERNANDEZ

MADRID 1991

**METODOS FENOTIPICOS Y GENOTIPICOS**

**DE ANALISIS INTRAESPECIFICO**

**EN *Serratia marcescens*.**

**DIRECTOR DE LA TESIS:**      Dr. D. Fernando BAQUERO MOCHALES  
Jefe del Servicio de Microbiología  
Hospital Ramón y Cajal de Madrid.

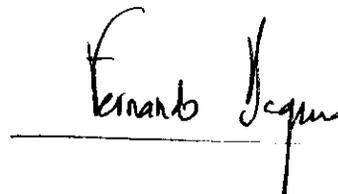
Memoria presentada por D. Roberto ALONSO FERNANDEZ para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid.

D. Fernando BAQUERO MOCHALES, como Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal de Madrid (Instituto Nacional de la Salud), por la presente declaro que:

Roberto ALONSO FERNANDEZ, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, con el título:

"METODOS FENOTIPICOS Y GENOTIPICOS DE ANALISIS  
INTRAESPECIFICO EN *Serratia marcescens*"

Lo que hago constar en Madrid, a 20 de Abril de mil novecientos noventa y uno.

A handwritten signature in black ink, reading "Fernando Baquero". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

FERNANDO BAQUERO

Dr. en Medicina y Cirugía

*A mis padres y hermanas.*

*" Hace doscientos cincuenta años, un hombre oscuro, llamado Leeuwenhoek, curioseó por primera vez en el seno de un mundo nuevo y misterioso, poblado por millares de especies diferentes de seres diminutos: algunos de ellos, feroces y capaces de ocasionar la muerte; otros, beneficiosos y útiles y, en su mayoría, más importantes para la humanidad que cualquier continente o archipiélago. "*

*Paul de Kruif.  
Cazadores de Microbios.*

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente Tesis Doctoral ha podido ser realizada gracias a la ayuda inestimable de las siguientes personas:

Mi director de Tesis, Fernando Baquero Mochales por su continuo apoyo, su buen humor y la aportación de esas ideas geniales que le caracterizan.

El responsable de la Unidad de Genética Molecular Claudio Pérez Díaz por su paciencia, su gran ayuda en el laboratorio y su amistad.

Todos mis compañeros de trabajo en el Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal, adjuntos, residentes y becarios en especial a Esther Culebras López y Carmen Patrón Bravo.

A mi tutora en el Programa de Doctorado "Microbiología Médica", la Dra. Carmen Rodríguez-Avial por su orientación y ayuda.

A la Dra. Marta Rodríguez Creixems por el interés personal que ha demostrado en el desarrollo de este trabajo así como por su ayuda directa en algunos de mis experimentos.

A la Dra. Ana Vindel del Departamento de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III, y a todo su equipo, por la realización de la Fagotipia y Serotipia de las cepas objeto de este estudio.

Al Dr. Javier Hernández, Profesor titular del Departamento de Biotecnología (Sección Microbiología) de la Universidad Politécnica de Valencia por poner a mi disposición su laboratorio para la realización de algunos de mis experimentos, y a todo su equipo, en especial a Alicia Fayos por su colaboración y amistad.

Al Dr. Julio Alonso del Departamento de Bioestadística de la Facultad de C.C. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid por su asesoramiento en la gestión de datos de esta Tesis.

Al Dr. Javier Garaizar y a la Dra. Pilar Aparicio por la importantísima ayuda personal y profesional que me prestaron durante mi estancia en el Reino Unido así como por su profunda amistad.

Al Dr. Barry Cookson director de la Unidad de Infección Hospitalaria y al Dr. Tyrone Pitt responsable de la Unidad de Gram Negativos del Public Health Laboratory Service (Londres), por permitirme realizar parte de esta Tesis en su laboratorio, así como al resto del equipo de la Unidad de Gram Negativos y muy especialmente a Pauline Nicholson por su ayuda y simpatía.

A la Dra. Lennie Dijkshoorn-de Bruin del Bacteriology Department of the Rotterdam University Hospital en Holanda, por su ayuda y orientación en los estudios de análisis de similitud y análisis numérico tan importantes en epidemiología.

Al Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social por la subvención del proyecto y al Ministerio de Educación y Ciencia por la aportación de mi beca personal.

A todos mis amigos por su motivación y apoyo especialmente en los momentos difíciles.

**INDICE**

I. INTRODUCCION .....	1
II. MATERIALES .....	28
2.1. CEPAS BACTERIANAS .....	29
2.1.1. CEPAS ESTUDIADAS .....	29
2.1.2. OTRAS CEPAS .....	30
2.2. MEDIOS DE CULTIVO .....	31
2.2.1. MEDIOS LIQUIDOS .....	31
2.2.2. MEDIOS SOLIDOS .....	32
2.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS .....	34
2.3.1. IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS .....	34
2.3.2. ANTIBIOTICOS EMPLEADOS .....	36
2.3.2.1. DISCOS .....	36
2.3.2.2. POLVO BASE .....	36
2.3.3. KITS .....	37
2.3.4. ENZIMAS EMPLEADAS .....	37
2.3.5. OTROS PRODUCTOS .....	38
2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES .....	39
2.5. EQUIPO .....	43
2.6. MATERIAL INFORMATICO .....	44
2.6.1. HARDWARE .....	44
2.6.2. SOFTWARE .....	45
III. METODOS .....	47
3.1. IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS .....	48

3.2. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS .....	48
3.3. CONDICIONES DE CULTIVO .....	48
3.4. REALIZACION DE ANTIBIOGRAMAS .....	49
3.4.1. ANTIBIOGRAMAS DE DIFUSION DISCO/PLACA .....	49
3.4.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (C.M.I) .....	49
3.4.2.1. DETERMINACION DE LA C.M.I. POR DILUCION EN AGAR .....	49
3.4.2.2. DETERMINACION DE LA C.M.I. POR UN METODO SEMIAUTOMATIZADO .....	50
3.5. TECNICAS DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLOGICO .....	51
3.5.1. TIPACION POR SENSIBILIDAD A BACTERIOCINAS .. (MARCESCINOTIPIA) .....	51
3.5.2. BIOTIPACION .....	52
3.5.2.1. TEST DE REDUCCION DEL TETRATIONATO POTASICO .....	52
3.5.2.2. CAPACIDAD HEMOLITICA .....	53
3.5.2.3. PRODUCCION DE PIGMENTO .....	53
3.5.2.4. TESTS DE UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO .....	53
3.5.3. TIPACION POR CODIGO API 20E .....	54
3.5.4. FAGOTIPACION .....	54
3.5.5. SEROTIPACION .....	55

3.5.6. RIBOTIPACION .....	56
3.5.6.1. EXTRACCION DEL DNA TOTAL	
BACTERIANO .....	56
3.5.6.2. DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE	
RESTRICCION .....	58
3.5.6.3. METODOS DE SOUTHERN BLOTTING .....	59
2.5.6.4. SINTESIS Y MARCAJE DE LA SONDA .....	60
3.5.6.5. PREHIBRIDACION .....	61
3.5.6.6. HIBRIDACION .....	62
3.5.6.7. DETECCION DE LOS GENES .....	62
IV. RESULTADOS .....	64
4.1. IDENTIFICACION BACTERIANA Y PRUEBAS BIOQUIMICAS ..	65
4.1.1. FRECUENCIA RELATIVA DE AISLAMIENTOS DE	
LAS DISTINTAS ESPECIES DEL GENERO <i>Serratia</i> EN	
MEDIO HOSPITALARIO .....	65
4.1.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION .....	65
4.2. SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS .....	67
4.3. TIPACION POR SENSIBILIDAD A BACTERIOCINAS .....	70
4.4. BIOTIPACION.....	75
4.4.1. BIOGRUPOS .....	79
4.4.2. BIOTIPOS .....	79
4.5. TIPACION POR EL SISTEMA API 20E .....	82
4.6. SEROTIPIA Y FAGOTIPIA .....	86
4.6.1. SEROTIPIA .....	86



4.6.2. FAGOTIPIA .....	89
4.6.3. COMBINACION DE SEROTIPIA Y FAGOTIPIA.....	90
4.7. RIBOTIPACION: NUEVO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO PARA <u>Serratia marcescens</u> . .....	90
4.7.1. EXTRACCION DEL DNA TOTAL .....	90
4.7.2. DETERMINACION DE LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCION OPTIMA .....	94
4.7.3. ELECCION DE LAS CEPAS OBJETO DE ESTE ESTUDIO .....	96
4.7.4. RIBOTIPACION DE LAS CEPAS SELECCIONADAS UTILIZANDO <i>SspI</i> COMO ENDONUCLEASA DE RESTRICCION .....	96
4.7.4.1. DETECCION DE FORMA RETROSPECTIVA, DE GRUPOS EPIDEMICOS ENTRE LAS CEPAS DE NUESTRA COLECCION .....	106
4.7.4.2. COMPROBACION MEDIANTE RIBOTIPIA DE EPIDEMIAS EUROPEAS PREESTABLECIDAS POR OTROS METODOS DE TIPACION .....	106
4.8. COMPARACION ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE TIPACION ESTUDIADOS .....	110
4.8.1. OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS ...	110
4.8.2. GRADO DE ACUERDO ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE TIPACION .....	111

V. DISCUSION .....	115
VI. CONCLUSIONES .....	136
VII. BIBLIOGRAFIA .....	139

## **I. INTRODUCCION**

La capacidad de *Serratia marcescens* de crecer sobre cualquier tipo de materia orgánica produciendo un pigmento rojo oscuro (prodigiosina) de aspecto similar al de la sangre, ha creado en torno a este microorganismo un halo de misterio y superstición. Las primeras referencias, aunque indirectas, de individuos del género *Serratia* datan de tan antiguo como del año 332 A.C. cuando las tropas macedonias de Alejandro Magno en la ciudad de Tiro, se enfervorizaron ante la observación de un hecho "milagroso": del interior de las porciones del pan destinado al alimento de la tropa, aparecían gotas de sangre fresca. Este fenómeno fue interpretado como la profecía del triunfo y empujó al previamente desanimado ejército a la victoria. Referencias similares a la narrada anteriormente, se encuentran fácilmente en la literatura hasta mediados del siglo XIX. En 1850 Ehrenberg recopila casi 100 referencias históricas que hacen mención a apariciones milagrosas de sangre en alimentos (1). En 1823 Bartolomeo Bizio, un joven farmacéutico, demuestra que la "sangre" era producida por un organismo vivo clasificado de manera errónea como un hongo. Bizio denomina a este organismo *Serratia marcescens* en honor al físico italiano Serafino Serrati, quien en la opinión de Bizio había sido menospreciado a favor de sus colegas americanos por la invención y desarrollo de la máquina de vapor aplicada al transporte por agua. *Marcescens* deriva de la palabra latina "marceo" que significa "decaer" dado que Bizio observaba que el pigmento y su consistencia evolucionaban rápidamente pasando de una forma rosa-fluída a otra rojo-púrpura de apariencia viscosa. Desde este momento se han sucedido distintos nombres para designar a este microorganismo de entre los que se encuentran *Mucor sanguineus*, *Monas prodigiosa*, *Micrococcus prodigiosus*, *Bacillus prodigiosus*,

*Salmonella marcescens*, *Salmonella prodigiosa*, *Chromobacterium prodigiosum* etc (1). En la primera edición del Manual of Determinative Bacteriology de Bergey publicada en 1923 se volvió a la denominación original de *Serratia marcescens*.

La división del género *Serratia* en sus distintas especies, no ha sido menos conflictiva y se ha visto sujeta a continuos cambios a lo largo del tiempo así como a variaciones importantes entre distintos autores. En la cuarta edición del Manual of Determinative Bacteriology de Bergey se citaban 27 especies dentro del género, 5 en la quinta edición y sólo una en la octava edición (2). La taxonomía aceptada actualmente coincide con la aparecida recientemente en la novena edición del Manual of Determinative Bacteriology de Bergey (3) que considera al género con número de orden VII dentro de la Familia de las *Enterobacteriaceae*, tribu *Klebsiellae*, y lo divide en las siguientes especies: *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidea*, *S. odorifera* y *S. ficaria*. En dicho manual se indica la subdivisión de *S. liquefaciens* en tres geno-especies: *S. liquefaciens* propiamente dicha, *S. proteamaculans* y *S. grimesii*. La antigua especie *S. fonticola* aparece catalogada dentro del apartado *Incertae Sedis*. Posteriormente a la publicación del Manual Bergey's, ha sido aceptado una nueva especie del género: *S. entomophila* (4) que se caracteriza fundamentalmente por su incapacidad de fermentar el sorbitol.

Los miembros del género *Serratia* son bacilos gram negativos cortos y rectos de 0.5–0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro y 0.9–2.0  $\mu\text{m}$  de longitud, generalmente móviles, por bacilos peritricos. Son aneorobios facultativos, oxidasa negativos, fermentan la

glucosa y reducen el nitrato. Son en general indol negativo, Voges-Proskauer

positivo y

Citrato de

Simmons

positivo. Son

productores de

un gran número

Prueba	<i>S. marcescens</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. rubidea</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Alcaligenes</i> spp.
Quitinasa	+	+/-	-	-	-
DNAasa	+	+	+	-	-
Esterasa	+	+	+	-	-
Gelatinasa	+	+	+	-	-
Lecitinasa	+	+	+	-	-
Lipasa	+	+	+	-	-
Arg. dehidrol.	-	-	-	+/-	-
Lactofa	-	+	+	+/-	+
Util. Melonato	-	-	+	+	+
Prod. pigmento	+/-	-	+/-	-	-

Pruebas bioquímicas diferenciales de las distintas especies del género Serratia así como de géneros próximos.

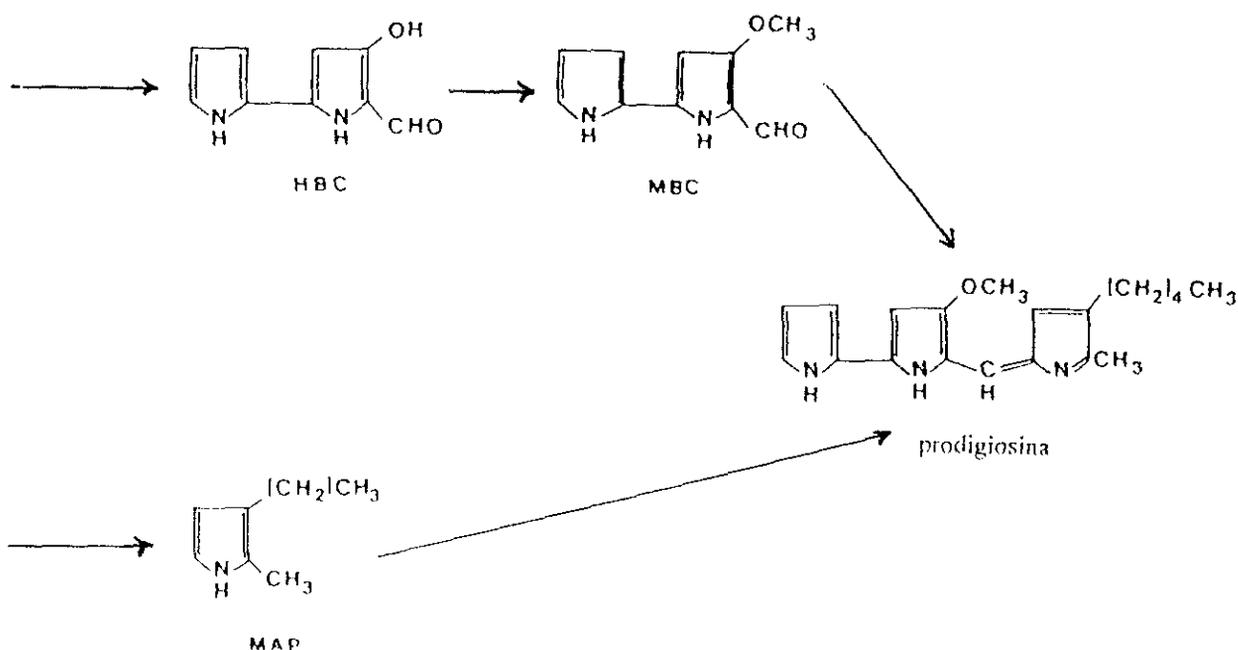
de enzimas que resultan muy útiles en su identificación tales como catalasa, desoxirribonucleasa extracelular, gelatinasa, lipasa, lecitinasa, quitinasa, esterasa (hidrólisis de Tween 80), una proteasa que hidroliza caseína y fibrinolisisina y fosfatasa (2). Algunas pruebas bioquímicas útiles para la diferenciación de las distintas especies, así como de otros miembros próximos de la familia *Enterobacteriaceae* aparecen recogidas en la tabla. Como el resto de *Enterobacteriaceae*, *Serratia spp.* crece bien en medios de cultivo ordinarios, bajo condiciones aerobias o anaerobias. Casi todas las cepas son capaces de crecer en un rango de temperaturas entre 10 y 37°C. a pH entre 5 y 9 y con un contenido de NaCl de 0-4%. Las colonias son generalmente opacas, algo iridiscentes y pueden ser de color blanco, rosa o incluso rojo intenso y tienen un tamaño aproximado de 1.5 a 2 mm. después de una incubación de 18 horas sobre un medio de cultivo nutritivo sólido. Los cultivos pueden producir un olor similar al de la orina o pescado en descomposición atribuido a la producción de trimetilamina y amoniaco (*S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica* y *S. rubidea*) o a humedad similar al de la patata cruda debido a la aparición de 2-metoxi-3-isopropil-pirazina (*S. odorifera*,

*S. ficaria* y *S. rubidea*) (3). A pesar de que este microorganismo no requiere medios especiales para crecer, se han propuesto algunos medios selectivos para su identificación y el cálculo de la incidencia de *Serratia* en diversos tipos de muestras contaminadas tales como heces (2).

Las diversas especies del género *Serratia* se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, pueden encontrarse en las aguas dulces, en las hojas vegetales, frutos, hongos hierbas y musgos. Las plantas pueden constituir el vehículo de entrada al entorno ecológico del hombre. Además muchos insectos están colonizados por miembros del género; algunos de ellos pueden ser patógenos para las numerosas especies de los que se han aislado. Un número considerable de representantes se han establecido en los hospitales, en donde son una causa importante de infección nosocomial (5).

Aunque existen algunos ejemplos en la literatura de aislamientos en muestras clínicas de otras especies de *Serratia* (6,7,8), la especie más difundida y la de mayor relevancia clínica es sin duda alguna *S. marcescens*. La característica fundamental de diferenciación de *S. marcescens* con otros miembros del género es su incapacidad de fermentar la L-arabinosa. Un porcentaje de cepas producen el típico pigmento rojo prodigiosina. Este porcentaje es mayor en las cepas aisladas de medios naturales que en las cepas aisladas en relación con la clínica.

Dos pigmentos pueden ser producidos por *S. marcescens*, prodigiosina y pirimina (3). La prodigiosina (2-metil-3-amil-6-metoxi-5-(2-pirril)-2,2'-dipirrilmeteno) es un pigmento no difusible, insoluble en agua y que está unido a la envuelta celular. Este pigmento es producido por los biotipos A1 y A2 de *S. marcescens*. Las colonias producidas por cepas productoras de prodigiosina son total, o parcialmente rojas. La expresión del pigmento en cepas con dicha capacidad así como la intensidad del mismo en placa, que puede variar entre el naranja, rosa, rojo o magenta, dependen en gran medida de las condiciones ambientales. Las condiciones óptimas se alcanzan en un medio potenciador de la producción, Agar de



Ruta de síntesis de la prodigiosina.

glicerol y peptona (9) y a 33°C (20-35°C). El pigmento no se produce bajo condiciones de anaerobiosis. La síntesis en la célula se lleva a cabo tras la condensación de dos compuestos, el 2-metilo-3-amil-pirrol (MAP) y el 4-metoxi-2-2'-bipirrol-5-carboxaldehído (MBC) (figura). Se han aislado diversos tipos de

mutantes no pigmentados con alteraciones en las rutas de síntesis de cualquiera de los dos precursores. La prodigiosina puede ser sintetizada también, aunque con una frecuencia mucho menor, por *S.plymuthica*, *S. rubidea* y *S. liquefaciens*. El otro pigmento, la pirimina (ácido L-2(2-piridil)-pirrolina-5-carboxílico) (3) es producido por algunas cepas del biotipo A4. Es necesaria la presencia de iones de hierro en el medio de cultivo para su producción. Se trata de un pigmento rosa difusible y soluble en agua. Cuando se produce este pigmento, el medio vira a rosa mientras que las colonias bacterianas permanecen blancas o ligeramente rosadas. También ha sido descrita la producción de un pigmento amarillo difusible por cepas de *Serratia marcescens* (10). Se trata del ácido 2-hidroxi-5-carboximetil mucónico (CHMSA) que es producido por la rotura en meta del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (3,4-DHP) por la enzima 3,4-DHP 2,3-dihidrogenasa. Ambos metabolitos están implicados en el metabolismo de compuestos aromáticos.

Algunas cepas de *Serratia marcescens* son capaces de producir una hemolisina, que, al contrario que otras hemolisinas descritas en bacterias que son excretadas al medio extracelular, permanece asociada a las envueltas celulares. La hemolisina de *Serratia*, está formada por dos unidades proteicas, ShlA y ShlB (11). Parece ser que la subunidad activa es ShlA que actúa integrándose en la membrana de los eritrocitos, formando canales o poros hidrofílicos que provocan lisis osmótica. En este modelo, la subunidad ShlB actuaría como activadora (12). La hemolisina de *Serratia marcescens* no requiere iones calcio, y es dependiente de un metabolismo celular activo.

*Serratia marcescens* es capaz de producir dos tipos distintos de bacteriocinas (marcescinas), unas de producción espontánea, resistentes a tripsina, cloroformo y calor, sensibles a ácidos y con movilidad electroforética, denominadas tipo "A", y otras sensibles a tripsina, cloroformo y calor, resistentes a ácidos y electroforéticamente inmóviles, denominadas tipo "B" (13). Sólo las bacteriocinas de tipo A son activas frente a otras cepas de *Serratia marcescens*. Ambos tipos de bacteriocinas pueden ser producidos por *Serratia odorifera*, mientras que *Serratia rubidea* sólo es capaz de producir las de tipo A, y *Serratia liquefaciens* y *Serratia ficaria* producen sólo las de tipo B (3).

La estructura antigénica de *S. marcescens* es compleja, tres tipos de antígenos pueden diferenciarse: antígenos somáticos u "O", antígenos flagelares o "H" y antígenos de la envuelta celular y cápsula o "K". Desde los 6 primeros antígenos O descritos por Davis y Woodward en 1957 hasta la actualidad, nuevos antígenos somáticos han sido descubiertos hasta llegar al número actual de 24 (O1, O2,..., O24) (14). Dichos antígenos son complejos de naturaleza polisacárida, estables al calor, resistentes a alcoholes, solubles en ácidos y pueden tener cierta utilidad en tipación serológica a pesar del gran número de reacciones cruzadas de aglutinación que ofrecen sus antisueros. Los antígenos flagelares dependen de la variedad y ordenación de los aminoácidos que forman la flagelina del filamento. Hasta la actualidad se han descrito 26 antígenos H (H1, H2,..., H26) (14). Los antígenos K no han sido estudiados en profundidad en *S. marcescens* hasta el momento. Su naturaleza química es glicoprotéica. Se denomina A al antígeno capsular y L y B a

los antígenos de superficie de la envuelta celular. L y B son fácilmente distinguibles por sus diferencias en cuanto a estabilidad al calor (2).

Hasta la década de los 50, *S. marcescens* era considerado un microorganismo saprofito, y ha sido por ello utilizada en numerosas ocasiones como marcador biológico. Cabe destacar el experimento realizado por M.H. Gordon por el cual tras realizar gargarismos con un cultivo líquido de *S. marcescens* recitó pasajes de Shakespeare en la Cámara de los Comunes en la que se habían distribuido placas de agar, para estudiar la posible transmisión oral de microorganismos tras una epidemia de gripe sufrida por los miembros de la cámara; o la aerosolización de cultivos por la aviación americana en 1950 y 1952 sobre San Francisco, Alabama y Florida, con objeto de estudiar la vulnerabilidad de la población americana ante la guerra bacteriológica (15).

Actualmente se sabe que este microorganismo puede estar implicado como agente etiológico en todo tipo de infecciones incluyendo aquellas del tracto respiratorio (absceso pulmonar, bronquiectasis, neumonía y empiema) y del tracto urinario, meningitis, otitis media, peritonitis, endocarditis, infecciones del sistema muscular-esquelético (artritis séptica y osteomielitis), infecciones de heridas y oculares, linfadenitis e infecciones de la piel.

*S. marcescens* es uno de los principales microorganismos causantes de infección nosocomial, y es raro que un paciente ingrese en un hospital ya infectado, con la

excepción de los drogadictos por vía intravenosa. *S. marcescens* infecta de manera preferente a pacientes inmunosuprimidos ya sea por enfermedad o por terapia y a pacientes de unidades de neonatología (15,16). El papel que el personal del hospital desempeña en la transmisión de este microorganismo se asume que es considerable.

El mayor porcentaje de aislamientos proviene de infecciones urinarias (8,17,18). Aproximadamente un 90% de los pacientes con infección urinaria por *S. marcescens* tienen una historia reciente de instrumentación del tracto urinario (cistoscopia, cirugía, cateterización etc) y en gran parte de los casos existen catéteres intravenosos (2). Factores de riesgo importantes son la diabetes mellitus, obstrucción urinaria o disfunción renal. Entre el 30 y el 50% de los pacientes afectados son asintomáticos, y cuando existe sintomatología suele ser fiebre, polaquiuria, disuria, piuria y dolor. *S. marcescens* suele aparecer después de la primera semana de hospitalización y generalmente como agente sobreinfectante. Entre un 3 y un 10% de los casos van seguidos de septicemia (19).

Es igualmente frecuente el aislamiento de *S. marcescens* del tracto respiratorio, aunque parece predominar en este caso la contaminación frente a la infección (20). Frecuentemente se ha aislado este microorganismo en pacientes con bronquitis crónica, enfisema o bronquiectasis, pero la valoración de la actividad infectiva es difícil debido a la patología de base. La neumonitis por *S. marcescens* es rara y generalmente se debe a aspiración de la flora faríngea o a inhalación de aerosoles contaminados. Existen factores de predisposición para la contaminación o infección

tales como la diabetes mellitus, estados postoperatorios, obstrucción (por ejemplo por tumores) enfermedad cardiorespiratoria crónica preexistente o coma. Entre el 30 y el 50% de los pacientes han sufrido manipulación (ventilación, broncoscopia etc.). En el caso de neumonía, la sintomatología consiste en fiebre por encima de los 38.5°C, escalofríos, tos productiva (a veces con pseudohemoptisis debido al pigmento bacteriano o incluso hemoptisis) hipotensión, disnea y dolor torácico (21).

Las bacteriemias suelen producirse con *S. marcescens* como único microorganismo. El origen de la infección suele ser el tracto respiratorio, heridas o quemaduras, la cavidad peritoneal, el tracto genital así como la implantación y cambio de válvulas cardíacas, adicción a drogas de administración intravenosa, utilización de catéteres , soluciones, infusiones o transfusiones contaminadas etc. (22). La fiebre por encima de los 38.5°C, escalofríos, shock (con menos de 80 mm Hg de presión sistólica), y el distrés respiratorio son los síntomas más comunes. Un número considerable de casos desembocan en endocarditis con una sintomatología típica de leucocitosis, anemia, petequias, lesiones pulmonares en endocarditis derecha y de cerebro y extremidades en endocarditis izquierda, embolia cerebrovascular etc. La mortalidad es muy elevada (23,24,25).

También aparecen en la literatura casos de meningitis y absceso cerebral producido por *S. marcescens*. Todas son de adquisición intrahospitalaria y coinciden con septicemia previa en prematuros o neonatos, traumatismo abierto craneoencefálico, neurocirugía o punción lumbar (26,27). Los síntomas son los

propios de meningitis aguda por gram negativos. En el líquido cefalorraquídeo pueden observarse además de los bacilos, pleocitosis polimorfonuclear así como un aumento en niveles de proteínas y descenso en los de glucosa. La mortalidad es muy elevada.

También están descritas infecciones intraabdominales por *S. marcescens* recogiéndose la bacteria de drenajes biliares, absceso hepático y pancreático, exudado peritoneal etc (28).

Se han informado igualmente osteomielitis hematógenas y exógenas causadas tanto por cirugía como por traumatismo abierto. Con un buen tratamiento médico quirúrgico, la prognosis es buena (29,30). En cuanto a infecciones oculares se han reportado conjuntivitis, queratitis y endoftalmitis, en este último caso siempre después de intervenciones quirúrgicas (31,32). Además también hay descritas para este microorganismo infecciones de tejidos blandos tales como las de herida quirúrgica, celulitis, flebitis, infecciones de piel, artritis generalmente hematógenas, otitis media y colonización del tracto gastrointestinal: nariz, faringe e intestino (no existen comunicaciones de gastroenteritis ni enterocolitis) (33).

Existen referencias de aislamientos de otras especies del género *Serratia* en muestras clínicas (*S. liquefaciens*, *S. plymuthica* y *S. rubidea*), obteniéndose de esputos, faringe, bronquios, orina, sangre etc, de cualquier forma, estos hallazgos no son frecuentes y se desconoce su significación clínica (6,7,8).

Uno de los atributos más notables de *S. marcescens* es su capacidad por resistir a los agentes antimicrobianos y servir como depósito para la transmisión de resistencias a otras bacterias en la íntima biosfera de los pacientes hospitalizados. Es frecuente el aislamiento de cepas multirresistentes que ponen en situaciones difíciles al clínico desde el punto de vista de la elección de un tratamiento antibiótico adecuado (34-41). *S. marcescens* es resistente de manera natural a ampicilina, tetraciclinas, macrólidos, antiguas cefalosporinas, polimixina B y colistina (15,42). Por otra parte son frecuentes las cepas resistentes a cloranfenicol, cefamandol y cefoxitina. Numerosos aislamientos poseen plásmidos que codifican para resistencia a penicilinas de amplio espectro, cefalosporinas y aminoglicósidos. Estas resistencias son transferibles a otros microorganismos de importancia nosocomial tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Existen fuertes evidencias que apuntan a la posibilidad de dispersión intergenérica de actividades  $\beta$ -lactamasas mediadas por plásmidos (42). Hace solamente una década, casi todas las cepas de *Serratia* eran sensibles a antibióticos como la gentamicina y tanto ésta como la tobramicina por sí solas o en combinación con  $\beta$ -lactámicos constituían terapias útiles. Actualmente es más que frecuente el aislamiento de cepas resistentes a estos compuestos. Un mecanismo frecuente de resistencia a aminoglicósidos es a través de enzimas plasmídicas modificantes del antibiótico que catalizan fosforilaciones (APH), acetilaciones (AAC) o nucleotidilaciones (ANT) en grupos amino o hidroxilo del aminociclitol o aminoazúcar. La mayoría de cepas resistentes a gentamicina poseen enzimas AAC o ANT que también inactivan a la tobramicina (38,39). Gran número de cepas aisladas en nuestros hospitales son además resistentes a quinolonas del tipo

del ácido nalidíxico o pipemídico, y cada vez son más las cepas resistentes a las fluoroquinolonas del tipo de la norfloxacin o ciprofloxacina por defectos de permeabilidad o alteraciones de la DNA girasa bacteriana (40,41). En la aparición y aumento de estas resistencias, tienen una importancia para nada despreciable la selección de mutantes por utilizaciones indebidas, excesivas e indiscriminadas de los compuestos antibióticos.



Numerosas combinaciones antibióticas han mostrado fenómenos de sinergia frente a cepas multirresistentes de *S. marcescens*, pero ninguna de ellas funciona de manera universal y los métodos necesarios para la determinación de estos fenómenos en el laboratorio son lentos y laboriosos. Para el tratamiento de infecciones serias por *Serratia*, se recomienda la utilización de cefalosporinas de tercera generación, imipenem, amicacina o nuevas quinolonas (42).

Dada la importancia creciente de este microorganismo como causante de infección en medio hospitalario, y su enorme facilidad para la adquisición y transmisión de resistencias a agentes antibacterianos, varios métodos de subespeciación han sido desarrollados, como ayuda a seguimientos epidemiológicos. Las primeras aproximaciones al tema, surgen a partir de la primera descripción de la estructura antigénica de *Serratia marcescens*, en un intento de tipación serológica (14). Desde este momento, se han desarrollado distintos métodos basados en la sensibilidad frente a juegos de fagos, enfrentamiento a sets de cepas productoras de bacteriocinas, comportamiento frente a conjuntos de pruebas bioquímicas,

comportamiento frente a antimicrobianos e incluso técnicas de biología molecular tales como estudios de contenido protéico y producción enzimática con sistemas de electroforesis o análisis de ácidos nucleicos.

Un buen sistema de tipación ha de cumplir tres requerimientos básicos: tipabilidad, reproducibilidad y discriminación. Se entiende por tipabilidad al porcentaje de las bacterias ensayadas que puede ser asignado un valor positivo de tipación. Reproducibilidad es el porcentaje de cepas que ofrecen el mismo resultado cuando se repiten los experimentos, en épocas, lugares y/o por manipuladores distintas. El poder de discriminación se refiere a la capacidad del método de distinguir entre cepas no relacionadas, y viene determinado por el número de tipos definidos por el método y sus frecuencias relativas. Este último valor ( $D$ ), se determina mediante la fórmula de Simpson para el cálculo de la diversidad en poblaciones bacterianas (43,44). Dicha fórmula se detalla a continuación:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j - 1)$$

Donde  $N$  es el número total de cepas en la población,  $s$  es el número de tipos descritos y  $n_j$  es el número de cepas que pertenecen al tipo  $j$ .

5306075053

La técnica de rutina de **serotipia** para *Serratia marcescens* se basa en la aglutinación de las cepas con los anticuerpos formados frente a antígenos somáticos. Generalmente no se consideran otros tipos de antígenos. Los inóculos utilizados para inmunizar a los animales, han de ser crecidos en placas y para obtener resultados óptimos deberán formar colonias lisas y suspensiones homogéneas en suero salino (2). Con dichas placas se inoculan medios líquidos con colonias aisladas, que se incuban durante tiempos que dependen de cada laboratorio. Posteriormente se inactivan los componentes termolábiles por exposición a fuentes de calor, y los caldos así tratados son utilizados para la inmunización. El esquema de inmunización no suele sobrepasar las tres semanas, en las cuales se efectúan inyecciones intravenosas a periodos de tiempo regulares. El tiempo y temperatura de incubación, dosis inyectadas y longitud del tiempo de inmunización varían respecto del laboratorio. Los dos factores más importantes a considerar son el número de células por mililitro y el medio de incubación de la cepa. Al cabo del tiempo de inmunización se obtienen los antisueros que se conservarán preferentemente alicuotados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Antes de su utilización se realizará una titulación para determinar la dilución óptima para la aglutinación (45). A pesar de que la técnica debería realizarse en tubo (46), tradicionalmente se realiza sobre porta por facilitar enormemente la labor. Sobre un portaobjetos se coloca un volumen de una suspensión bacteriana previamente tratada con calor, y otro de la dilución del antisuero correspondiente. Tras ligera agitación se interpretará el resultado como positivo si aparecen aglomerados granulosos. La distribución de los serogrupos es variable, aunque el serotipo más frecuente es, con mucho, el O:14 (que puede llegar

a ser encontrado en un 50% de las cepas), apareciendo también con relativa frecuencia las serotipos O:2, O:3, O:4, O:6 y O:11 (47). Recientemente, han sido descritos dos nuevos antígenos somáticos de *Serratia marcescens*, el O:1254 y el O:3255 (48).

El porcentaje de cepas clasificadas como no tipables puede oscilar entre un 5 y un 30%. En algún caso puede ser de utilidad autoclavar el cultivo problema durante 2 horas y enfrentar a diluciones menores de los sueros patrones (2). Otros problemas que presenta la técnica son, por un lado, el bajo grado de discriminación, y por otro el gran número de reacciones cruzadas que pueden llevar a tipaciones erróneas. Se han registrado reacciones cruzadas del antígeno O:14 con los antisueros O:1, O:6 y O:12 así como entre las parejas O:6/O:12, O:9/O:15, O:17/O:19, O:10/O:22 y O:16/O:20 (14). Igualmente se han informado variaciones antigénicas a lo largo del tiempo (49). Algunos trabajos recientes (14,50) que se basan en la extracción e inmuno-electroforesis de LPS de *Serratias* del serotipo O:14, han demostrado que existe una heterogeneidad de dichas cepas en cuanto a su perfil de LPS y que las distintas variedades reaccionan de manera específica con distintos antisueros (O:14, O:6, O:8 y O:21). Podría ser que la falsa clasificación de muchas cepas como pertenecientes al serotipo O:14 se deba a un enmascaramiento antigénico por lipopolisacáridos microcapsulares.

Actualmente se está desarrollando por el equipo de la Unidad de Gram negativos en el Public Health Laboratory Service del Reino Unido (datos no publicados) un

sistema ELISA de serotipación de *Serratia*, basado en reacciones enzimáticas con fosfatasa alcalina, que permiten la optimización de los resultados. Dicha técnica se realiza sobre placas microtiter con los antígenos inmovilizados y son de interpretación automática con un lector de ELISA.

Por todos los motivos explicados anteriormente se considera que la serotipación de antígenos somáticos en *Serratia marcescens*, por sí sola, es insuficiente para ser utilizada como marcador en estudios epidemiológicos.

Las primeras referencias de intentos de **tipación de *Serratia* por sensibilidad a bacteriófagos** datan del año 1964 (51) y desde ese momento, se han sucedido propuestas de juegos de fagos con este propósito. Las técnicas actuales, se basan en la utilización de los nueve bacteriófagos seleccionados por Farmer en 1976 (52) de entre más de cien previamente aislados y ensayados por distintos autores. Actualmente, en algunos laboratorios se ha incrementado el número de fagos a 11 o 12. Dado que dicha técnica de tipación es extremadamente subjetiva, diferencias de un máximo de dos fagos entre dos cepas distintas no se consideran. Igualmente, no deben compararse resultados obtenidos en distintos lugares y en distintos momentos. La fagotipación, en el caso de *S. marcescens*, se utiliza exclusivamente para diferenciar cepas del mismo serogrupo (53,54).

La combinación de serotipia y fagotipia es la técnica aceptada en la actualidad como método de referencia para *S. marcescens*.

Distintos son los **métodos de tipación relacionados con bacteriocinas**. La mayoría se basan en la sensibilidad de las cepas a marcescinas, mientras que otros consisten en la inducción de la producción de bacteriocinas que se enfrentarán a una serie de cepas indicadoras. Un ejemplo clásico del primer grupo de técnicas, es el propuesto por Traub en 1971 (55) que consiste en la inducción de marcescinas del tipo A con Mitomicina C, por un juego de 10 cepas patrones. Estas marcescinas, tras ser purificadas y tituladas, se ensayan sobre el microorganismo problema, de manera que el patrón de inhibición será considerado como marcador. Otro método similar, es el propuesto por Farmer en 1972, que induce la producción con Mitomicina C de bacteriocinas de tipo A en un juego de 12 cepas patrones (56).

Dentro del segundo grupo de técnicas, cabe destacar igualmente la aportación de Traub (57), que decide recoger una serie de aislamientos clasificados como "no tipables" por su técnica anterior, inducir la producción de bacteriocinas A con mitomicina C y ensayar estas marcescinas frente a un juego de 15 cepas indicadoras, consistente éste en las 10 cepas productoras de marcescina en el método propuesto previamente, las 3 cepas utilizadas en su método anterior para la titulación de las marcescinas, y dos aislamientos clínicos de *S. marcescens*. Paralelamente, Farmer (58) pone a punto una técnica similar que utiliza 9 cepas indicadoras, y que incorpora la ventaja de que no es necesaria la utilización de cloroformo para eliminar a las células viables tras la producción de las marcescinas dado que la placa en la que se va a realizar la inhibición contiene sulfato de estreptomicina. Previamente, a las nueve cepas indicadoras se les confería resistencia para este antibiótico.

Años más tarde, Anderhub (59) propone un nuevo método basado en un sistema de siembra cruzada de cepas problema con cepas patrones. En este caso no se induce producción de marcescinas con Mitomicina C y se trabaja con células vivas, no siendo necesario por tanto fraccionamiento ni purificación.

Con la técnica inicial de Traub, se detectaron de manera provisional 73 tipos distintos, de los cuales los más frecuentes eran los números 1,4,9,14,15,18 y 21. El porcentaje de cepas no tipables giraba en torno al 10%, recomendándose el empleo del método "inverso" para la tipación de estas cepas. La técnica "directa" de Farmer permitió distinguir 79 tipos, y la "inversa" 72.

El establecimiento del **biotipo** se basa en la heterogeneidad bioquímica que presentan los individuos de una misma especie. Hace ya 20 años que *Analitab products* lanzó un micrométodo para la identificación de *Enterobacteriaceae*, el API 20E. Dicho sistema consiste en un conjunto de 20 "cupulas" de plástico fijadas a un soporte. Cada cúpula contiene el sustrato deshidratado para un test distinto. Los resultados de esas 20 pruebas junto con el de la actividad oxidasa, constituye un biotipo que es expresado en un número de siete dígitos (47). El método es fácil y comodo en su realización, sin embargo su reproducibilidad es más que criticable (60). Este hecho puede deberse a que en un "micrométodo" como el API, diferencias en la densidad microbiana del inóculo pueden ser críticas.

Otra aproximación al tema, fue la propuesta por Grimont y Grimont (9). Utilizando la capacidad variable de *S. marcescens* de utilizar ocho fuentes de carbono, reducir el tetrionato potásico, producir pigmento y hemolizar la sangre de caballo. Esta aportación ofrece un sistema de fácil manipulación, excepto en la preparación de los medios, pero con el inconveniente de requerir incubaciones prolongadas (hasta de 14 días).

El uso de la **antibiotipia** en la caracterización de epidemias no es demasiado útil y no debe de emplearse salvo en el caso de aparición de patrones poco habituales (61). Esto es debido a la gran variabilidad de una cepa en cortos periodos de tiempo debido a la pérdida o ganancia de elementos plasmídicos o a la selección de mutantes. Frecuentemente, en brotes epidémicos comunes, cepas del mismo subtipo presentan antibiotipos distintos. Es posible igualmente el caso inverso, cepas con igual patrón de sensibilidad que no mantienen relación epidémica en absoluto. Las variaciones potenciales dentro de un subtipo contribuyen a la confusión resultante de un intento de utilización de patrones de sensibilidad a antibióticos como método de subespeciación.

El hecho de que ninguno de los métodos de tipación bacteriana clásicos sea óptimo para la caracterización de epidemias de *S. marcescens*, hace necesaria o bien la utilización de combinaciones de técnicas, que frecuentemente incrementan los costos y suponen una demora en la obtención de los resultados, o el desarrollo de nuevos métodos de tipación más efectivos para este microorganismo. Actualmente

este último objetivo se enfoca hacia las **técnicas de biología molecular** como pueden ser el análisis de isoenzimas por isoelectroenfoque, antígenos somáticos y capsulares por técnicas de radioinmunoensayo en fase sólida y PAGE (poliacrilamida gel electrophoresis), análisis de proteínas, obtención y análisis de plásmidos y análisis de restricción e hibridación de DNA cromosómico. Muchas de estas técnicas no han sido ensayadas hasta la actualidad en *Serratia marcescens*.

Los perfiles proteicos en electroforesis de geles de poliacrilamida, aplicados a la epidemiología han sido recientemente estudiados en profundidad para el caso de *Acinetobacter spp.*. El análisis visual de patrones de proteínas de envolturas celulares en PAGE, han aportado un alto grado de discriminación asignando además un perfil a cada cepa (62,63). Se han realizado ensayos preliminares de análisis proteicos en *Serratia marcescens* (64), en los que se, se evaluaron perfiles de proteínas de membrana externa (OMP), sin embargo, el reducido número de cepas ensayadas impiden la obtención de conclusiones al respecto.

Algunos autores se han dedicado igualmente al estudio de plásmidos como marcadores epidemiológicos (65,66), sin embargo pensamos que su inestabilidad en el tiempo los hacen no aptos para este propósito.

El estudio del DNA cromosómico de distintos microorganismos con fines de subespeciación, parece ser un campo prometedor (67,68). El denominado análisis de fragmentos de restricción de DNA cromosómico bacteriano (69) (BRENDA), es

capaz de detectar diferencias minoritarias genéticas entre los microorganismos. Las endonucleasas de restricción cortan el DNA específicamente en fragmentos de distintas longitudes, dependiendo del número y posición de las secuencias individuales de reconocimiento. Pueden así reconocerse polimorfismos, denominación que se refiere al cambio que se produce en un sitio de reconocimiento de una enzima de restricción. Si en el genoma se produce un cambio de secuencia (incluso una mutación que conlleve cambio exclusivo de una base), puede que una diana de restricción desaparezca o se cree de nuevo y resulte así en la aparición de un polimorfismo en un fragmento de restricción (RFLP). La importancia, para propósitos epidemiológicos, se debe a que estos polimorfismos frecuentemente representan mutaciones "neutras" que no suelen significar cambios fenotípicos (69). Los fragmentos de DNA generados tras digestiones con enzimas de restricción, son separados según su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa. Se han utilizado los patrones de restricción para distinguir entre cepas de distintos géneros bacterianos, incluyendo algunos de importancia clínica tales como *Yersinia*, *Campylobacter*, *Legionella* y *Mycobacterium* (66,70,71), así como microorganismos de otros grupos tales como *Candida*, *Giardia* y *Citomegalovirus*. Existe un trabajo que se refiere a la utilización de este tipo de análisis para la caracterización de una epidemia de *Serratia* en una unidad de neonatología (72). La utilidad de tales patrones, viene limitada por el enorme número de bandas que se obtienen (frecuentemente más de 50), dependiendo de la frecuencia de corte de la enzima utilizada y la el DNA del microorganismo. Es difícil, por lo tanto, identificar bandas minoritarias. Existe además la posibilidad de que en cepas portadoras de plásmidos,

las diferencias en el patrón de bandas cromosómicas aparezcan enmascaradas por las bandas de fondo producidas por la digestión del DNA extracromosómico. El análisis de los patrones de restricción es difícil y cansado a simple vista, aunque existen sistemas computerizados de análisis tales como scanners o densitómetros acoplados a ordenadores (73).

Cuando los fragmentos de DNA separados por electroforesis, son transferidos a filtros de nitrocelulosa o nylon, la localización en la membrana de un fragmento de restricción que contiene un gen concreto, o una secuencia de nucleótidos, puede ser detectados por hibridación con sondas de ácidos nucleicos. Las bandas híbridas resultantes proporcionan un patrón reproducible que aporta la ventaja de reducir enormemente el número de bandas, de esta manera se facilita las comparaciones entre cepas (69). La reacción de hibridación precisa de un DNA diana, una sonda, y una molécula de detección asociada a la sonda que servirá para evidenciar las bandas híbridas. Tradicionalmente se han utilizado en técnicas de hibridación como moléculas de detección isótopos radiactivos, aunque actualmente y con estos propósitos concretos, se tiende a la utilización de moléculas no isotópicas tales como la digoxigenina, la biotina o compuestos fluorados. Estos marcajes no radiactivos, facilitan enormemente la labor con vistas a ser realizada en laboratorios que no cuentan con una gran infraestructura.

La biotina se incluye como radical en nucleótidos presentes en la sonda, generalmente UTP o dUTP (fig 1.1), tras la hibridación, se tratará el filtro con estreptavidina o avidina que forman un puente entre la biotina y la enzima que va a permitir la visualización, generalmente fosfatasa alcalina (polímeros biotinilados).

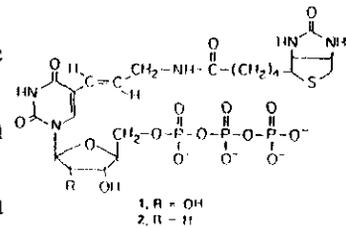


Fig 1.1

El sustrato de la reacción está formado por el complejo Nitroblue tetrazolium y Bromo-cloro-indol-fosfato (NBT-BCIP), que tras ser modificado enzimáticamente vira de amarillo a azul precipitando en el lugar de la modificación y permitiendo así la visualización de las bandas (Figura) (74,75,76).

Las sondas utilizadas en estudios epidemiológicos, pueden ser de naturaleza variada, desde secuencias cromosómicas extraídas al azar y clonadas (77), a genes que codifican para la producción de toxinas (78). Las sondas empleadas más frecuentemente son secuencias de RNA ribosómico; este tipo de sondas ha sido utilizada de manera experimental en estudios de epidemiología molecular de diversas bacterias (79,80). La razón de la utilización de estas sondas, se debe al alto grado de conservación de estos genes (81). Un cistrón de rRNA bacteriano, consiste en un fragmento de 4600 pares de bases que comprende distintas secuencias: genes para la producción de 23S rRNA (2500 pb), 16 rRNA (1500 pb), 5S rRNA (120 pb) y distintas secuencias intermedias y secuencias extremas. Dentro de los cistrones, los genes que codifican para rRNA aparecen asociados en "clusters" cada uno de los

cuales contiene varias copias de los genes 16S–23S–5S en el orden citado. Además, dichos cistrones están repetidos en el DNA genómico hasta un máximo de 11 veces. En las bacterias, los cistrones rRNA parecen haber cambiado minimamente a lo largo de la evolución, y así las sondas específicas de estas secuencias pueden detectar un amplio rango de microorganismos. El hecho es que el rRNA de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* hibrida "in vitro" con los cistrones de rRNA en gran cantidad de microorganismos gram-positivos y gram-negativos (79). La distinta localización en el cromosoma de las múltiples secuencias codificantes de 16S y 23S rRNA en diversas cepas, así como la posibilidad de alteraciones genéticas que conlleven cambios en las zonas de reconocimiento de enzimas de restricción, proporcionan una variabilidad en la topología del DNA bacteriano, que puede ser estudiada con la técnica de ribotipia. En esta técnica, el DNA total del microorganismo, se somete a digestión por enzimas de restricción, se separan sus fragmentos por electroforesis en agarosa y se determina la presencia en los mismos de zonas codificantes para 16S–23S rRNA mediante hibridación con sondas específicas. Esta técnica de tipado ha sido llevada a cabo con multitud de microorganismos, destacando las publicaciones realizadas con *Mycoplasma spp.*, *Providencia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Haemophilus spp.*, *Salmonella spp.*, *Legionella spp.*, *Campylobacter spp.* y *Fusobacterium spp.* (82–90). Esta aproximación no ha sido abordada con el género *Serratia* hasta el momento.

Las medidas de control para prevenir la infección por *S. marcescens* deben centrarse en prestar una especial atención a las fuentes de contaminación con este

patógeno. Sería ideal, aunque quizás utópico, poder separar a pacientes con colonización o infección en los tractos urinarios o respiratorios, del resto de los pacientes, reduciéndose así enormemente el riesgo de infección cruzada. Las infecciones asociadas al uso de catéteres urinarios, podrían reducirse si se utilizasen sistemas cerrados de drenaje, limitando el uso de irrigaciones y retirando el catéter tan pronto como fuese posible. Toda manipulación de vías respiratorias o tracto urinario, debería ser realizada bajo las más estrictas medidas de higiene. La forma más frecuente de transmisión se debe al personal hospitalario. La importancia de los lavados de manos debe de ser subrayada. Es esencial la rápida detección de situaciones epidémicas. Deben, por ello, potenciarse el estudio de técnicas de tipación epidemiológica y desarrollarse nuevos sistemas, objetivos y rápidos, que aporten reproducibilidad, tipabilidad y discriminación. Conocida la presencia de una misma cepa en varios enfermos, los programas de vigilancia epidemiológica permitirán la detección rápida de pacientes colonizados o infectados y la identificación de reservorios nosocomiales, permitiendo así una rápida aplicación de medidas de control.

## **II. MATERIALES**

## 2.1. CEPAS BACTERIANAS.

### 2.1.1. CEPAS ESTUDIADAS.

Se estudiaron 209 aislamientos clínicos de *Serratia* recogidos en cinco Hospitales de Madrid, durante un período de 28 meses comprendidos entre febrero de 1988 y junio de 1990. Los Hospitales incluidos en este estudio, así como el número de cepas recogidas en cada Hospital se detalla en la tabla I.

Las 18 cepas procedentes de la Ciudad Sanitaria "La Paz" corresponden a los primeros aislamientos clínicos de *Serratia marcescens* comunicados en España y fueron obtenidos por Baquero en 1969 (92).

Las muestras de las que fueron aisladas las cepas objeto de este estudio, aparecen reflejadas en la tabla II. En la tabla III se muestran los Servicios de los que proceden dichas cepas.

Asímismo, para estudiar la validez de la ribotipia como marcador epidemiológico, se estudiaron cepas representativas de las siguientes epidemias Europeas: del Hospital de St. James en Dublín 23 aislamientos en 1987, 11 aislamientos en 1989 y 30 aislamientos en 1990; del Hospital de Chase Farm en Enfield (Londres), 9 aislamientos en 1989; del Royal Infirmary en Leicester, 16 aislamientos en 1990; del Bereich Medizin (Charité) Der Humboldt-Universität zu

HOSPITAL		NUM. DE AISLAMIENTOS
Ciudad Sanitaria "La Paz"	(A)	18
Fundación Jiménez Díaz	(B)	13
Hospital Gregorio Marañón	(C)	33
Hospital Ramón y Cajal	(D)	81
Hospital Univ. de San Carlos	(E)	64

TABLA I. Hospitales estudiados y número de cepas recogidas en cada uno.

MUESTRAS	FRECUENCIA
Urocultivos	50.0 %
Tracto respiratorio	12.7 %
Heridas quirúrgica	8.4 %
Ambientales	7.7 %
Hemocultivos	6.4 %
Catéter	4.2 %
Abscesos	4.2 %
Dermatológicas	2.1 %
LCR	1.4 %
Líquidos pleurales	0.7 %
Líquidos ascíticos	0.7 %
Exudados conjuntivales	0.7 %
Exudados óticos	0.7 %

TABLA II. Muestras de las que se aislaron las cepas estudiadas.

SERVICIOS	FRECUENCIA
<u>Áreas quirúrgicas:</u>	
Cirugía gral.	
Urología	
Nefrología	
Traumatología	44.80%
<u>Áreas de bajo riesgo:</u>	
Rehabilitación	
Ambulantes	
Med. Preventiva	26.04%
<u>Áreas de alto riesgo:</u>	
UVIs	
Unidades de reanimación	
Hematología	15.60%
<u>Áreas médicas:</u>	
Medicina Interna	
Endocrinología	
Gastroenterología	
Unidad Pediátrica	
Cardiología	
Urgencias	13.50%

TABLA III. Procedencia de las cepas.

Berlin Institute fur Mikrobiologie en Berlín, 73 aislamientos en 1990, y en el Academisch Ziekenhuis en Rotterdam, 15 aislamientos en 1990.

### 2.1.2. OTRAS CEPAS.

*Serratia marcescens* ATCC 8100 se utilizó como microorganismo patrón para estudios epidemiológicos, así como para estudios de resistencia a antibióticos.

Cepas patrón de Traub para estudios de sensibilidad a bacteriocinas números 5, 10, 12, 16, 17, 18, 31, 33, 43 y 46 (55), suministradas a la Unidad de Epidemiología del Servicio de Microbiología del Hospital Ramón y Cajal en el año 1978 por el Dr. Rafael Gómez Lus, Jefe del Departamento de Microbiología de la Universidad de Zaragoza.

*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 se utilizaron como control en la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias a los antibióticos estudiados (93).

## 2.2 MEDIOS DE CULTIVO.

### 2.2.1. MEDIOS LIQUIDOS.

Infusión de Cerebro y Corazón (DIAGNOSTICS PASTEUR): Se utilizó como caldo nutritivo.

Caldo de Mueller Hinton (DIFCO): Se utilizó para la realización de antibiogramas por la técnica de dilución en caldo (93). Se preparó con 21 g del producto por litro de disolución.

Caldo LB: Se utilizó como caldo nutritivo. Contiene por cada litro de agua destilada:

Bacto triptona (DIFCO) .....	10 g
Extracto de levadura (DIFCO) ..	5 g
CINa (MERCK) .....	5 g

Medio líquido de Le Minor et al (9,94,95): Se utilizó para estudiar la reducción del tetrionato potásico. Dicho medio contiene:

K <sub>2</sub> S <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .....	5 g
Azul de Bromotimol	
(sol. acuosa 0.2% p/v) ....	25 ml
Peptona (DIFCO) .....	10 g
Agua destilada hasta .....	1 l

Caldo de Trypticasa y Soja (TSB, DIFCO): Se utilizó en determinación de sensibilidad a bacteriocinas (marcescinotipia) (55).

### 2.2.2. MEDIOS SOLIDOS.

Agar de Columbia con 5% de Sangre de Caballo (BECTON DICKINSON): Se utilizó como medio de cultivo general, así como para poner de manifiesto la actividad hemolítica de los microorganismos.

Agar de MacConkey (DIFCO): Se utilizó como medio selectivo diferencial para el cultivo de bacilos entéricos gram negativos.

Agar de MacConkey sin Cristal Violeta (DIFCO): Se utilizó como medio para el estudio de sensibilidad a bacteriocinas (marcescinotipia) (55).

Agar de Müller Hinton (DIFCO): Fue utilizado para la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias por el método de dilución en agar (93).

Agar DNAasa con verde de metilo (DIFCO): Fue utilizado para poner de manifiesto la producción de DNasa por los microorganismos.

Para la biotipación de las cepas estudiadas se utilizó un medio mínimo complementado, por separado, con un 5% de cada una de las siguientes fuentes de carbono: ácido benzóico, DL-carnitina, ácido 3-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico (FLUKA), meso-eritritol, lactosa (MERCK), trigonelina y ácido quínico (SIGMA). Dicho medio contiene además por cada litro de agua destilada,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.015 g.;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.123 g.;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.680 g.;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.610 g.; NaCl, 7 g.;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g.; agar base (DIFCO), 15 g. y como elementos traza,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  y  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (9).

Para potenciar la producción de pigmento (prodigiosina), se utilizó agar glicerol-peptona (9), que contiene por litro:

Peptona (DIFCO) ..... 5 g.  
Glicerol (MERCK) ..... 10 ml.  
Agar base (DIFCO) ..... 20 g.

Agar de Tripticasa y soja (TSA, DIFCO): Se utilizó en determinación de sensibilidad a bacteriocinas (marcescinotipia) (55,96).

Agar Blando (Soft Agar): Se utilizó para ser inoculado y permitir el crecimiento de microorganismos en profundidad sobre otro medio sólido. Está compuesto por:

Agar base (DIFCO) .....	6 g
Agua destilada .....	1 l

## 2.3. PRODUCTOS Y REACTIVOS.

### 2.3.1 IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

Para la reidentificación de las cepas obtenidas se utilizó el sistema api 20E suministrado por bioMérieux.

El reactivo de Kovacs fue utilizado para evidenciar la producción de indol a partir de triptófano. Contiene:

Alcohol amílico o isoamílico .....	750 ml
Paradimetilaminobenzaldehido ....	50 g
Agua destilada .....	1 l

Reactivo TDA para la detección de la triptófano desaminasa, que contiene:

Percloruro férrico ..... 3.4 g  
Agua destilada ..... 100.0 ml

Reactivos de Voges Proskauer, para la detección de acetoína:

VP1:

Hidróxido potásico ..... 40 g  
Agua destilada ..... 100 ml

Se calienta la mezcla y se añaden 250 ml. de ácido clorhídrico muy lentamente.

VP2:

naftol ..... 6 g  
Etanol ..... 100 ml

Sticks para la detección de la Citocromo oxidasa (PATHOTEC).

Los reactivos para la realización de la tinción de Gram fueron de QCA (cristal violeta, lugol y safranina) y de Merck (alcohol y acetona).

Por otra parte se estudió la actividad Lipasa, capacidad de fermentación del D-Arabitol, D-Sorbitol, Adonitol y Dulcitol (97).

### 2.3.2. ANTIBIOTICOS EMPLEADOS.

#### 2.3.2.1. DISCOS.

Se utilizaron para la realización de antibiogramas por difusión disco/placa (93), los discos comerciales que contenían los siguientes antibióticos: amikacina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, cefotaxima, norfloxacin, ácido nalidíxico (DIAGNOSTICS PASTEUR), ciprofloxacina, imipenem y cloramfenicol (OXOID).

#### 2.3.2.2. POLVO BASE.

Se utilizó para la determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, así como para la preparación de medios con distintos fines. Los antibióticos empleados fueron: amikacina, kanamicina (BRISTOL MYERS), tobramicina (LILLY), gentamicina (SHERING), cefotaxima (HOECHROUSSELL), norfloxacin, imipenem (MERCK), cloranfenicol (PARKE-DAVIS), ácido nalidíxico (PRODES) y ciprofloxacina (BAYER).

Se utilizó Mitomicina C (SIGMA) para inducir la producción de bacteriocinas por las cepas patrones para determinación de los marcescintipos (55).

### 2.3.3. KITS

The copy Kit (Red Module, INVITROGEN), fue utilizado como técnica rápida de síntesis de cDNA (primera cadena) (98).

BlueGENE Kit, fue utilizado como sistema de detección de ácidos nucleicos no radiactivo. Contiene el complejo SAAP (Streptavidina–Fosfatasa alcalina) y como sustrato de la reacción enzimática NBT (Nitro blue tetrazolium chloride) y BCIP (Bromo–cloro–Indolil–fosfato) (BRL) (99).

### 2.3.4. ENZIMAS EMPLEADAS.

Proteinasa K, Ribonucleasa y Transcriptasa inversa (BOEHRINGER MANNHEIM). Endonucleasas de restricción (PHARMACIA, BOHERINGER MANHEIM y BRL).

### 2.3.5. OTROS PRODUCTOS.

Las sales, agar, azúcares, isopropanol, DTT (Ditiotreitol), etanol, Tris (hidroximetil)-aminometano, cloroformo, fenol y éter, fueron suministrados por Merck. La agarosa, 2-pentanol, tiocianato de guanidina, ficoll, polivinilpirrolidona, albúmina bovina del suero, dextran sulfato, ditiotreitol, Triton X-100 y el fago lambda cortado con HindIII biotinilado, que se utilizó como marcador de pesos moleculares, por Sigma. El SDS, azul de bromofenol y 2-mercapto-etanol fueron de BioRad. El RNA ribosómico 16S y 23S, el DNA de esperma de salmón, el random primer pd(N)<sub>6</sub>, el dUTP biotinilado y la RNAsina fueron suministrados por Boehringer Mannheim. Los dextrorribonucleótidos empleados (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) fueron de la firma BRL.

Las membranas de diálisis empleadas fueron suministradas por The Scientific Instrument Centre Ltd.

Para filtrados de pequeños volúmenes se emplearon filtros Millipore de diámetros de poro de 0.22 y 0.45  $\mu\text{m}$ .

Se utilizaron películas instantáneas en blanco y negro de 9 x 12 cm. tipo 55 de Polaroid.

El material de plástico desechable fue suministrado por Soria Greiner S.A.

Para la realización the Southern blottings se utilizaron membranas sintéticas Hybond-N (AMERSHAM).

Se utilizó leche descremada de una marca comercial para la conservación de las cepas.

#### 2.4. TAMPONES Y SOLUCIONES.

Tampón TE: Contiene Tris-clorhídrico 10mM pH 8 y EDTA-Na 1mM pH8. Se utilizó para las soluciones de DNA y como tampón de diálisis.

Tampón TBE: Contiene Tris-OH 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA-Na 2,5 mM. Se utilizó como tampón de electroforesis de DNA.

Solución salina: contiene 9 g. de ClNa por litro de agua destilada (Solución clorurada simple IBYS)

PBS (Phosphate buffered saline) pH 7.2 150 mM (BIOMERIEUX).

Tampones de lisis para extracción de DNA cromosómico:

A) Fosfato sódico 10 mM, Sacarosa (MERCK) 20%, lisozima (SIGMA) 1.5 mg/ml (100).

B) Tris-ClH pH 8 10 mM, EDTA-Na 1mM, SDS 1%, Proteinasa K 500 µg/ml (100).

C) Solución GES (101) que contiene:

Tiocianato de Guanidina ...	60.0 g.
EDTA .....	3.7 g.
Sarcosil 30% .....	1.7 ml.
Agua .....	20.0 ml.

Tampones de endonucleasas de restricción:

De alto contenido en sales (A.C.S.) (100): Cloruro sódico 100 mM, Tris 50 mM y sulfato magnésico 10 mM, ajustado a pH 7.4.

De contenido medio en sales (M.C.S.) (100): Cloruro sódico 50mM, Tris 10 mM, Sulfato magnésico 10mM y DDT 1mM, ajustado a pH 7.6.

De bajo contenido en sales (B.C.S.) (100): Tris 10mM, sulfato magnésico 10mM y DDT 1 mM, ajustado a pH 7.4.

Buffer Universal, One-Phor-All Buffer Plus 10x (Pharmacia).

Solución de carga de DNA (100): Contiene EDTA 80 mM pH 8, BPB al 0.1%, glicerol al 20% y Ficoll 400 al 2%.



Solución de fragmentación para transferencia (100): HCl 0.25 M.

Solución de desnaturalización para transferencia (100): NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M.

Solución neutralizante para transferencia (100): NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, EDTA 0.001 M.

Tampón para transcripción inversa (RT) (100): Tris-HCl 0.25 M, KCl 0.375 M, MgCl<sub>2</sub> 0.015 M.

Tampón 20xSSC: Contiene ClNa 3 M, citrato sódico 0,3 M y se ajusta a un pH de 7. Este tampón se utilizó a distintas concentraciones en técnicas de Southern blotting e hibridación (100).

La mezcla de prehibridación (PM) que se utilizó (100) estaba compuesta por los siguientes elementos:

Formamida .....	50.0 ml
20 x SSC .....	25.0 ml
Solución de Denhardt (100x)...	5.0 ml
Tampón fosfato 1 M .....	2.5 ml
SDS al 25% .....	2.0 ml
Agua .....	10.5 ml

La mezcla de hibridación (HM) (100) contenía:

Formamida .....	45.0 ml
20 x SSC .....	25.0 ml
Solución de Denhardt (100x)...	1.0 ml
Tampón fosfato 1 M .....	2.0 ml
Sulfato de Dextrano.....	10.0 ml
SDS al 25% .....	2.0 ml
Agua .....	8.0 ml

Los tampones para la detección de los genes hibridados contenían:

Tampón 1

Tris-ClH .....	0.1 M
NaCl .....	0.15 M

Tampón 2

Albúmina Bovina .....	30	g
Triton-X100 .....	4	ml
EDTA 0.5 M .....	5	ml
Tampón 1 .....	1	l

Tampón 3

Tris-ClH .....	0.1	M
NaCl .....	0.1	M
MgCl <sub>2</sub> .....	50.0	mM

Tampón de terminación

Tris-HCl .....	20.0	mM
EDTA .....	0.5	mM

2.5. EQUIPO.

Además del equipo convencional para microbiología, se utilizaron los siguientes aparatos: una centrifuga preparativa Kontron modelo T-124, una centrifuga de mesa

para tubos Eppendorf Hettich modelo mikroliter, una ultracentrífuga Daimon modelo IEC/B-60. Las electroforesis se desarrollaron utilizando una fuente de alimentación BioRad modelo 1420B, las cubetas utilizadas fueron de la casa BioRad. El secador de geles fue de BioRad modelo 1125B. La visualización del DNA se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta de Ultraviolet Products Inc. modelo TM-75 y los geles se fotografiaron con una cámara fija Polaroid MP4. Se utilizó un replicador de Steers de Craft Machine Inc, una estufa de cultivo Heraeus modelo B 5042, un incubador orbital New Brunswick GTS y un espectrofotómetro Gilford modelo 250. El pHmetro utilizado fue un Methrom Hersav modelo E-512 y el sonicador un Heat systems Ultrasonics con cámara de insonorización. El sistema PASCO Data Management (DIFCO Y NCR COMPUTERS) fue utilizado como método semiautomatizado de determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias.

## 2.6. MATERIAL INFORMATICO.

### 2.6.1. HARDWARE.

Fue utilizado un ordenador personal IBM modelo 30-021, dotado de monitor en color de alta resolución, un disco duro de 20M y dos unidades de disco externas de 5,25 y 3,5 pulgadas de alta densidad.

La impresora utilizada fue una Canon Laser modelo LBP-8III.

## 2.6.2. SOFTWARE.

Se utilizó el sistema operativo MS-DOS versión 3.30 de IBM Corporation, 1987. Portsmouth England.

El procesador de textos empleado fue Word Perfect 5.0, de WordPerfect Corporation. Utah, U.S.A.

Para tratamiento Gráfico se utilizó el sistema Harvard Graphics versión 2.00 de Software Publishing Corporation, U.S.A.

Como sistema de almacenamiento y proceso de datos, se utilizó el dBase III plus versión 1.0. Ashton-tate Ltd. 1987.

Como sistema para la realización de estudios de análisis de similitud se utilizó la aplicación UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Averages)(102) del Numerical Taxonomy Analysis Program original de Michael Gaston y proporcionado por la División de Infección Hospitalaria del Public Health Laboratory Service Británico.

Igualmente se utilizaron aplicaciones informáticas para la determinación de pesos moleculares en electroforesis así como para el cálculo de pureza y concentración de DNA en muestras, determinados por su capacidad de absorción de

luz ultravioleta, todos ellos adaptados por el Dr. J. Hernández de la Universidad Politécnica de Valencia.

### **III. METODOS**

### 3.1. IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS.

Todos los microorganismos recogidos, fueron reidentificados por el sistema api 20E según indicaciones del fabricante, con objeto de verificar su pertenencia al género *Serratia*, así como para la determinación de su especie. Igualmente fueron realizadas pruebas bioquímicas complementarias.

### 3.2. MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.

Las cepas estudiadas en este trabajo, fueron conservadas en leche desnatada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Su recuperación se efectuó descongelando los viales y extendiendo un pequeño volumen sobre una placa de medio de MacConkey con objeto de obtener colonias individuales. Con el crecimiento sobre medio sólido se procedió a comprobar la identidad de la estirpe. Estas placas pueden ser conservadas durante períodos de tiempo no muy prolongados a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3. CONDICIONES DE CULTIVO.

Las técnicas de siembra empleadas fueron las habituales que se usan con los microorganismos aerobios, partiendo siempre de una colonia del microorganismo crecido en placa en cultivo puro. Las incubaciones de medios sólidos se realizaron

a 33°C. durante 18 horas en estufa de incubación (salvo algunos medios de biotipación que requirieron incubaciones más prolongadas). Los medios líquidos se cultivaron hasta el final de la fase exponencial a 33°C. en incubador orbital siempre con agitación.

### 3.4. REALIZACION DE ANTIBIOGRAMAS.

#### 3.4.1. ANTIBIOGRAMAS DE DIFUSION DISCO/PLACA.

Partiéndose de un cultivo en caldo en fase de crecimiento exponencial, se realizó una dilución en agua destilada estéril, hasta conseguir una densidad óptica correspondiente al valor 0.5 en la escala de McFarland. Con la ayuda de una torunda de algodón, se distribuyó dicha suspensión para conseguir un césped sobre el que se colocaron los discos del antibiótico elegido. Tras 18 horas de incubación se leyeron los diámetros de los halos de inhibición (93).

#### 3.4.2. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI).

##### 3.4.2.1. DETERMINACION DE LA C.M.I. POR DILUCION EN AGAR.

Dicha determinación se realizó incorporando el agente antibiótico al medio de cultivo dispensado en placas de Petri, en distintas concentraciones. El inóculo se preparó en caldo BHI con una colonia de cada cepa, tras una incubación para obtener microorganismos en fase estacionaria se ajustó la concentración al 0.5 de McFarland con agua destilada, una dilución 1:10 de esta suspensión, fue utilizada para inocular las placas previamente preparadas utilizándose un replicador de Steers. Tras 18 horas de incubación fueron leídas las placas interpretándose como Concentración Mínima Inhibitoria la menor concentración de antibiótico que inhibía completamente el crecimiento del microorganismo, desestimándose un máximo de dos colonias individuales o un ligero velo causado por el inóculo (93).

#### 3.4.2.2. DETERMINACION DE LA C.M.I. POR UN METODO SEMIAUTOMATIZADO.

Para ello se utilizó el sistema PASCO, siguiéndose las especificaciones del fabricante. Se inocularon tubos de 2 ml. de caldo BHI con una colonia de cada cepa problema. Se incubaron durante tres horas, tras las cuales fue ajustada la densidad óptica a un 0.5 de McFarland en agua destilada estéril. De dicha suspensión fueron pasados 50  $\mu$ l a cada uno de los pocillos de los paneles PASCO, que fueron incubados durante 18 horas a 37° C. Transcurrido dicho tiempo fue determinada la C.M.I. en un lector semiautomatizado.



### 3.5. TECNICAS DE SEGUIMIENTO EPIDEMIOLOGICO.

#### 3.5.1. TIPACION POR SENSIBILIDAD A BACTERIOCINAS (MARCESCINOTIPIA).

Se siguió el método original propuesto por Traub et al (55). Se tomaron 5 ó 6 colonias de cada cepa patrón crecidas en agar de MacConkey para inocular tubos que contenían 2.5 ml de TSB, dichos tubos fueron incubados durante 6 horas a 33°C. Con los cultivos crecidos, fueron inoculados tubos que contenían 9 ml. de TSB, hasta conseguir una densidad equivalente al 0.5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  microorganismos/ml.) y se incubaron a 33°C. durante dos horas, después de las cuales fueron añadidos a cada tubo 10  $\mu$ g de mitomicina C por cada ml de cultivo. Los tubos fueron incubados durante 8 horas a 33°C. en oscuridad. Después de la inducción, se añadió a cada tubo 1 ml. de cloroformo. Los tubos fueron agitados fuertemente y centrifugados a 1.000 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron extraídos cuidadosamente y transferidos a placas de Petri donde se permitió su aireación durante 10 minutos con objeto de eliminar en lo posible los restos de cloroformo. Los extractos de marcescina fueron repartidos en tubos de 1.5 ml. y congelados a -70°C.

Las cepas a tipar, fueron crecidas hasta fase estacionaria a 33°C. La turbidez del medio fue ajustada a un 0,5 de Mcfarland en solución salina, 100  $\mu$ l. de esta suspensión, fue añadida a 3 ml. de agar blando, que fue vertido sobre placas de

MacConkey sin cristal violeta. Cuando las placas así preparadas hubieron secado, se colocaron sobre ellas las gotas (con replicador de Steers) de cada uno de los extractos de marcescinas obtenidos de las cepas patrones. Las placas, ya secas fueron incubadas a 33°C. durante toda la noche, y tras dicho período fue interpretado el patrón de inhibición.

### 3.5.2. BIOTIPACION.

Se siguió la técnica descrita por Grimont et al (9). Se valoró la capacidad de reducción del tetrionato potásico, la capacidad hemolítica, la producción de pigmento y el crecimiento sobre distintas fuentes de carbono.

#### 3.5.2.1. TEST DE REDUCCION DEL TETRIONATO POTASICO.

El medio utilizado fue el de Le Minor et al., que fue esterilizado por filtración y repartido en placas microtiter estériles de 12 x 8 pocillos a razón de 0.1 ml. por pocillo. Cada pocillo fue inoculado con 20  $\mu$ l de cultivos estacionarios de *Serratia marcescens*. Tras incubación de 18 horas a 33°C. se interpretaron como positivos los pocillos que habían virado de azul a amarillo por el cambio de pH debido a los protones liberados al medio tras la reducción del tetrionato a tiosulfato (95).

### 3.5.2.2. CAPACIDAD HEMOLITICA.

Se estudió inoculando con replicador de Steers placas de Agar de Columbia con 5% de sangre de caballo. Las placas se incubaron durante toda la noche a 33 ° C. Antes de la lectura de las placas se dejaron durante 24 horas a 4 ° C. Se interpretaron como positivas a aquellas cepas que presentaban un halo claro de hemólisis en torno al crecimiento (9).

### 3.5.2.3. PRODUCCION DE PIGMENTO.

Se utilizó como medio potenciador de la producción de pigmento, Agar de Glicerol y Peptona, que fue inoculado con las cepas a estudiar. Las placas fueron incubadas a 33°C. y fueron monitorizadas durante 14 días. Se dio resultado positivo a aquellas cepas que presentaban coloración entre rosada y rojo intensa (9.96).

### 3.5.2.4. TESTS DE UTILIZACION DE FUENTES DE CARBONO.

Se utilizó un medio base rico en minerales y carente de fuentes de carbono (94), que fue suplementado por separado con ácido benzóico, DL-carnitina, ácido 3-hidroxibenzóico, ácido 4-hidroxibenzóico, meso-eritritol, lactosa, trigonelina y ácido quínico. Las placas fueron inoculadas con replicador de Steers partiendo de

cultivos en caldo en fase estacionaria, incubadas a 33°C. y monitorizadas durante 4 días (lactosa) o 14 (resto de los azúcares). Se consideró como positivo al crecimiento claro, desestimando colonias aisladas.

### 3.5.3. TIPACION POR "CODIGO API 20E".

Los códigos obtenidos en la reidentificación por el sistema API 20E de las cepas enviadas por los distintos Hospitales, fueron archivados y utilizados como marcador epidemiológico (47,60).

### 3.5.4. FAGOTIPACION.

Se empleó un set de 11 bacteriófagos, utilizándose como criterio de tipación, el patrón de lisis producido por el conjunto de estos fagos en cada cepa problema. Diluciones decimales de los fagos, fueron inoculadas sobre las cepas propagadoras, con el fin de titular los fagos y poder determinar la RTD (*routine test dilution*). Con un aparato de fagotipia se dispensaron volúmenes de dichas diluciones sobre placas de TSA que habían sido bañadas previamente con cultivos de la cepa problema. Tras una incubación de 18 horas a 33°C se interpretaron los resultados según las "calvas de lisis". Los criterios de interpretación utilizados fueron los propuestos por Farmer (52) y son los siguientes: "-":negativo, "+-": menos de 20 calvas, "+": entre 20 y

50 calvas y "++": mas de 50 calvas y CL: lisis confluyente. Se considera una reacción positiva a partir de 20 calvas de lisis.

Esta técnica fue realizada paralelamente en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) y en la División de Infección Hospitalaria del Public Health Laboratory Service Británico.

#### 3.5.5. SEROTIPACION.

Las cepas objeto del presente estudio, fueron clasificadas serologicamente por sus antígenos somáticos (45,54).

Esta técnica fue realizada, en el modo tradicional para este microorganismo, en el Servicio de Bacteriología del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) y en la División de Infección Hospitalaria del Public Health Laboratory Service Británico, introduciendo ciertas modificaciones consistentes en la detección única y exclusiva de los antígenos lipopolisacáridos capsulares y detectando las reacciones con una técnica colorimétrica en un lector de ELISA.

### 3.5.6. RIBOTIPACION.

Se basa en estudio del patrón de hibridación de sondas de RNA ribosómico (16S y 23S), con el DNA total, digerido con endonucleasas de restricción de las cepas a caracterizar (79).

#### 3.5.6.1. EXTRACCION DEL DNA TOTAL BACTERIANO.

Se utilizó fundamentalmente una modificación de una técnica basada en el empleo de un agente desnaturizante de proteínas fuerte, el tiocianato de guanidina. El método ofrece un alto rendimiento de DNA libre de proteínas, el RNA no se elimina, pero no es obstáculo para los estudios posteriores (101,103).

Las cepas fueron cultivadas en caldo LB a 37°C y condiciones aerobias hasta alcanzar el final de la fase de crecimiento exponencial. Los cultivos fueron entonces centrifugados a 1,000 x g durante 15 minutos, obteniéndose así un pellet del tamaño de un grano de arroz. Dicho pellet fue resuspendido en 100 µl de tampón TE sin tratamiento enzimático. Las células fueron lisadas con 0.5 ml de tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 100 mM y Sarcosil al 0.5% (v/v) (Reactivo G.E.S.). La suspensión celular fue agitada y se dejó a temperatura ambiente durante 5-10 minutos para permitir la lisis. Los lisados fueron entonces enfriados en hielo, se añadió 0.25 ml de acetato amónico 7.5 M frío, tras agitar se mantuvo la suspensión

---

en hielo durante 10 minutos más, tras los cuales se añadió 0.5 ml. de Cloroformo-pentanol (24:1), para proceder a la eliminación de las proteínas. Los tubos fueron agitados fuertemente hasta la mezcla de las fases y se centrifugó a 25,000 x g durante 10 minutos. La fase acuosa (superior) fue transferida a un tubo Eppendorf, donde se añadieron 0.54 volúmenes de 2-propanol frío, los tubos fueron agitados por inversión, pudiéndose ver en este momento la aparición de la estructura fibrosa de la molécula de DNA, que se precipitó por centrifugación a 6,500 x g durante 30 s. El DNA precipitado fue lavado varias veces con etanol al 70% frío y secado a vacío. La resuspensión en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C.

La modificación introducida en el método estándar consiste en un doble tratamiento químico-enzimático de desproteinización para evitar la degradación del DNA extraído por las potentes nucleasas de *Serratia marcescens* (104).

La valoración del DNA obtenido fue calculada por la absorción a 260 nm de una dilución 1/50 de la suspensión preparada ( $A_{260} \times 2.5 = [\text{DNA}] \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). La pureza se analizó por los cocientes de absorción a 230/260 y 280/260 nm (0.45 y 0.515 respectivamente en muestras libres de proteínas (100)), así como por electroforesis en geles de agarosa (100).

Otros métodos de extracción de DNA total fueron empleados en fases iniciales, pero fueron desestimados por dificultad de manipulación, excesivo tiempo necesario para su desarrollo o bajo rendimiento en la obtención de DNA (105,106,107).

#### 3.5.6.2. DIGESTION CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

A un tubo Eppendorf, se añadió un volumen de muestra que contenía entre 5 y 8  $\mu\text{g}$  de DNA, completándolo hasta 33  $\mu\text{l}$  con agua destilada. Se añadieron 7  $\mu\text{l}$  de una mezcla de espermidina, buffer x 10 y enzima de restricción (10 u/ $\mu\text{l}$ ) (2:4:1). Tras mezclar bien, se incubó a 37°C durante 4 horas. Transcurrido el período de incubación se añadieron 4  $\mu\text{l}$  de solución de carga de DNA.

Se preparó un gel de agarosa al 0.7% en tampón TBE (100), que fue cargado, previa desnaturalización a 65°C durante 5 minutos, con 10–20  $\mu\text{l}$  de las muestras preparadas de la forma indicada anteriormente. Como marcador de pesos moleculares, fue utilizado el DNA del fago lambda cortado con HindIII y biotinilado.

Las electroforesis fueron desarrolladas a 35 voltios durante 18 horas, después de las cuales el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5–1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 30 minutos (100), pudiendo ser observado en un transiluminador de luz ultravioleta (254 nm). El resultado fue registrado por fotografía con el sistema Polaroid utilizando película con negativo tipo 55 de la misma marca.

### 3.5.6.3. METODOS DE SOUTHERN BLOTTING.

Se utilizó la técnica de transferencia a vacío, para ello se utilizó el aparato VacuGene XL de Pharmacia, diseñado para optimizar la transferencia de ácidos nucleicos desde geles de agarosa a membranas. El método tarda menos de una hora en efectuar la transferencia (108).

Una hoja de papel Whatman 3 MM, 2 cm más larga y ancha que el gel, fue colocada sobre el soporte poroso del aparato de transferencia, mojándolo con agua destilada. Se cortó una membrana Hybond-N (0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro), 1 cm más larga y ancha que el gel. Dicha membrana fue mojada con 20 x SSC y fue cuidadosamente colocada sobre el papel de filtro, evitando la formación de burbujas. La lámina de goma del aparato de transferencia, fue mojada con agua destilada y se colocó sobre la membrana haciendo coincidir su ventana con ésta. Cuidadosamente se colocó el gel sobre la membrana. Tras la conexión de la bomba de vacío y su regulación a 50 mBar., el gel se fue cubriendo poco a poco con solución de fragmentación (0.25 M ClH) manteniéndola 4 minutos. Posteriormente y tras la eliminación de dicha solución se añadió solución de desnaturalización (0.5 M NaOH, 1.5 M ClNa), que se mantuvo 3 minutos. Procediéndose de igual forma, se mantuvo al gel durante 3 minutos en solución de neutralización (1.5 M ClNa, 0.5 M Tris-HCl, 0.001 M EDTA) en iguales condiciones ambientales. Por último se dispensó sobre el gel tampón de transferencia (20 x SSC) durante 45-60 minutos, transcurridos los cuales se recogió la membrana, aclarándola en 20 x SSC para

eliminar los restos de agarosa. El DNA fue fijado al filtro, manteniendo a éste durante 2 horas a 80°C. Después de este tratamiento, el filtro podía ser almacenado a temperatura ambiente, hasta el momento de la hibridación.

Después de la transferencia, el gel fue re-teñido con bromuro de etidio, para verificar la completa transferencia de DNA.

#### 3.5.6.4. SINTESIS Y MARCAJE DE LA SONDA.

La sonda que se utilizó, fue un cDNA sintetizado por transcripción inversa del RNA ribosómico 16S y 23S de *Escherichia coli*. Dicho cDNA fue marcado por incorporación de Biotín-16-dUTP.

La mezcla de RNAs fue disuelta en 50 µl de agua destilada hasta alcanzar una absorbancia a 260 nm de 2.0 (100 µg/ml). Inmediatamente se desnaturalizó la mezcla a 95°C. durante 5-10 minutos enfriándose después en hielo.

A un tubo que contenía los desoxirribonucleotidos trifosfato (dCTP, dGTP, dATP) desecados, se añadió en orden:

---

5 x RT buffer .....	10 $\mu$ l
RNA .....	10 $\mu$ l
RNAsina .....	2 $\mu$ l
BSA .....	5 $\mu$ l
Agua estéril .....	20 $\mu$ l
Biotín-16-dUTP .....	1 $\mu$ l
Transcriptasa inversa ....	2 $\mu$ l

La mezcla así preparada fue incubada durante 1 hora a 37°C. añadiéndose después 1  $\mu$ l de dTTP e incubándose durante 30 minutos más. Al completarse el período de incubación, se enfrió en hielo y se añadió EDTA 0.5 M para detener la reacción pudiendo ser almacenada la sonda a -20°C (100).

#### 3.5.6.5. PREHIBRIDACION.

200  $\mu$ l de esperma de salmón fueron desnaturalizados a 95°C. durante 10 minutos enfriándolo inmediatamente después en baño de hielo, se añadieron 3.8 ml de PM precalentados a 42°C, mezclando bien. La membrana fue empapada en 2 x SSC eliminando el exceso de líquido con papel de filtro. La membrana fue colocada en el interior de una bolsa de hibridación a la que se añadió la mezcla de PM y esperma de salmón. Tras la eliminación de burbujas y homogeneización del líquido,

la bolsa fue cerrada herméticamente con una selladora térmica, manteniéndola durante 4 horas en un baño regulado a 42°C (100).

#### 3.5.6.6. HIBRIDACION.

Se mezclaron 50 µl de sonda con 20 µl de DNA de esperma de salmón y se sometió a tratamiento de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos, enfriándolo inmediatamente después en baño de hielo. A la mezcla así preparada se añadió 0.93 ml de HM precalentada a 42°C.

Se cortó un ángulo de la bolsa de prehibridación con el fin de eliminar, en la medida de lo posible, la solución PM, añadiendo posteriormente la mezcla de HM y sonda. Tras procederse al reparto regular del líquido en el interior de la bolsa y la exclusión de las burbujas, se selló de nuevo, incubándola a 42°C. durante 16 horas (100).

#### 3.5.6.7. DETECCION DE LOS GENES.

Después de la hibridación, se extrajo cuidadosamente la membrana y se sometió a los siguientes lavados: 30 segundos a 20°C. en 2 x SSC; 5 minutos a 20°C. en 2 x SSC + 0.1% SDS, repitiendo de nuevo; 5 minutos a 20°C. en 0.2 x SSC + 0.1%

SDS precalentado a 60°C. repitiendo de nuevo; 15 minutos a 60°C. en 0.2 x SSC + 0.1% SDS, repitiendo de nuevo; 30 segundos a 20°C. en 2 x SSC y un lavado breve en tampón 1. Se retiró el exceso de líquido de la membrana y se incubó durante 1 hora a 65°C. en 100 ml. de tampón 2. Posteriormente se incubó la membrana a temperatura ambiente con agitación y durante 10 minutos en 7ml de tampón 1 + 7  $\mu$ l de SAAP (Streptavidin-alkaline phosphatase, BlueGene Kit). Se decantó y se aclaró con 200 ml de buffer 1 + 0.4 ml. de EDTA 0.5M + 1 ml. de Triton X100 durante 10 minutos, repitiendo la operación con tampón fresco dos veces más. Se realizó un lavado en 200 ml. de tampón 3 durante 10 minutos a 20°C. y se diluyeron 33  $\mu$ l de NBT (Nitroblue tetrazolium, BlueGene Kit) en 7.5 ml de tampón 3, incorporando después de mezclar bien 25  $\mu$ l de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate, BlueGene Kit). Se colocó la membrana en un bolsa nueva añadiendo la solución de NBT/BCIP, tras la exclusión de burbujas, se selló la bolsa y se reveló con agitación en oscuridad a temperatura ambiente. Cuando las bandas fueron claramente visibles (entre 1 y 3 horas), se extrajo la membrana y se lavó en tampón de terminación durante 5-10 minutos (76).

Después del secado de la membrana a temperatura ambiente, se procedió al registro gráfico de la membrana, por fotografiado o fotocopia.

## **IV. RESULTADOS**

#### 4.1. IDENTIFICACION BACTERIANA Y PRUEBAS BIOQUIMICAS.

##### 4.1.1. FRECUENCIA RELATIVA DE AISLAMIENTOS DE LAS DISTINTAS ESPECIES DEL GENERO *SERRATIA* EN MEDIO HOSPITALARIO.

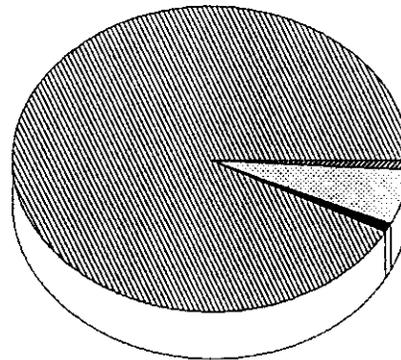
El resultado de las pruebas de identificación realizadas a las cepas componentes de nuestra colección, es el siguiente: se ha observado que la especie que se aísla en una inmensa mayoría de los casos es *S. marcescens*, seguida muy de lejos por *S. liquefaciens*. Se efectuaron igualmente aislamientos de *S. rubidea* y *S. plymuthica* aunque de manera ocasional, siendo las frecuencias relativas de dichos aislamientos del 92% para *S. marcescens*, del 6% para *S. liquefaciens* y del 1% para *S. plymuthica* y *S. rubidea*. Los citados porcentajes aparecen reflejados en la figura 1.

##### 4.1.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS DE IDENTIFICACION.

En la tabla I se expresa el porcentaje de positividad de cada prueba contenida en la galería API 20E para *Serratia marcescens* y *Serratia liquefaciens*, enfrentándolo al porcentaje que indica el fabricante, así como la desviación del valor experimental frente al esperado. Las otras dos especies no se han considerado por su baja representación.

En la tabla II, se muestra el porcentaje obtenido de resultados positivos a cada

*S. marcescens* 92%



*S. plymuthica* 1%  
*S. liquefaciens* 6%  
*S. rubidea* 1%

FIGURA 1. Distribución de las distintas especies del género *Serratia* aisladas en Hospitales de Madrid.

	<i>S. marcescens</i>			<i>S. liquefaciens</i>		
	Experimental	API 20E	Difer.	Experimental	API 20E	Difer.
ONPG	91.9	94.0	2.1	100.0	98.0	2.0
ADH	0.0	2.0	2.0	0.0	0.0	0.0
LDC	97.6	98.0	0.4	100.0	87.0	13.0
ODC	100.0	95.0	5.0	100.0	99.0	1.0
CIT	69.6	97.0	27.4	72.7	85.0	12.3
H S	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
URE	27.7	28.0	0.3	18.2	5.0	13.2
TDA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
IND	0.0	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0
VP	93.2	60.0	33.2	81.8	52.0	29.8
GEL	85.7	85.0	0.7	81.8	60.0	21.8
GLU	100.0	100.0	0.0	100.0	100.0	0.0
MAN	100.0	99.0	1.0	100.0	99.0	1.0
INO	97.1	71.0	26.1	100.0	75.0	25.0
SOR	98.3	91.0	7.3	100.0	98.0	2.0
RHA	0.6	0.0	0.6	18.2	16.0	2.2
SAC	100.0	98.0	2.0	100.0	99.0	1.0
MEL	6.8	68.0	61.2	90.9	75.0	15.9
AMY	97.9	97.0	0.9	100.0	99.0	1.0
ARA	3.1	19.0	15.9	90.9	98.0	7.1

TABLA I. Valores porcentuales de los resultados experimentales y de referencia de *S. marcescens* y *S. liquefaciens* a las pruebas bioquímicas contenidas en la galería API 20E, así como la diferencia entre ambos valores.

	Experimental	Farmer (1985)	Difer.
DNAasa	98.7	98.0	0.7
Lipasa	99.6	98.0	1.6
Ferm. D-arabitol	0.8	0.0	0.8
Ferm. adonitol	94.0	40.0	54.0
Ferm. dulcitol	0.0	0.0	0.0

TABLA II. Valores porcentuales y de referencia de los resultados a de las pruebas bioquímicas complementarias realizadas a las cepas de *S. marcescens*.

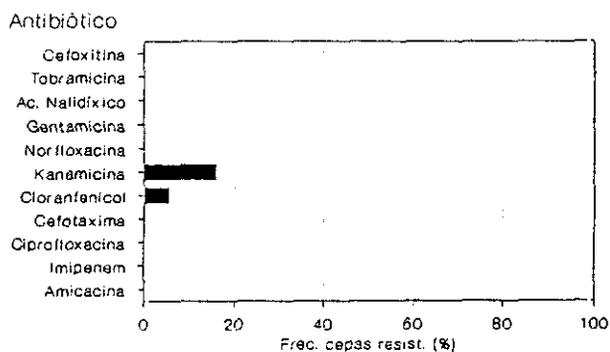
---

una de las pruebas complementarias realizadas a las cepas de *Serratia marcescens*. Paralelamente se muestran los datos obtenidos por Farmer (97) con las mismas pruebas bioquímicas.

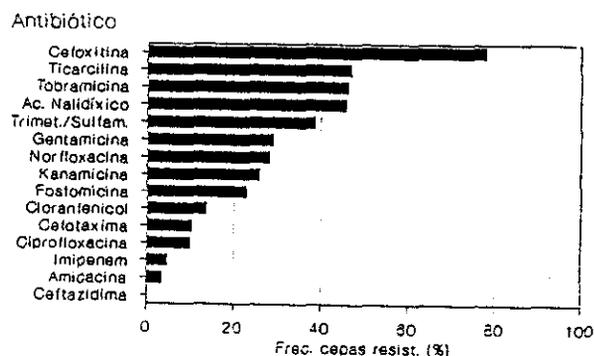
#### 4.2. SENSIBILIDAD A AGENTES ANTIMICROBIANOS.

La determinación de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de una serie de antibióticos, se realizaron mediante la utilización del panel 66E del sistema PASCO (el que se utiliza de rutina para gram negativos) o la técnica de dilución en agar (93).

Los antibióticos utilizados (los incluidos en el panel 66E), son detallados a continuación: tobramicina (4  $\mu\text{g/ml}$ ), amicacina (16 $\mu\text{g/ml}$ ), cefoxitina (8 $\mu\text{g/ml}$ ), gentamicina (4 $\mu\text{g/ml}$ ), trimetoprim-sulfametoxazol (2 $\mu\text{g/ml}$ -30 $\mu\text{g/ml}$ ), cefotaxima (8 $\mu\text{g/ml}$ ), ticarcilina (16 $\mu\text{g/ml}$ ), ácido nalidíxico (16 $\mu\text{g/ml}$ ), ceftazidima (8 $\mu\text{g/ml}$ ), norfloxacin (2 $\mu\text{g/ml}$ ) y fosfomicina (32 $\mu\text{g/ml}$ ). Otros antibióticos incluidos en el panel (ampicilina, cefalotina, tetraciclina, colistina, nitrofurantoína, cefuroxima, cefazolina y amoxicilina/ácido clavulánico), no fueron tenidos en cuenta por ser *Serratia marcescens* resistente de manera natural. Se incluyeron además en el estudio los siguientes antibióticos: kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$ ), imipenem (16 $\mu\text{g/ml}$ ), ciprofloxacina (4 $\mu\text{g/ml}$ ) y cloranfenicol (32 $\mu\text{g/ml}$ ). Los puntos de corte considerados (indicados entre paréntesis) fueron los indicados por el National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (93).



A



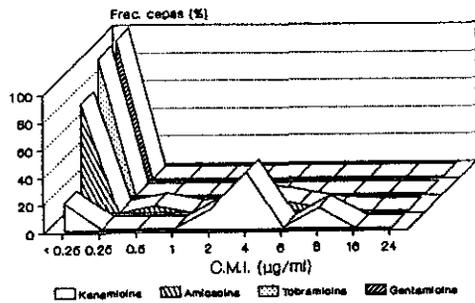
B

FIGURA 2. Frecuencia de cepas resistentes (%), A) en 1965 y B) en la actualidad, a los antibióticos indicados.

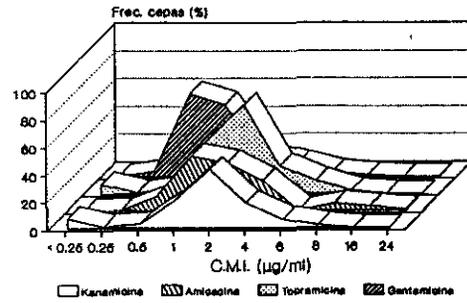
	M. I. C. <sub>50</sub>	M. I. C. <sub>90</sub>	RANGO	
Tobramicina	4	≥16	0.25	- 16
Amicacina	4	16	1	- 64
Cefoxitina	≥32	≥32	1	- 32
Gentamicina	1	≥16	0.25	- 8
Trim./sulf.	≤0.5/9.5	≥4/76	0.5/9.5	- 4/76
Cefotaxima	≤2	8	2	- 64
Ticarcilina	16	≥128	8	- 128
Ac. nalid.	≤16	≥32	16	- 32
Ceftazidima	≤0.5	1	0.5	- 16
Norfloxac.	2	≥4	2	- 4
Fosfomicina	≤16	128	16	- 128

TABLA III. Valores de C.M.I.<sub>50</sub> y C.M.I.<sub>90</sub> de los aislamientos de *Serratia marcescens* a los antibióticos ensayados, así como el rango de diluciones utilizadas.

## Aminoglicósidos

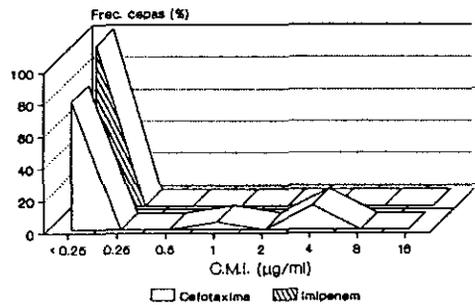


A

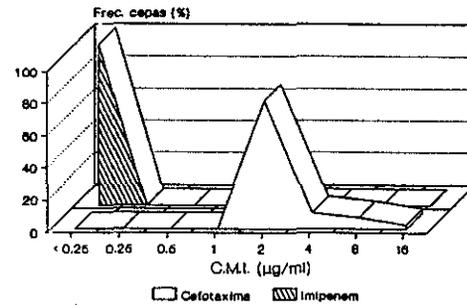


B

## β-Lactámicos

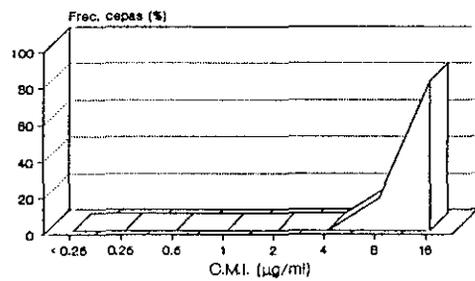


C

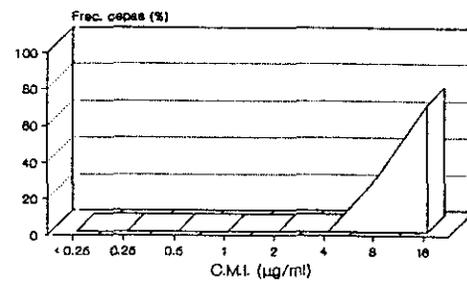


D

## Cloranfenicol

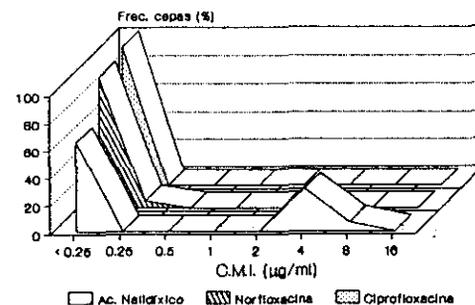


G

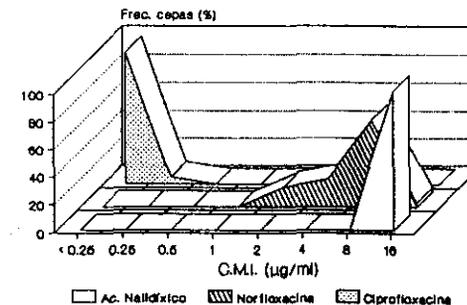


H

## Quinolonas



E



F

FIGURA 3. Distribución de las C.M.I. de los distintos antibióticos ensayados en cepas actuales (A,C,E,G) y cepas "históricas" (B,D,F,H), catalogadas como sensibles por criterios NCCLS.

El porcentaje de resistencias a los distintos antimicrobianos ensayados, aparece reflejado en la figura 2A. El porcentaje de cepas resistentes en el inicio de la consideración de *Serratia marcescens* como germen causante de infección nosocomial, se determinó tras el estudio de los primeros aislamientos realizados en España por F. Baquero (1969) (92), y aparece recogido en la figura 2B.

Nos pareció interesante, por otra parte, estudiar de manera comparativa a las poblaciones sensibles del grupo de cepas aisladas recientemente frente al de aislamientos "históricos" (1969). Para ello se realizó la determinación de las C.M.I. por el método de dilución en agar, lo cual permitía ampliar los márgenes de diluciones de antibióticos ensayados. Los resultados de dichos experimentos, se recogen en la figura 3.

En la tabla III se muestran los valores de C.M.I.<sub>50</sub> y C.M.I.<sub>90</sub>, para los distintos antibióticos contenidos en el panel, así como los rangos de concentraciones de antimicrobiano utilizados.

#### 4.3. TIPACION POR SENSIBILIDAD A BACTERIOCINAS.

El enfrentamiento de las 184 cepas de *S. marcescens* ensayadas con las 10 marcescinas sugeridas por Traub, ha permitido asignar un 10 patrones concretos a 104 cepas, resultando las restantes 80 cepas no tipables por este método.

La frecuencia de inhibición de cada una de las bacteriocinas sobre las cepas estudiadas es la siguiente: bacteriocina número 46, 23.3%; bacteriocina 16, 20%, bacteriocinas 5,18,31 y 33, 19.6%; bacteriocina 12, 14%; bacteriocina 17, 9.7% y bacteriocina número 10 9.2%. La bacteriocina número 43 no inhibió el crecimiento de ninguna de las cepas ensayadas de nuestra colección.

Las cepas estudiadas por este método, presentaron unos perfiles de inhibición por las marcescinas patrones de número variable entre 1 y 5, siendo lo más frecuente la presencia de 2 ó 3 halos de inhibición por cepa.

Han sido detectados 10 marcescintipos distintos según el patrón de inhibición inducido con el juego de bacteriocinas empleado. De ellos, 4 corresponden a patrones previamente descritos por Traub (VII, XXXI, XL y LVIII), mientras que los 6 restantes no han sido descritos previamente. A los 6 nuevos marcescintipos encontrados se les ha denominado M1, M2, M3, M4, M5 y M6. Todos los tipos encontrados son detallados en la tabla IV.

En la figura 4 se muestra como ejemplo la apariencia de una cepa con inhibición por las bacteriocinas 5, 16,18, 31 y 33 (marcescintipo M1).

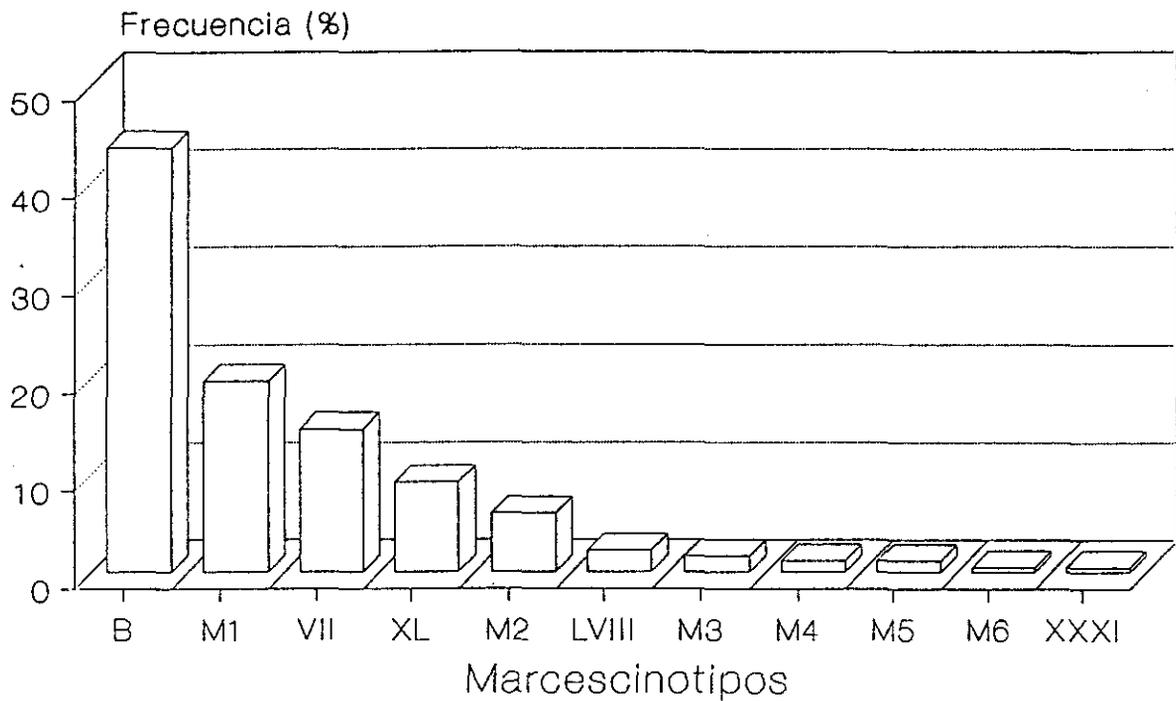
La frecuencia relativa de los marcescintipos encontrados aparece reflejada en la figura 5.

TIPOS\BACTERIOC.	5	10	12	16	17	18	31	33	43	46
B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M1	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
M2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
M3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
M4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
M5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
M6	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
XXXI	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
XL	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
LVIII	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
VIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

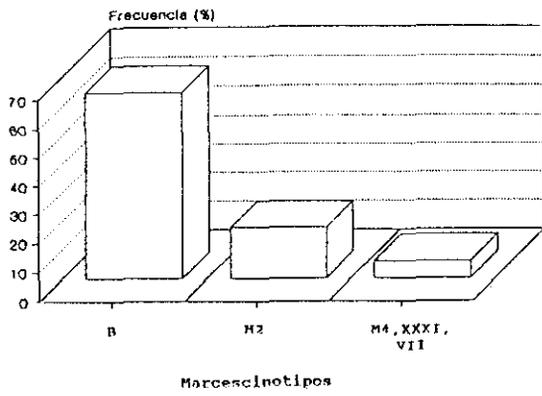
TABLA IV. Descripción de los distintos marcescintipos encontrados. B: cepas no tipables; M1, M2, M3, M4, M5 y M6: nuevos marcescintipos; XXXI, XL, LVIII y VII: marcescintipos descritos previamente.



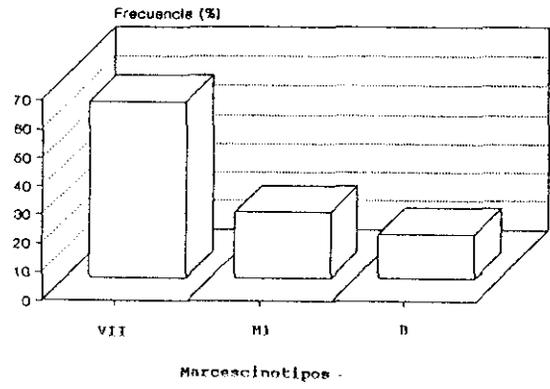
FIGURA 4. Aspecto de una placa lista para su interpretación en marcescintipia (marcescintipo M1).



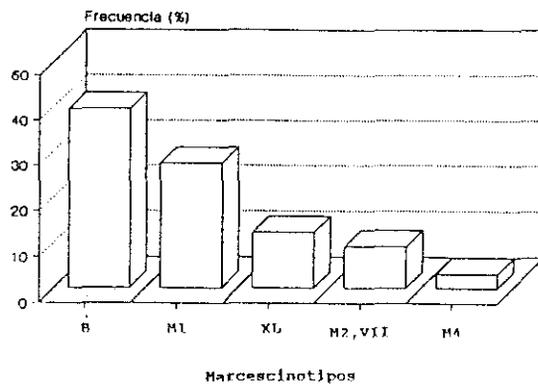
**FIGURA 5.** Frecuencia relativa de cada uno de los marcescintipos encontrados. B: cepas no tipables; M1, M2, M3, M4, M5 y M6: nuevos marcescintipos; XXXI, XL, LVIII y VII: marcescintipos descritos previamente.



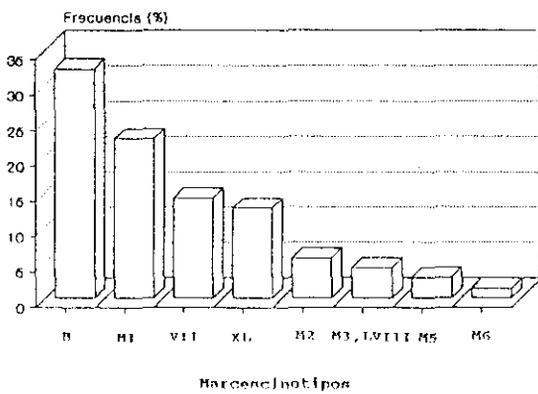
A



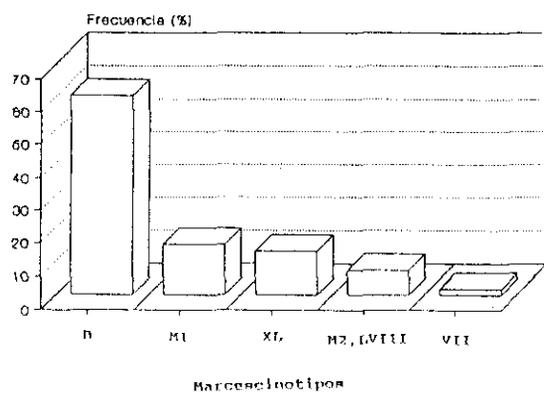
B



C



D



E

FIGURA 6. Distribución de Marcescintipos por Hospitales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz" (cepas de 1969); B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón; D, Hospital Ramón y Cajal; E, Hospital Universitario de San Carlos.

En la figura 6 se muestra la distribución de los marcescintipos encontrados en cada Hospital.

La **reproducibilidad** del método en nuestro caso, ha sido del 97.5%. El valor de **tipabilidad** del método, deducido del número de cepas ensayadas y el número de cepas tipables, ha sido del 56.5%. El **coeficiente de discriminación** aplicando la fórmula de diversidad de Simpson adaptada para tipación bacteriana (43) fue del 74%. En cuanto a la **simplicidad** del método nos parece aceptable, pues lo más tedioso puede ser la preparación de las bacteriocinas patrones, sin embargo esto se realiza una vez cada seis meses, produciéndose gran cantidad de marcescinas que pueden conservarse congeladas. Superada esta fase, el desarrollo experimental del tipado, es sencillo, no requiere equipos ni técnicas complicadas, y pueden obtenerse resultados en 24 horas.

#### 4.4. BIOTIPACION.

Este método permite concretar dos niveles distintos de subespeciación: **biogrupos**, que consisten en familias de microorganismos afines por su comportamiento bioquímico, y que se dividen a su vez en **biotipos**.

Se han estudiado 160 cepas de las cuales todas han podido ser encajadas en una categoría concreta, no existen por tanto según esta técnica cepas no tipables. Las

cepas estudiadas han sido distribuidas en 10 biogrupos distintos y en 17 biotipos.

Las pruebas realizadas son las sugeridas por Grimont *et al.* (9). Dichas pruebas, así como el comportamiento de nuestras cepas frente a ellas, se detallan a continuación:

Crecimiento a utilizando como única fuente de carbono los siguientes compuestos:

Ac. benzóico .....	16.2%
Ac. 3-hidroxibenzóico .....	51.2%
Ac. 4-hidroxibenzóico .....	58.7%
DL-Carnitina .....	40.6%
m-Eritritol .....	38.1%
Quinato .....	39.4%
Trigonelina .....	42.5%
Lactosa .....	10.6%
Hemólisis de sangre de caballo .....	19.4%
Producción de pigmento .....	10.0%
Reducción del Tetrionato potásico ..	78.7%

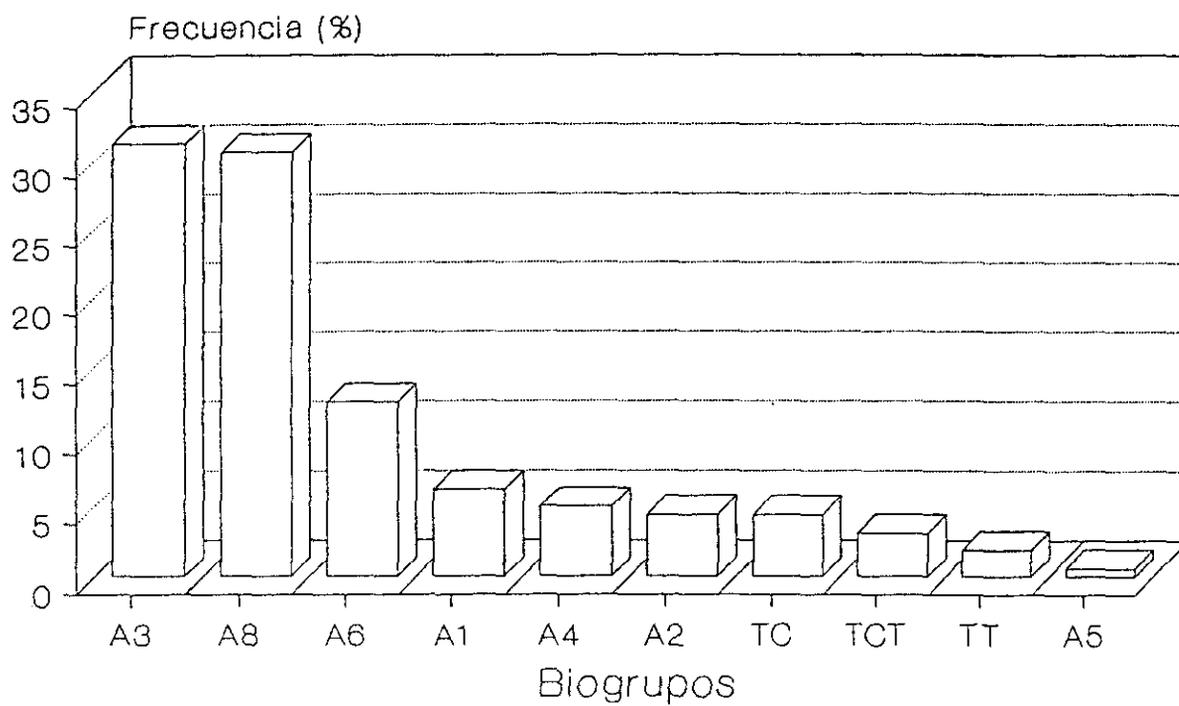
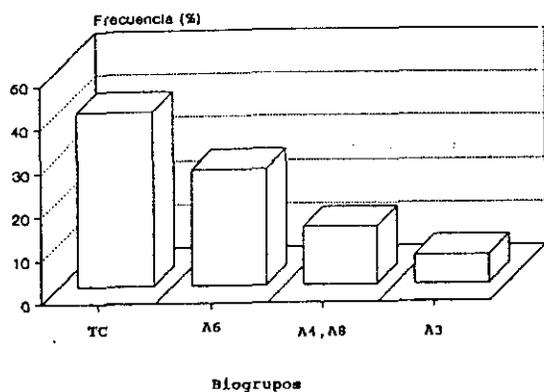
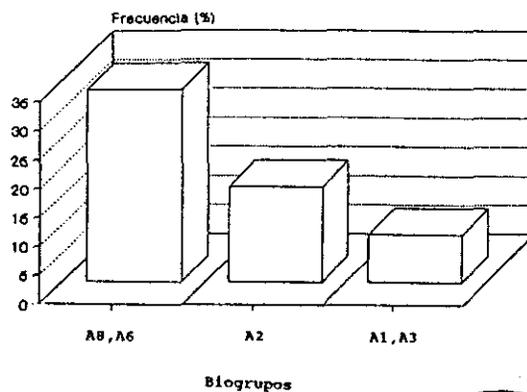


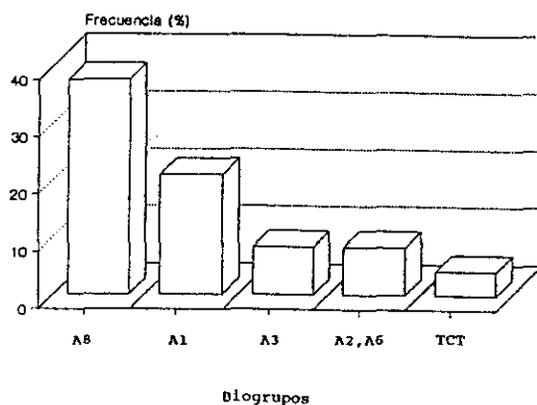
FIGURA 7 Frecuencia relativa de cada uno de los biogrupos encontrados.



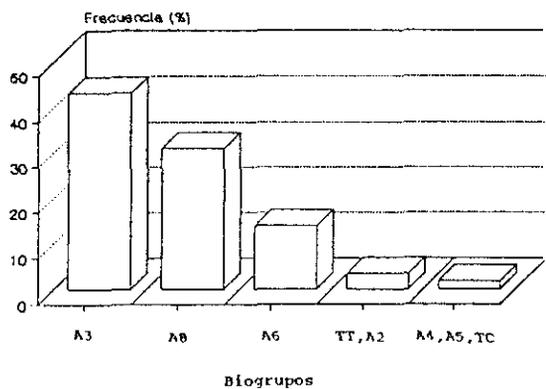
A



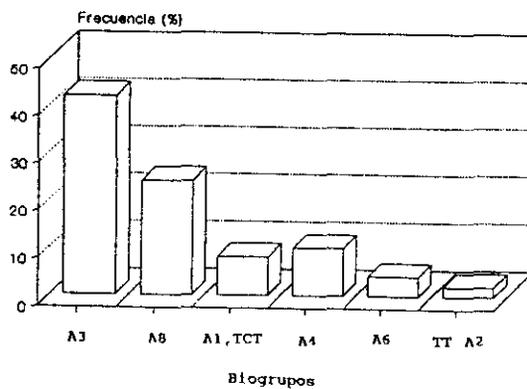
B



C



D



E



FIGURA 8. Distribución de Biogrupos por Hospitales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz" (cepas de 1969); B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón; D, Hospital Ramón y Cajal; E, Hospital Universitario de San Carlos.

#### 4.4.1. BIOGRUPOS.

La frecuencia de aparición de cada uno de los biogrupos encontrados se representa en la figura 7.

La distribución por biogrupos en cada Hospital, se muestra en la figura 8.

#### 4.4.2. BIOTIPOS.

En la figura 9 se muestra a modo de ejemplo una placa que contiene medio M70 adicionado con Ac. benzóico. Pueden observarse 8 cepas negativas (números 1,3,4,6,9,12,14 y 16) y 8 cepas positivas (números 2,5,7,8,10,11,13 y 15) para esta prueba.

La frecuencia de aparición de cada biotipo se representa en la figura 10. No se encontró ninguna cepa perteneciente a los biotipos A3d ni A8c.

La frecuencia de aparición de cada biotipo en los 5 Hospitales se describe en la figura 11.

La **tipabilidad** observada es del 100%.

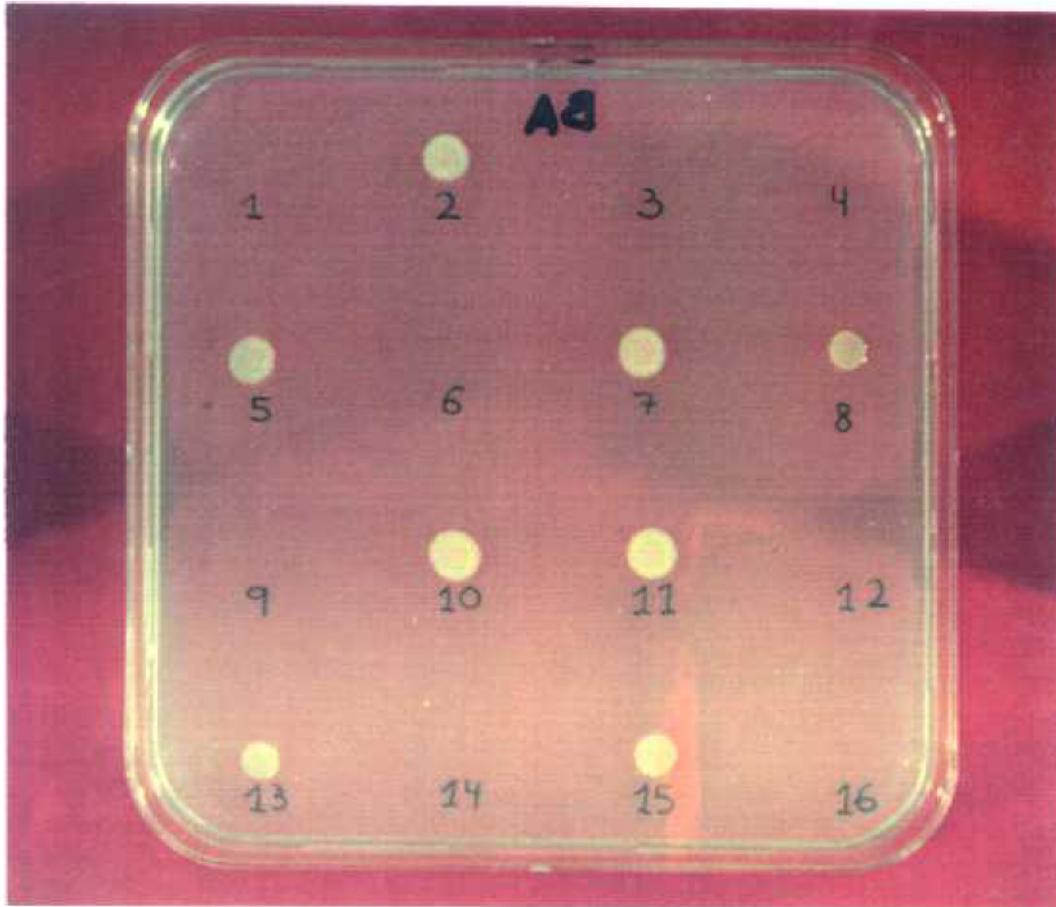


FIGURA 9. Placa de medio M70 adicionada con Ac. benzóico donde se aprecian cepas capaces de crecer y cepas incapaces.

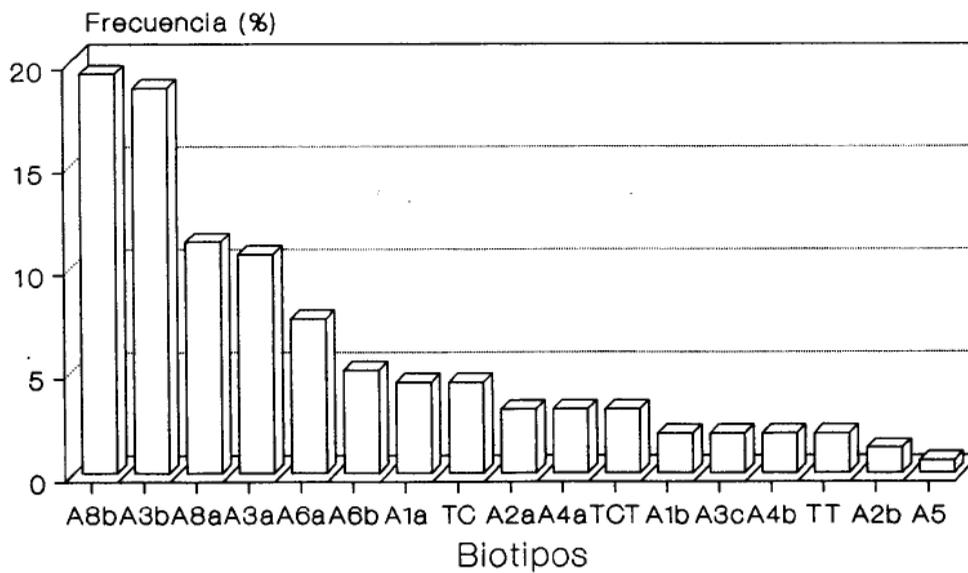
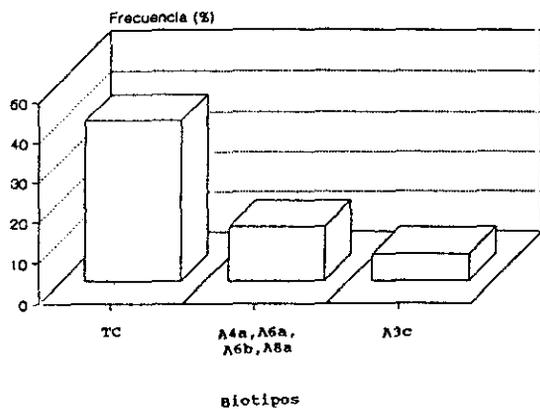
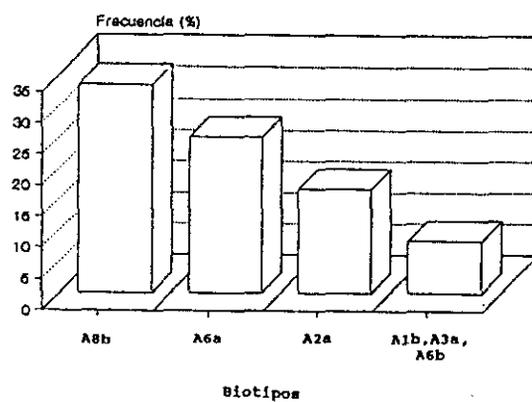


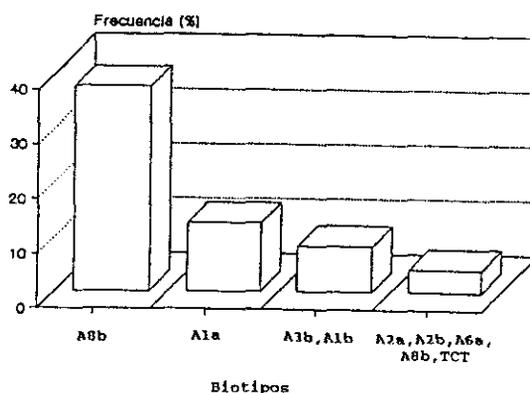
FIGURA 10 Porcentaje de aparición de los distintos biotipos encontrados.



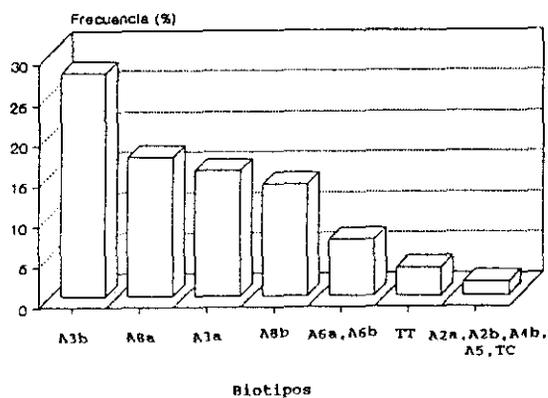
A



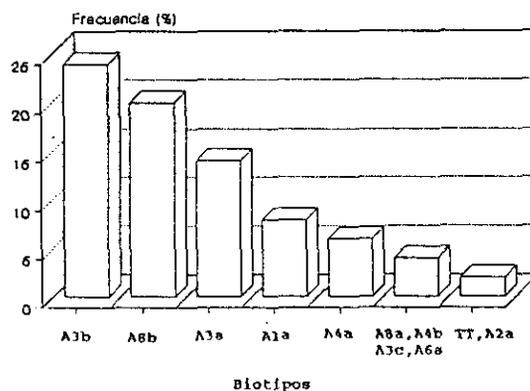
B



C



D



E

FIGURA 11. Distribución de Biotipos por Hospitales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz" (cepas de 1969); B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón; D, Hospital Ramón y Cajal; E, Hospital Universitario de San Carlos.

Para hablar de reproducibilidad y capacidad de discriminación hemos de distinguir entre bioagrupación y biotipación ya que estos conceptos son variables en los dos niveles de subespeciación. La **reproducibilidad** se ha fijado en un 85% si consideramos biogrupos, mientras que es de un 72.5% considerando biotipos. El **coeficiente de discriminación** tiene un valor del 78% en bioagrupación y del 89.2% en biotipación.

En cuanto a la **simplicidad** hemos de decir, que el método requiere continua preparación de medios complicados, es por tanto trabajoso. La interpretación de las pruebas requiere tiempos de hasta 14 días durante los cuales es preciso realizar lecturas continuas. Estos tiempos largos de lectura propician además la contaminación de las placas, generalmente con hongos, que dificulta su interpretación, que resulta además tremendamente subjetiva por la aparición frecuente de colonias aisladas o "velos" de crecimiento dudoso.

#### 4.5. TIPACION POR EL SISTEMA API 20E.

Las 20 pruebas bioquímicas contenidas en la galería API, junto con la de determinación de la actividad oxidasa, fueron aplicadas a 185 cepas de nuestra colección distribuyéndose en 25 "api-tipos" distintos ("a"- "y"). Los códigos API, así como la nomenclatura utilizada para cada uno se especifican en la tabla V. A todas las cepas pudo ser asignado un código concreto.

DENOM.	CODIGO	DENOM.	CODIGO	DENOM.	CODIGO
a	1 306 721	j	5 305 521	s	5 315 521
b	4 107 721	k	5 305 721	t	5 315 721
c	4 307 721	l	5 306 721	u	5 316 761
d	4 315 721	m	5 307 521	v	5 317 321
e	5 105 721	n	5 307 721	w	5 317 721
f	5 106 721	o	5 307 723	x	5 317 761
g	5 107 521	p	5 307 761	y	5 317 763
h	5 107 721	q	5 307 762	-	-
i	5 117 721	r	5 314 761	-	-

TABLA V. Denominación de cada uno de los 25 api-tipos encontrados.

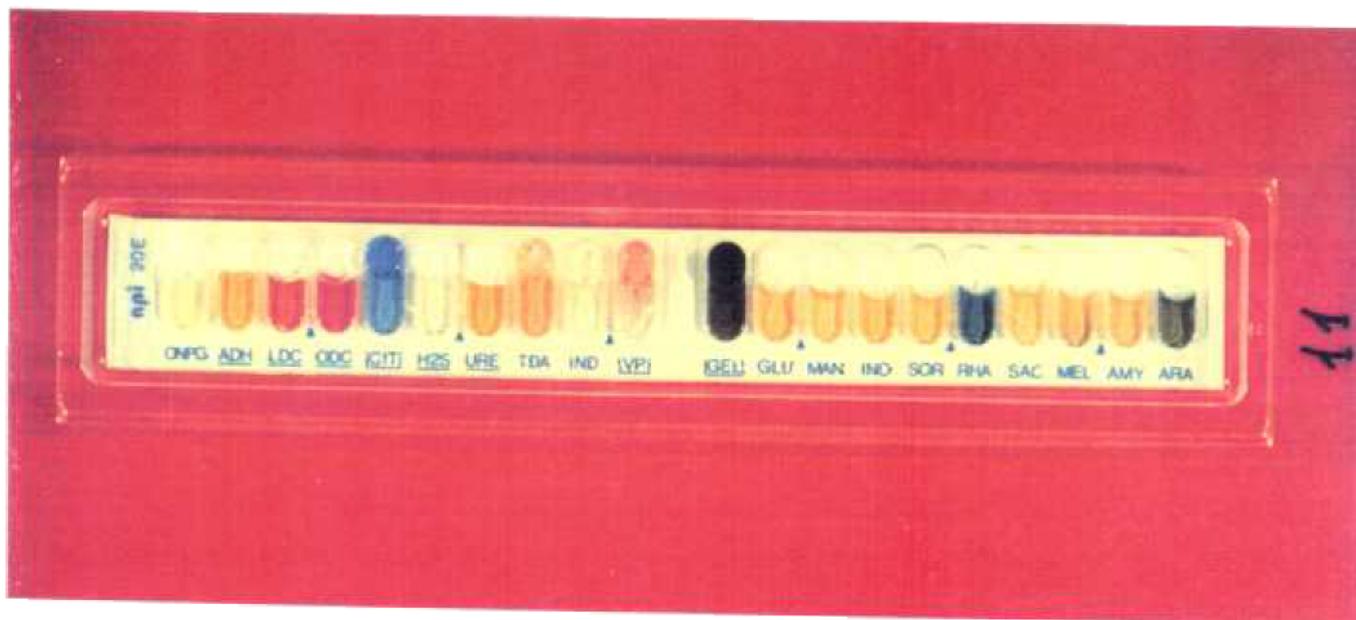


FIGURA 12. Fotografía de un api realizado a una cepa de nuestra colección (api-tipo p).

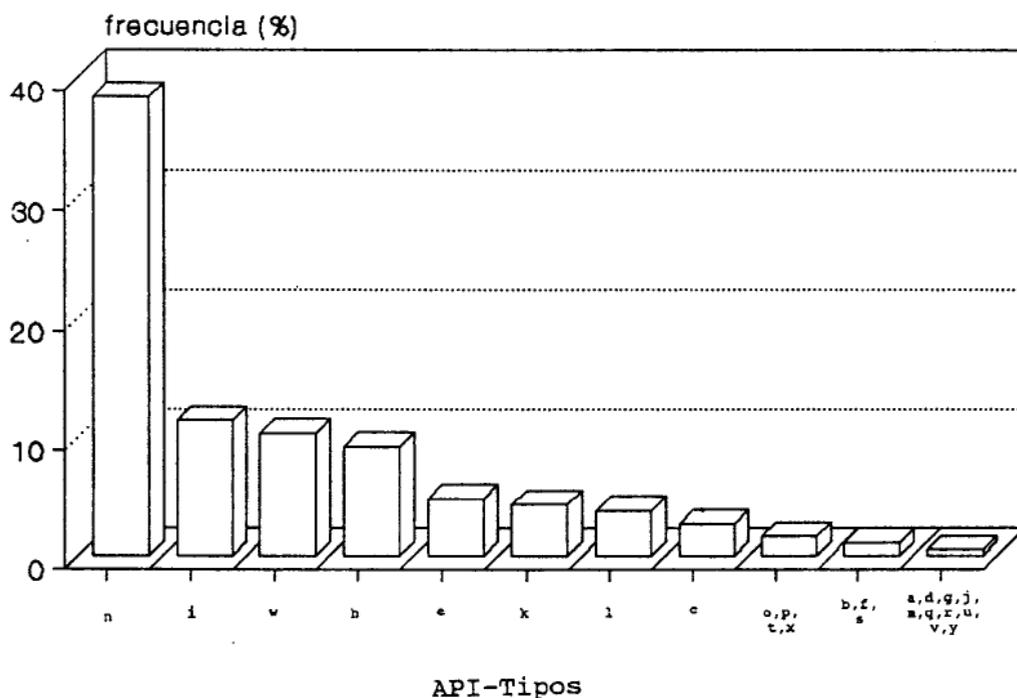


FIGURA 13. Frecuencia de aparición de los API-tipos encontrados.

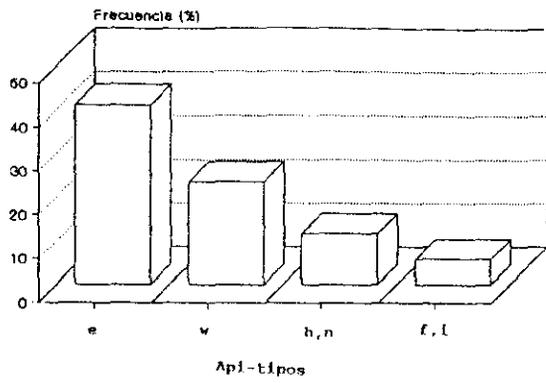
Las frecuencias de resultados positivos de cada una de las pruebas contenidas en la galería se han descrito previamente en esta tesis.

En la figura 12 se muestra un API realizado a una cepa de nuestra colección. Dicha cepa encaja en el perfil que hemos denominado "p".

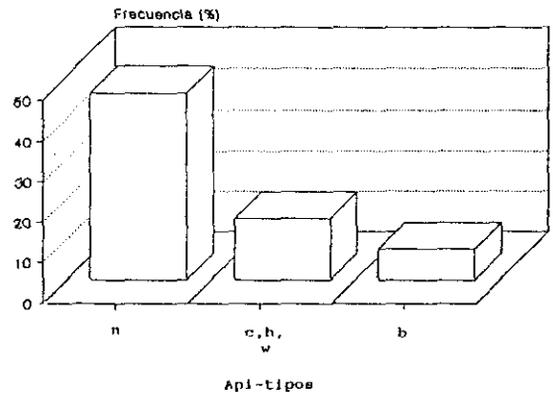
Las frecuencias de aparición de cada API-tipo aparecen recogidas en la figura 13.

La distribución de los API-tipos desglosada por Hospitales, se muestra en la figura 14.

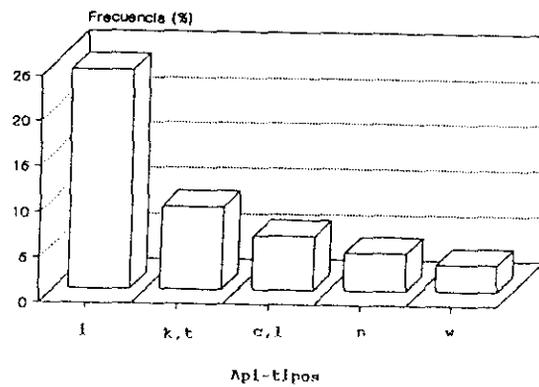
la **tipabilidad** del método es del 100% dado que ninguna cepa fue clasificada como "no tipable". La **reproducibilidad** ha sido fijada en un 62.5% incluso en condiciones ideales de ajuste del inóculo y estandarización del método. El **porcentaje de discriminación** resultó ser de un 81.7%. La **simplicidad** del método es elevada, ya que todos los productos y reactivos son suministrados por el fabricante, y los tiempos de incubación son de 18 horas.



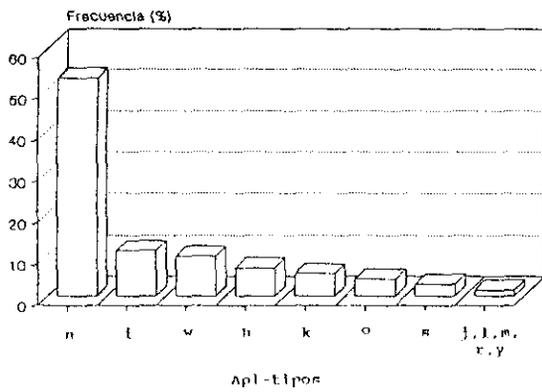
A



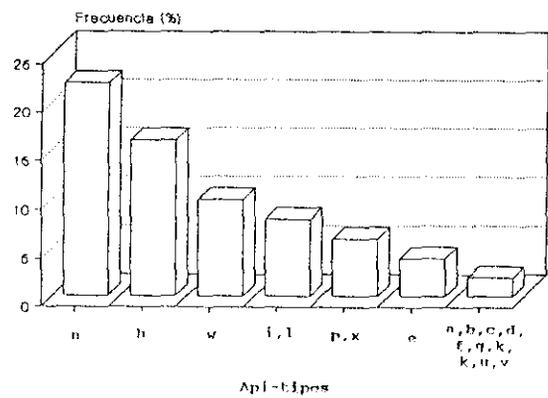
B



C



D



E

FIGURA 14 Distribución de API-tipos por Hospitales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz" (cepas de 1969); B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón; D, Hospital Ramón y Cajal; E, Hospital Universitario de San Carlos.

#### 4.6. SEROTIPIA Y FAGOTIPIA.

Estas dos técnicas fueron realizadas de manera repetida en el departamento de bacteriología del Instituto de Salud Carlos III (Madrid) y la Division of Hospital Infection del Public Health Laboratory Service (Londres). Con los resultados obtenidos en ambos laboratorios, se calcularon los porcentaje de acuerdo que se enuncian a continuación: para la **serotipia** 9.3% y para la **fagotipia** 59.2%. El bajo porcentaje de acuerdo para los resultados de serotipia, puede explicarse por el hecho de que ambos laboratorios utilizaron técnicas distintas (aglutinación y ELISA respectivamente), y en el laboratorio británico se utilizaron dos nuevos antisueros. Los resultados considerados, a partir de este momento fueron los correspondientes al Public Health británico por dos razones: a) El nuevo método de serotipia se había optimizado por ofrecer más discriminación y mayor reproducibilidad; a) la fagotipia se realizó a todas las cepas a la vez, y la interpretación fue realizada por la misma persona.

##### 4.6.1. SEROTIPIA.

Se estudió total de 190 cepas, de las cuales 183 fueron clasificadas en 17 tipos distintos, resultando las 7 restantes no tipables por este método.

Las frecuencias de distribución de los serotipos encontrados se muestran en la

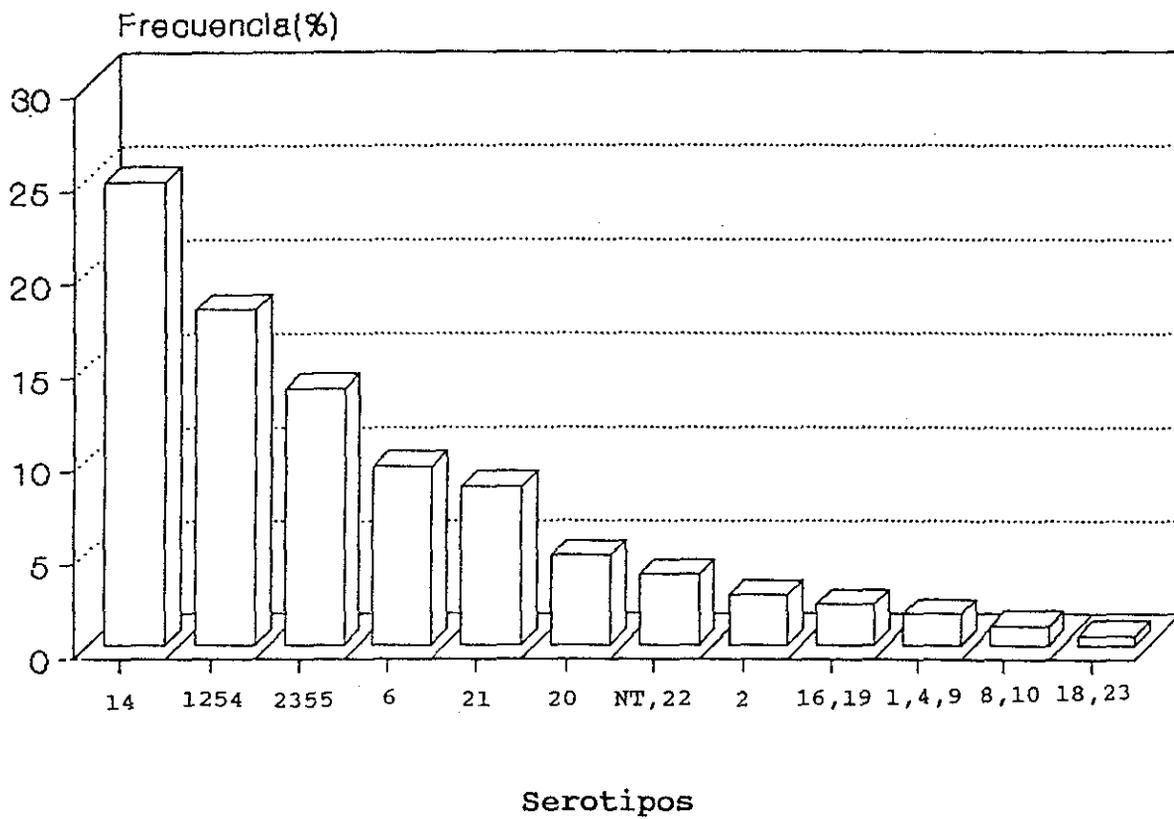
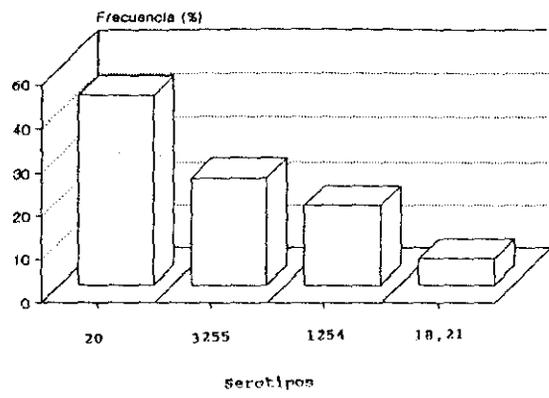
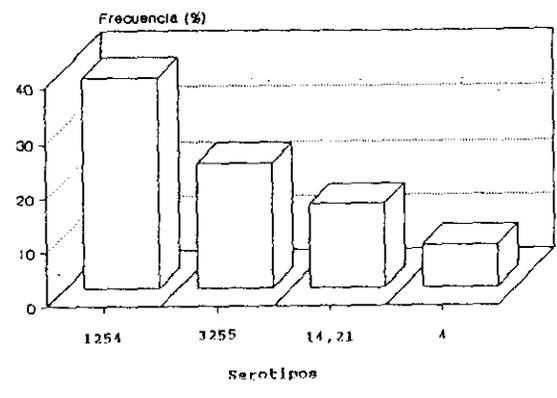


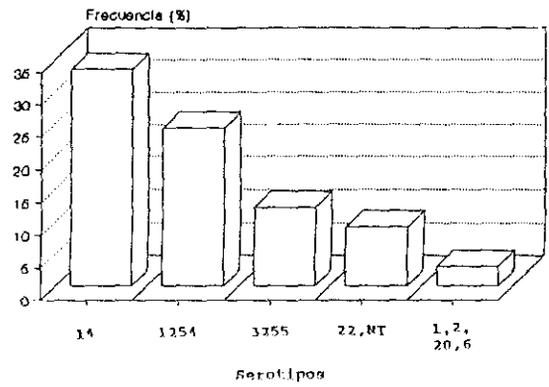
FIGURA 15. Frecuencia de aparición de los serotipos encontrados en las cepas de nuestra colección.



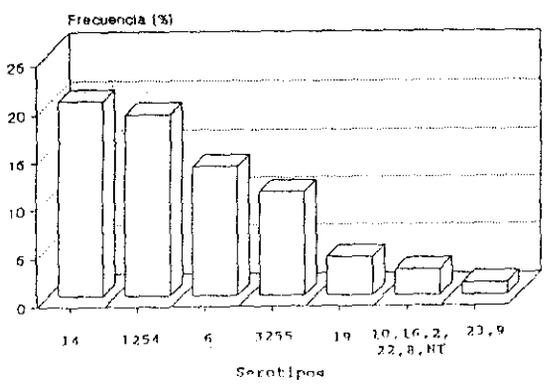
A



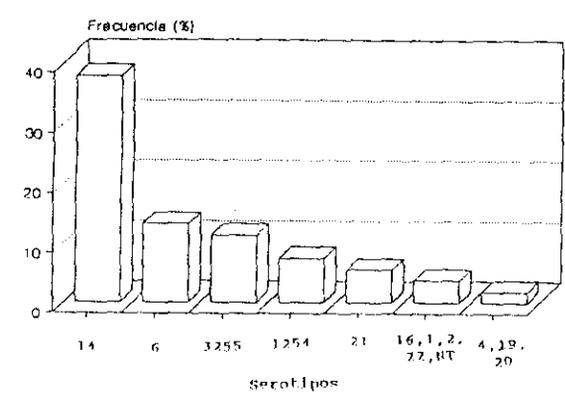
B



C



D



E

FIGURA 16 Distribución de Serotipos por Hospitales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz" (cepas de 1969); B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón; D, Hospital Ramón y Cajal; E, Hospital Universitario de San Carlos.

figura 15.

La distribución por Hospitales de cada serotipo se muestra en la figura 16.

La **tipabilidad** del método se ha fijado en un 96.3%. La **reproducibilidad** en un 97.5 y el **coeficiente de discriminación** en un 87%. La **simplicidad** del método es la típica de una técnica ELISA, con la complicación adicional de que dado que no se comercializan los anticuerpos, se hace necesaria su producción.

#### 4.6.2. FAGOTIPIA.

Fueron fagotipadas 188 cepas enfrentándolas a un juego de 11 fagos específicos de *S. marcescens*. Un total de 29 cepas resultaron no tipables por este método, fijándose por tanto la **tipabilidad** de la técnica en un 84.6%.

Dadas sus limitaciones, es imposible utilizar la fagotipia como marcador epidemiológico por si sola, sin embargo, es utilizada para subclasificar los tipos obtenidos por serotipia.

#### 4.6.3. COMBINACION DE SEROTIPIA Y FAGOTIPIA.

La asociación de estas dos técnicas, es actualmente el método de referencia de tipación de *Serratia*.

Aplicando esta asociación a nuestra colección, hemos conseguido pasar de 17 tipos determinados por serotipia a 58 tipos distintos, además, de las 7 cepas no tipables por serología, 2 han resultado ser tipables por fagotipia. Se ha producido un incremento de **tipabilidad** de un 1.1% (de 96.3% con serotipia a 97.4% con serotipia + fagotipia) y un incremento del **porcentaje de discriminación** de 10.5% (de 87 por serotipia a 97.5 con serotipia + fagotipia).

#### 4.7. RIBOTIPACION: NUEVO MARCADOR EPIDEMIOLOGICO PARA *SERRATIA MARCESCENS*.

##### 4.7.1. EXTRACCION DEL DNA TOTAL.

Muchos métodos fueron empleados en las fases iniciales y fueron desechados igualmente por requerir grandes volúmenes, dificultad de manejo o tiempos largos de operación. El método óptimo para nuestro propósito parecía ser el propuesto por Pitcher et al (1987), pues era sencillo, requería pocos reactivos, se utilizaban volúmenes nunca superiores a 1 ml y se obtenía alto rendimiento de DNA en un

tiempo relativamente corto. La técnica de extracción con G.E.S. no se había ensayado con *S. marcescens* hasta el momento. Los primeros ensayos realizados para obtener DNA total de *S. marcescens* con dicho método no fueron satisfactorios: Los DNAs extraídos parecían ser de buena calidad cuando se estudiaba su densidad óptica a 230, 260 y 280 nm y cuando se sometían a electroforesis, aparecían buenas bandas cromosómicas. Sin embargo, cuando se intentaba una digestión de dichos cromosomas con diversas endonucleasas de restricción, se observaba degradación total del DNA que impedía la observación de los patrones de restricción del cromosoma, incluso a tiempos tan cortos de incubación como de cinco minutos (Figura 17, carriles 4,5,6 y 7). Paralelamente se incubó una muestra de DNA en condiciones ideales para su degradación (fuerza iónica, temperatura, etc) durante 1,5 horas sin enzima de restricción. Después de este tiempo, el cromosoma aparecía, en gel de agarosa, con el mismo aspecto que la misma muestra sin incubar (Figura 17, carriles 2 y 3). Por otra parte extrajimos DNAs de otras especies afines (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*) para observar si obteníamos resultados similares y se obtuvieron DNAs de apariencia normal capaces de ser digeridos por endonucleasas de restricción, ofreciendo perfiles de corte nítidos (Figura 18, carriles 7,8 y 9).

Pensando que el fallo en la extracción de DNA en *S. marcescens* podía deberse a la gran cantidad de nucleasas que dicho microorganismo excreta al medio (104), y que probablemente la cantidad de tiocianato de guanidina empleada no era capaz de desnaturalizar, decidimos modificar la técnica de extracción de la siguiente

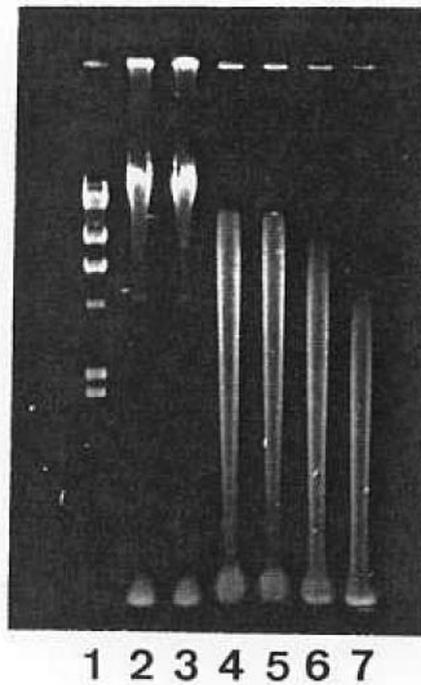


FIGURA 17 Extracción de DNA total en *Serratia marcescens* por el método G.E.S. 1) marcador de pesos moleculares, 2) DNA recientemente extraído, 3) DNA incubado a 37°C durante 1,5h. 4,5,6 y 7) incubación del DNA a 37°C con EcoRI a distintos tiempos (5,10,30 y 60 minutos).

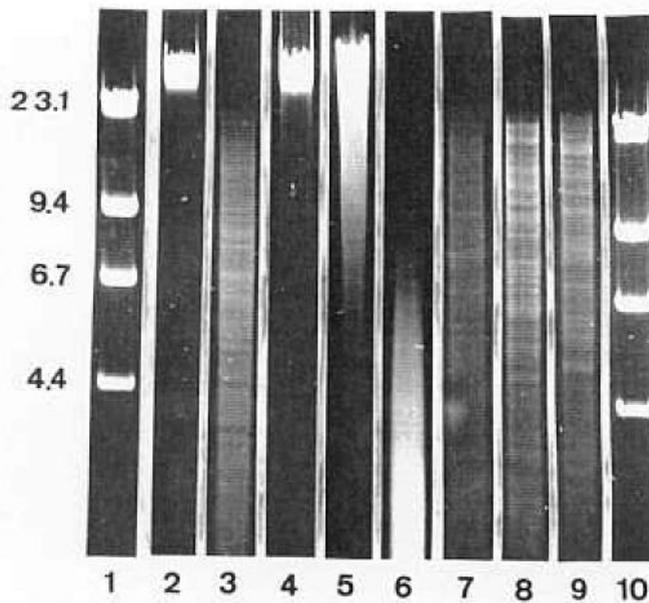


FIGURA 18. Modificación del método de extracción de DNA. 1) marcador de pesos moleculares, 2) DNA de *S. marcescens* extraído con el método modificado, 3) digestión con SspI durante 4h a 37°C de DNA de *S. marcescens* extraído con el método modificado, 4) DNA de *S. marcescens* extraído con el método G.E.S., 5) digestión con SspI durante 10min a 37°C del DNA de *S. marcescens* extraído con el método G.E.S., 6) digestión con SspI durante 4h a 37°C del DNA de *S. marcescens* extraído con el método G.E.S., 7,8 y 9) DNA de otras especies afines extraídas con el método G.E.S. y digeridos durante 4h a 37°C con SspI (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*). 10) marcador de pesos moleculares.

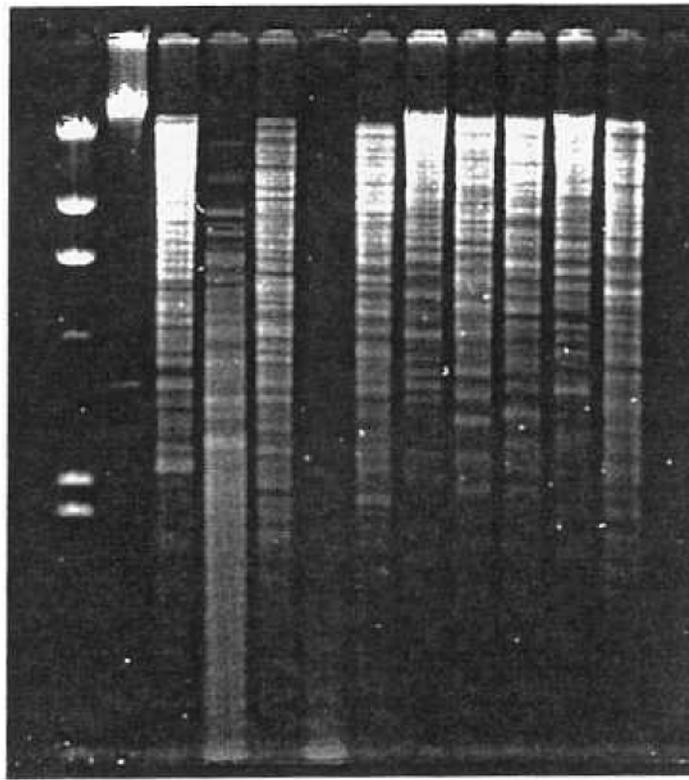
manera:

- 1) Introducción de un paso de eliminación de proteínas con fenol-cloroformo (50:50), justo antes del tratamiento con cloroformo-pentanol (24:1) descrita en el método original.
  
- 2) Incubación con 500  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de Proteinasa K durante 1h a 37°C. Después de ensayar la incorporación de este tratamiento enzimático en distintas etapas del protocolo estándar, decidimos que los resultados óptimos se conseguían realizándolo en la etapa final, después de que el DNA precipitado con etanol, hubiera resuspendido totalmente (2-3h).
  
- 3) Doble etapa de desproteinización química (fenol-cloroformo seguida de cloroformo-pentanol) con objeto de eliminar la proteínasa K utilizada así como los restos protéicos obtenidos.

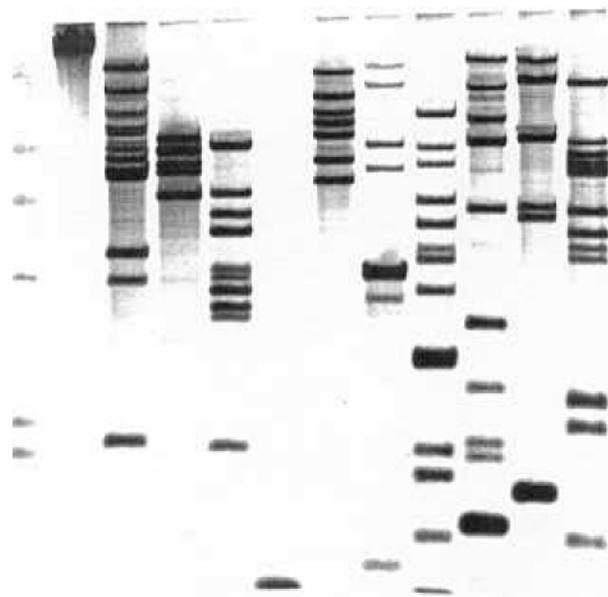
La modificación descrita (103), a pesar de prolongar ligeramente el protocolo de extracción, ofrecía DNAs libres de nucleasas que podían ser utilizados para nuestros propósitos (Figura 18 carriles 2 y 3).

#### 4.7.2. DETERMINACION DE LA ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN OPTIMA.

Para la elección de la endonucleasa de restricción más adecuada para nuestro trabajo, decidimos extraer el DNA total de una cepa de colección, *S. marcescens* ATCC 8100, y digerir por separado con un grupo heterogéneo de endonucleasas de restricción. Utilizamos para ello las siguientes enzimas: BglI, PstI, SaeI, HaeIII, BamHI, XhoI, SspI, DraI, HindIII y EcoRI. El gel fue transferido a una membrana de nylon, que fue hibridada con una sonda biotinilada obtenida por transcripción inversa del DNA codificante para los genes 16S y 23S de RNA ribosómico de *E. coli*. Los perfiles de restricción y los de hibridación aparecen recogidos en la figura 19. A la vista de los resultados obtenidos, se escogió en un principio BamHI por ofrecer un patrón de interpretación sencilla con bandas bien definidas. Tras la realización de algunas pruebas, decidimos descartar tal enzima por las siguientes razones: a) el número de bandas era pequeño obteniéndose por ello baja discriminación, b) las bandas producidas tenían pesos moleculares muy parecidos (altos), aparecían en la misma zona del gel, y era fácil confundirlas entre sí. En este momento, decidimos que la enzima óptima por el patrón que ofrecía era SspI, producía una fragmentación de un amplio rango de pesos moleculares, con bandas claras y en número adecuado, ni reducido (baja discriminación) ni elevado (dificultad de interpretación). SspI ha sido por tanto la endonucleasa de restricción utilizada para la caracterización de las cepas de nuestra colección.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
A



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12  
B

FIGURA 19 Patrones de restricción (A) e hibridación (B) del DNA de *S. marcescens* ATCC 8100 con las siguientes enzimas de restricción: 3) BglI, 4) PstI, 5) SaeI, 6) HaeIII, 7) BamHI, 8) XhoI, 9) SspI, 10) DraI, 11) HindIII y 12) EcoRI.

Hemos observado además que HaeIII produce tan numerosos cortes en el cromosoma de *Serratia*, que ofrece fragmentos de muy bajo peso molecular que no son observables en la electroforesis.

#### 4.7.3. ELECCION DE LAS CEPAS OBJETO DE ESTE ESTUDIO.

Para estimar la validez de la ribotipia como método de subespeciación de *S. marcescens*, se seleccionó, en función de los resultados de serotipia + fagotipia, un grupo de cepas de entre las 209 que formaban nuestra colección. Se eligió así un total de 91 cepas que constituían un grupo heterogéneo y que contenía representaciones de los 5 hospitales estudiados.

#### 4.7.4. RIBOTIPACION DE LAS CEPAS SELECCIONADAS UTILIZANDO SspI COMO ENDONUCLEASA DE RESTRICCIÓN.

Una serie de ensayos iniciales fueron realizados para la determinación del voltaje y del tiempo apropiado en las electroforesis, que se fijaron en 35 voltios y 18 horas.

La aplicación de esta técnica de tipación sobre las 91 cepas preseleccionadas ofreció una serie de perfiles de hibridación, en los cuales aparecía una amplia gama de bandas de muy distintos pesos moleculares. En la totalidad de las cepas, puede

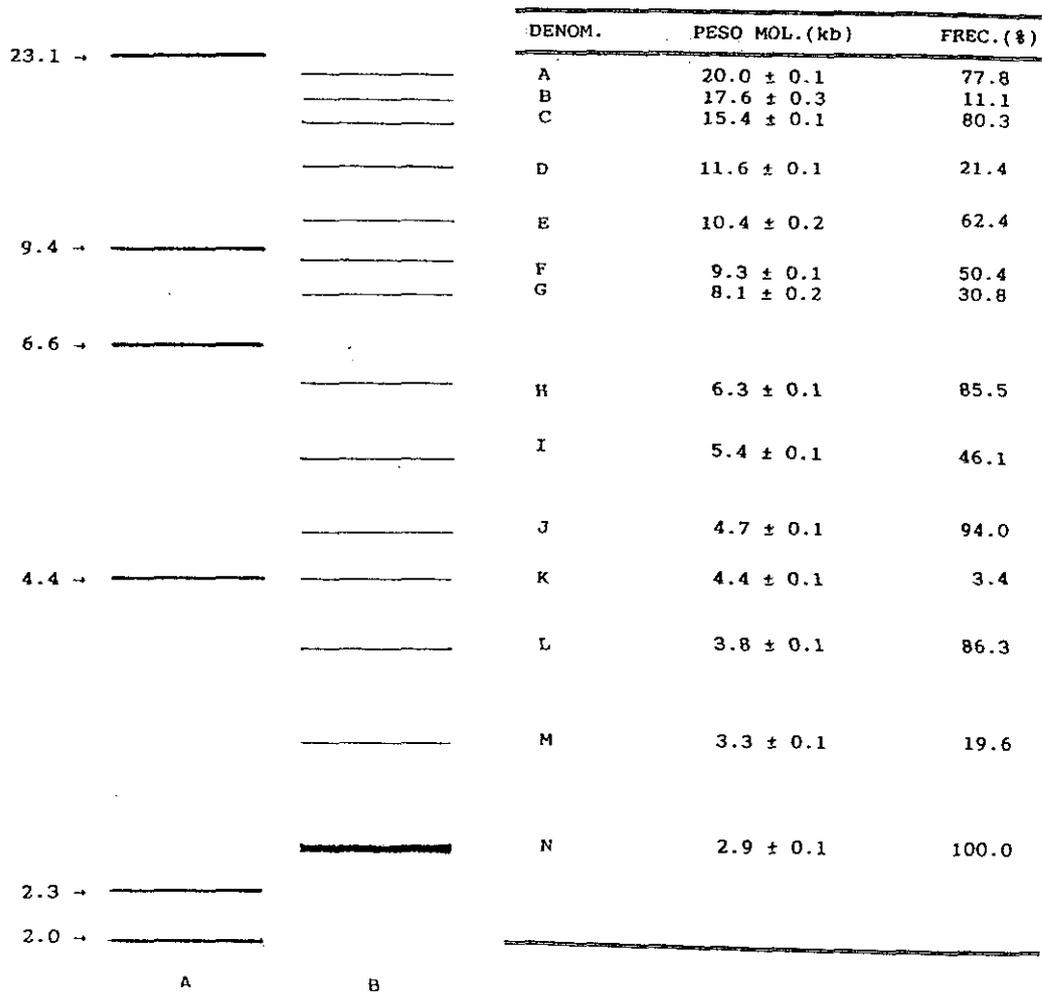


FIGURA 21 A) marcador de pesos moleculares, b) 14 bandas distintas encontradas tras hibridación con una sonda de rRNA de DNAs de *S. marcescens* digeridos con SspI. Se especifica la denominación de cada banda así como su peso molecular y frecuencia relativa de aparición.

RBT.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	RBT.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
R1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R22	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	
R2	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	R23	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
R3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	R24	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	
R4	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	R25	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	
R5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	R26	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	
R6	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R27	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
R7	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R28	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	
R8	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R29	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
R9	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	R30	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	
R10	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	R31	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	
R11	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	R32	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	
R12	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R33	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	
R13	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	R34	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	
R14	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R35	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	
R15	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R36	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	
R16	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R37	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	
R18	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	R38	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	
R19	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	R39	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	
R20	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	R40	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	
R21	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	R41	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	

TABLA VI. Descripción de los distintos ribotipos encontrados en *S. marcescens*. (+, presencia de banda; -, ausencia de banda).

apreciarse la presencia de una banda especialmente gruesa de 2.9 kb, que denominamos "N". En los filtros revelados, por debajo de la banda común se observa un número variable de bandas que en la mayoría de los casos son de difícil interpretación. Tras estudiar la posibilidad de considerar exclusivamente las bandas de pesos moleculares superiores al de la banda N, evitando así tener en cuenta las bandas confusas de pesos pequeños, llegamos a la conclusión de que estas no aportaban prácticamente nada, siendo por ello perfectamente prescindibles. Según lo expuesto con anterioridad, hemos encontrado 14 bandas posibles que varían entre 2.9 y 20 kb ("A"-"N"). Su localización relativa en los filtros, denominación, pesos moleculares y frecuencia de aparición se muestran en la figura 21.

Las 14 posibles bandas se combinan entre sí para formar los distintos "ribotipos". Se han encontrado patrones que contienen desde 4 a 13 bandas distintas, aunque lo más frecuente es que presenten 7 u 8 bandas (59% de las cepas). Se han encontrado 41 ribotipos distintos, que se detallan en la figura 22 y en la tabla VI.

La frecuencia de aparición de cada ribotipo en el grupo de 91 cepas se muestra en la figura 23.

La frecuencia de cada ribotipo en cada Hospital de los estudiados, se detalla en la figura 24.

El grado de relación de las cepas entre sí aparece representado en forma de

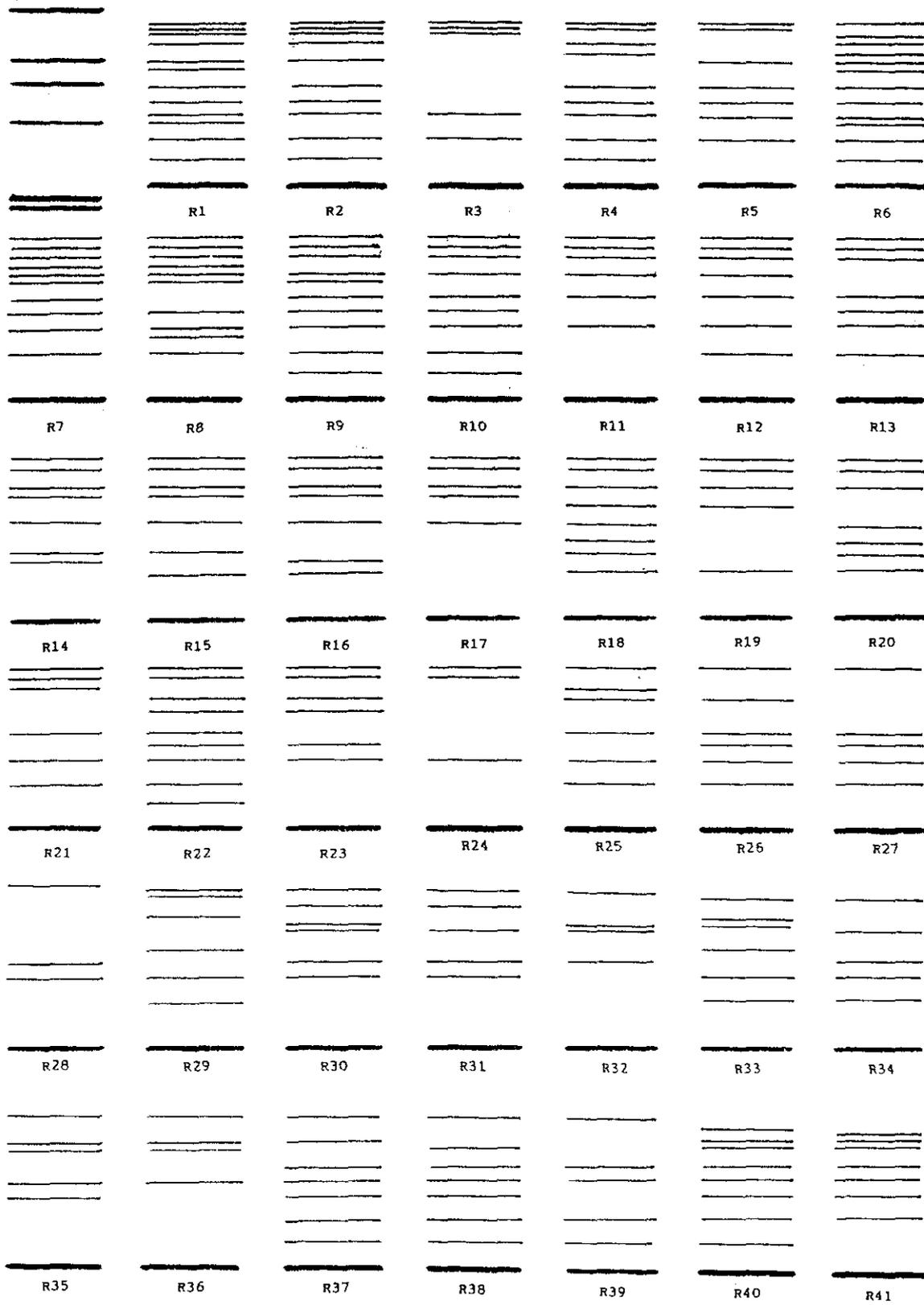


FIGURA 22 Apariencia de los 41 ribotipos encontrados en *S. marcescens* (R1-R41); en la primera posición se representa el marcador de pesos moleculares.

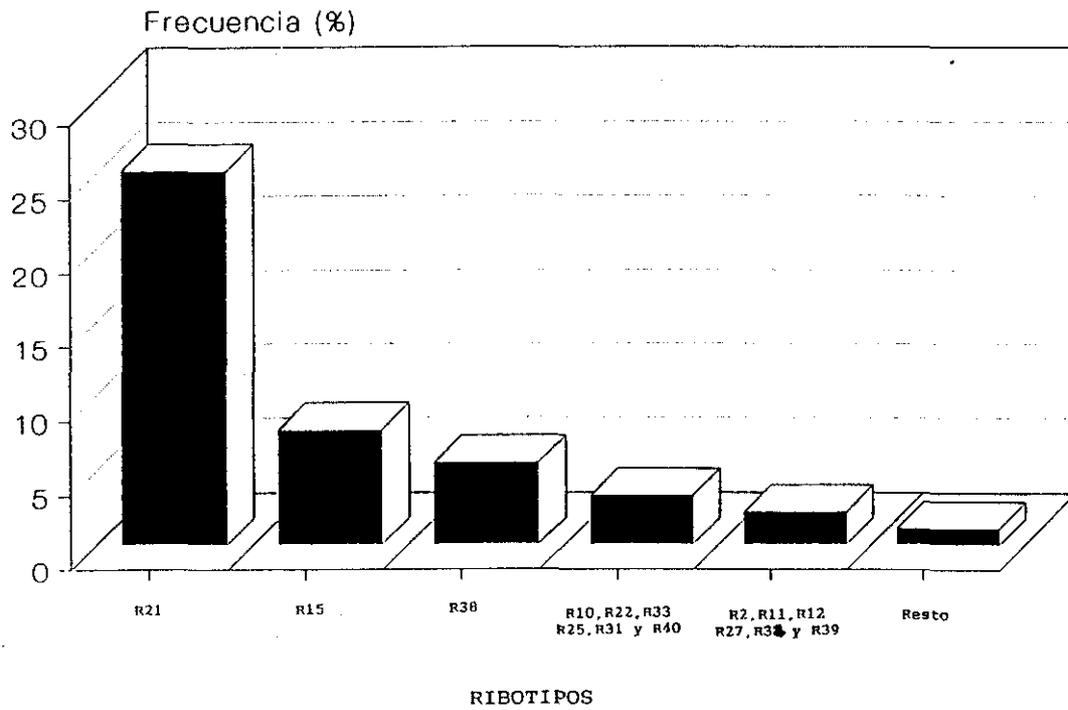
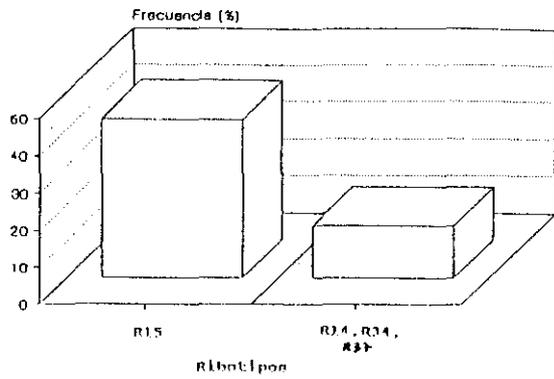
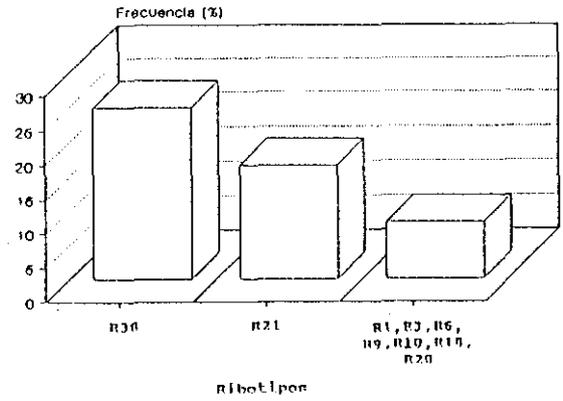


Figura 23. Frecuencia relativa de cada uno de los ribotipos encontrados.

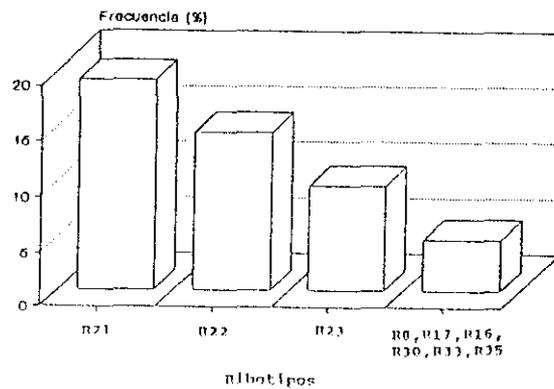




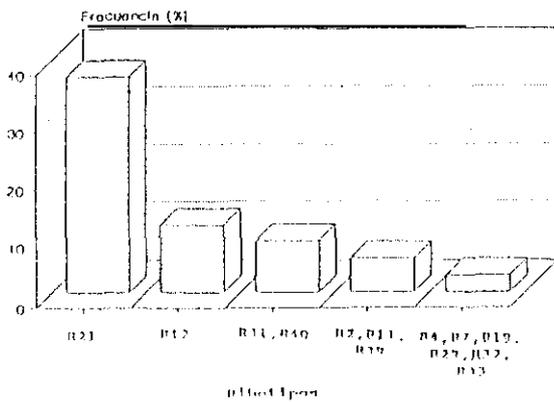
A



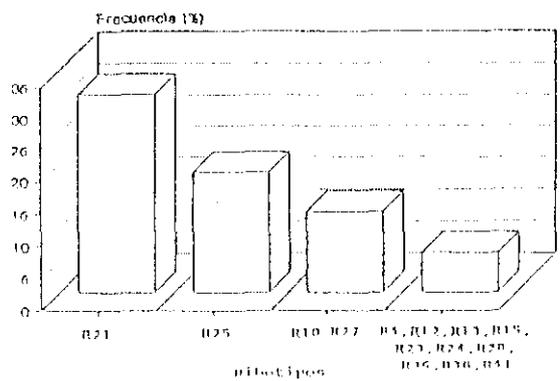
B



C



D



E

FIGURA 24 Distribución de Ribotipos por Hospitales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz" (cepas de 1969); B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón; D, Hospital Ramón y Cajal; E, Hospital Universitario de San Carlos.

dendrograma en la figura 25.



La **tipabilidad** del método ha sido del 100% dado que a todas y cada una de las cepas estudiadas ha podido asignarse un ribotipo. La **reproducibilidad** ha sido evaluada en un 100% en función a la comparación de los resultados para la cepa de colección (ATCC 8100), que fue incluida en todos los experimentos, así como otras cepas que fueron incluidas en más de una ocasión. El **coeficiente de discriminación** fue calculado según el de variabilidad de Simpson aplicado a métodos de tipación bacteriana (43) y se estimó en un 0.925.

A pesar de que las etapas de puesta a punto del método son laboriosas y pueden resultar tediosas, superado este punto, el seguimiento de los protocolos experimentales no reviste mayor dificultad. El tiempo necesario para la emisión de resultados partiendo de un cultivo puro en placa del microorganismo es de 3 días. La distribución del trabajo para cumplir esta premisa es la siguiente:

Día 1 Obtención de DNA total y purificación (4 horas). Digestión con endonucleasas de restricción (4 horas). Carga del gel e inicio de la electroforesis que se realizará durante la noche.

Día 2 Transferencia a vacío a filtros de nylon (1 hora). Fijación del DNA transferido a los filtros a 80°C (2 horas). Prehibridación (4 horas). Inicio de la hibridación que se realizará durante la noche.

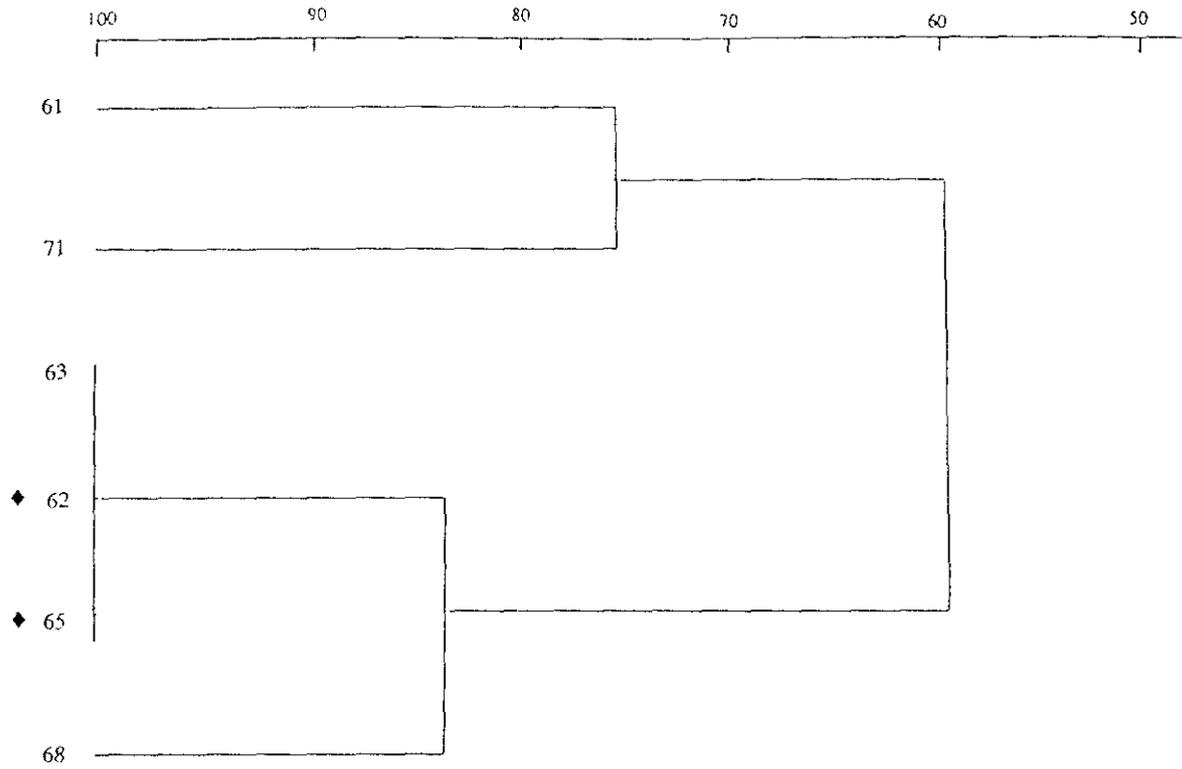


FIGURA 25a. Dendrograma de similitud de cepas pertenecientes al Hospital A (Ciudad Sanitaria "La Paz") basado en sus ribotipos. Las cepas marcadas corresponden a las epidemias propuestas (tabla VII).

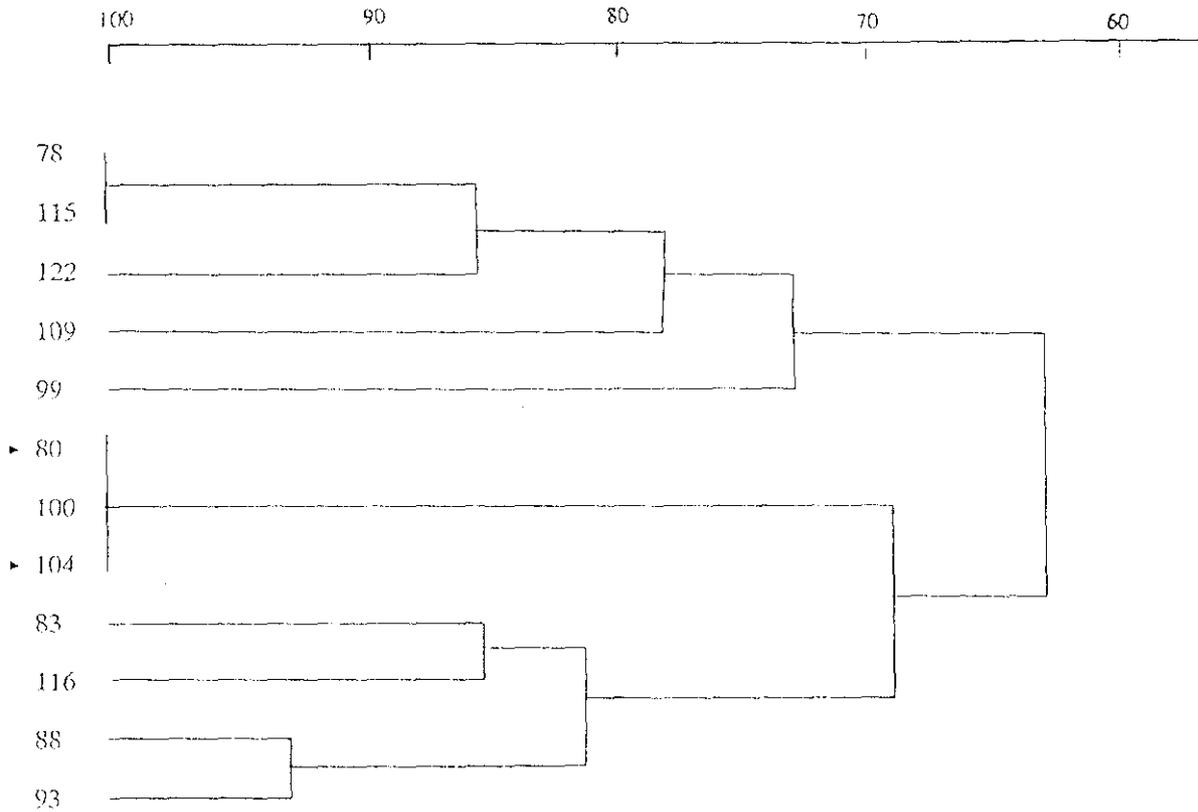


FIGURA 25b. Dendrograma de similitud de cepas pertenecientes al Hospital B (Fundación Jiménez Díaz) basado en sus ribotipos. Las cepas marcadas corresponden a las epidemias propuestas (tabla VII).

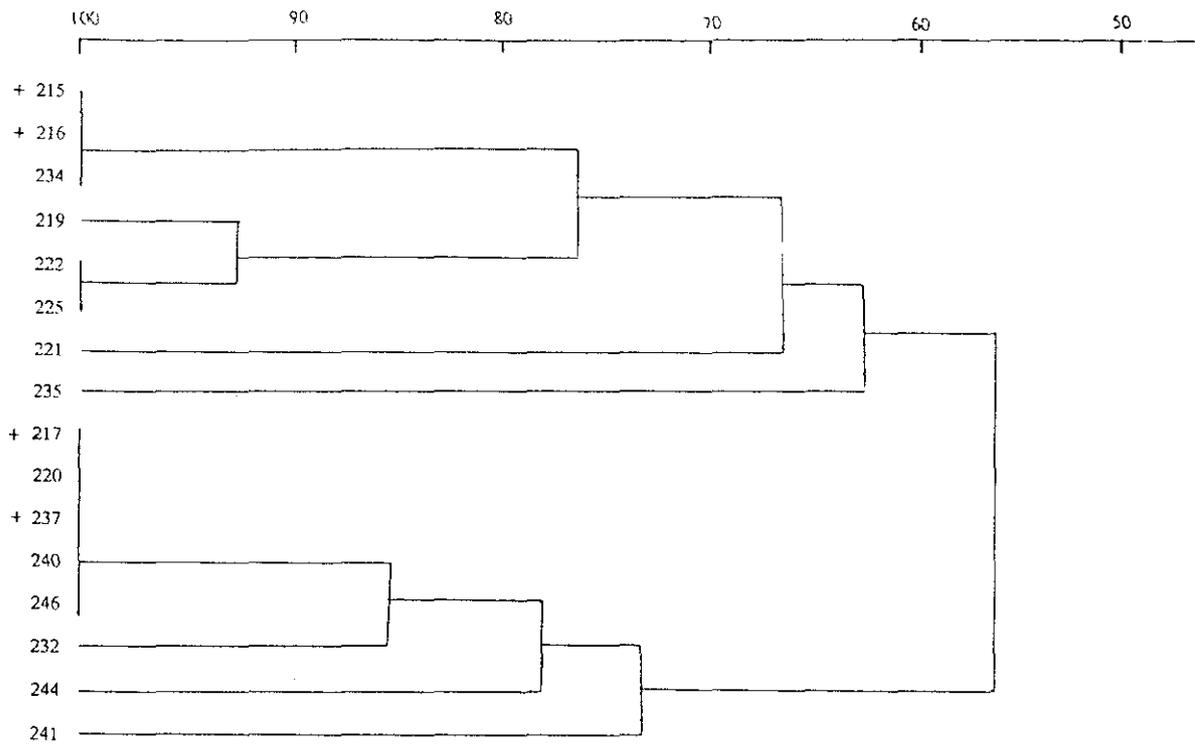


FIGURA 25c. Dendrograma de similitud de cepas pertenecientes al Hospital C (Hospital Gregorio Marañón) basado en sus ribotipos. Las cepas marcadas corresponden a las epidemias propuestas (tabla VII).

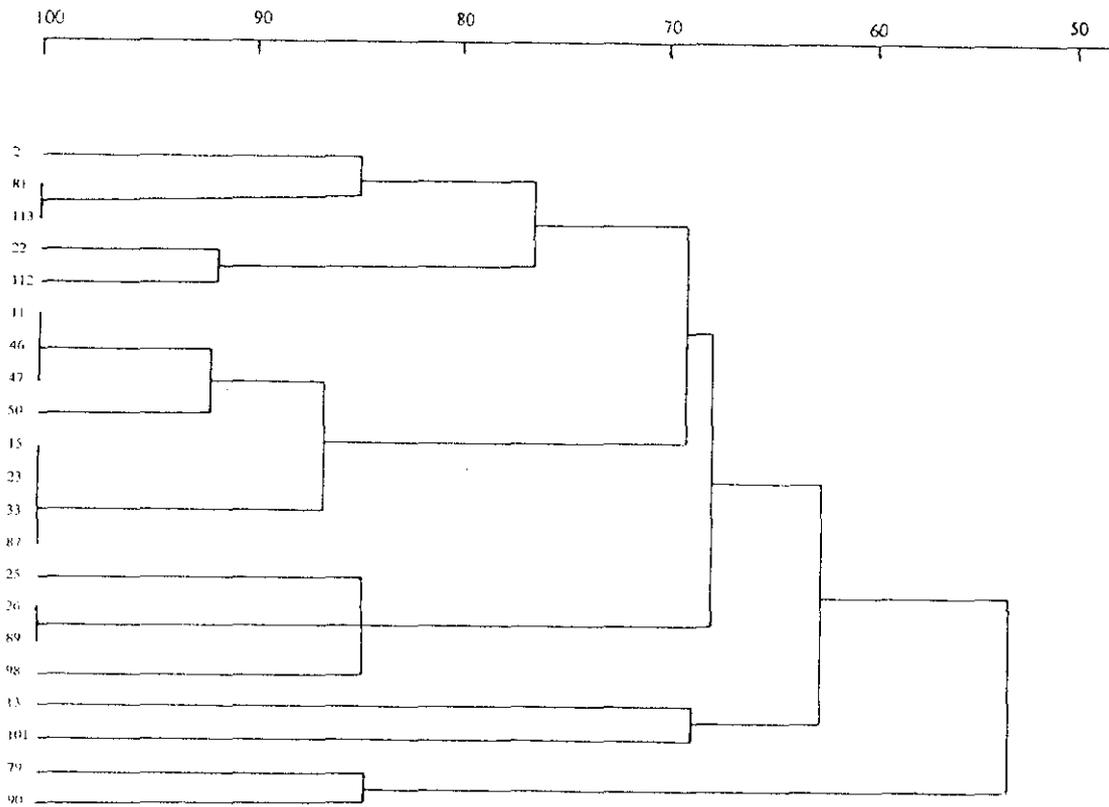


FIGURA 25d. Dendrograma de similitud de cepas pertenecientes al Hospital E (Hospital Universitario de San Carlos) basado en sus ribotipos.

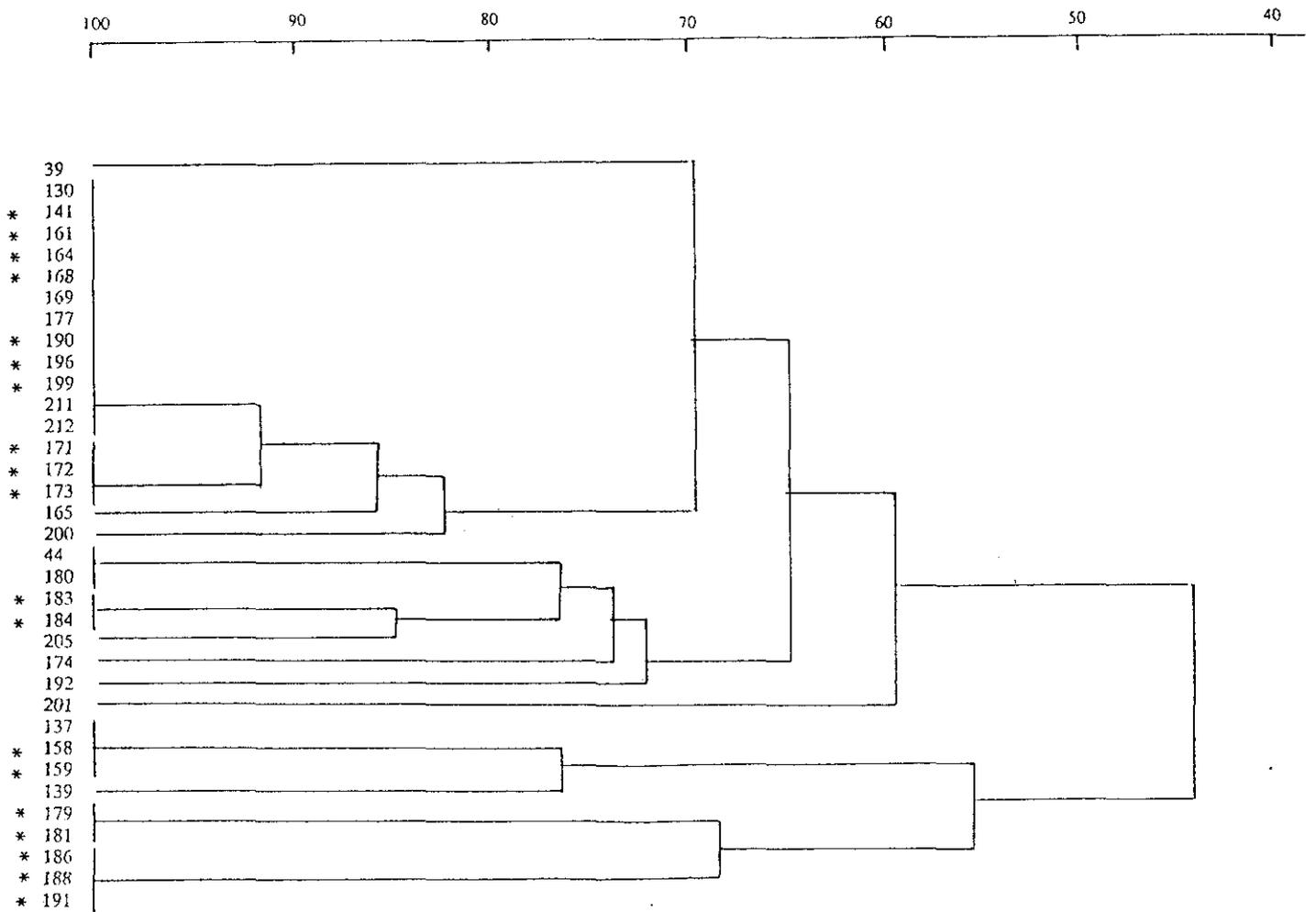


FIGURA 25e. Dendrograma de similitud de cepas pertenecientes al Hospital D (Hospital Ramón y Cajal) basado en sus ribotipos. Las cepas marcadas corresponden a las epidemias propuestas (tabla VII).

Día 3 Detección de las bandas híbridas biotiniladas (3 horas). Emisión del resultado.

Los resultados obtenidos por la aplicación del método a nuestra colección, permitieron evidenciar distintos focos epidémicos. Por otra parte, para probar la eficacia del método, se escogieron parejas de cepas representativas de distintas epidemias europeas previamente confirmadas por mediación de técnicas tradicionales.

#### 4.7.4.1. DETECCION DE FORMA RETROSPECTIVA, DE GRUPOS EPIDEMICOS ENTRE LAS CEPAS DE NUESTRA COLECCION.

Estudiando los datos epidemiológicos de las cepas de nuestra colección (fecha de aislamiento, Hospital, servicio, paciente), ribotipo y marcadores tradicionales, se han obtenido algunos grupos en los que se propone un origen clonal. Dichos grupos han sido detallados en la tabla VII y en la figura 26.

#### 4.7.4.2. COMPROBACION MEDIANTE RIBOTIPIA DE EPIDEMIAS EUROPEAS PREESTABLECIDAS POR OTROS METODOS DE TIPACION.

Los patrones de hibridación de cepas representativas de epidemias europeas se muestran en la figura 27. El número 1 corresponde a tres cepas extraídas de una

CEPA	HOSP.	SERV.	RIBOT.	SEROT.	FAGOT.
215	C	Reanim.	R22	3255	4,6,8,11
216	C	Reanim.	R22	3255	4,6,11
217	C	Nefrol.	R21	1254	NT
237	C	Nefrol.	R21	1254	NT
80	B	Urol.	R38	1254	1,2,4,5,7,9,10,11
104	B	Urol.	R38	1254	1,2,4,5,7,9,10,11
62	A	Neonat.	R15	3255	1,2,4,6,7,11
65	A	Neonat.	R15	3255	1,2,4,6,7,11
141	D	?	R21	21	4
161	D	?	R21	21	4
164	D	?	R21	21	4
168	D	Nefrol.	R21	21	4
158	D	?	R31	16	10
159	D	?	R31	16	10
171	D	UVI Neur.	R12	14	2,3,5,6,7,8,9,11
172	D	UVI Neur.	R12	14	2,3,5,6,7,8,9,11
173	D	UVI Neur.	R12	14	2,3,5,6,7,8,9,11
179	D	Med.Int.	R39	10	2,4,7
181	D	Med.Int.	R39	10	2,4,7
183	D	Urol.	R11	3255	3,4,7,8,11
184	D	Urol.	R11	3255	3,4,7,8,9,11
186	D	Cir.	R40	6	2,3,6,11
188	D	Cir.	R40	6	2,3,6,11
191	D	Cir.	R40	6	2,3,6
190	D	UVI Med.	R21	1254	1,2,7
196	D	UVI Med.	R21	1254	1,2,7
199	D	UVI Med.	R21	1254	1,2,6,7,11

TABLA VII. Posible origen clonal de cepas de nuestra colección estimado por datos epidemiológicos, ribotipia y marcadores tradicionales. A, Ciudad Sanitaria "La Paz"; B, Fundación Jiménez Díaz; C, Hospital Gregorio Marañón y D, Hospital Ramón y Cajal.

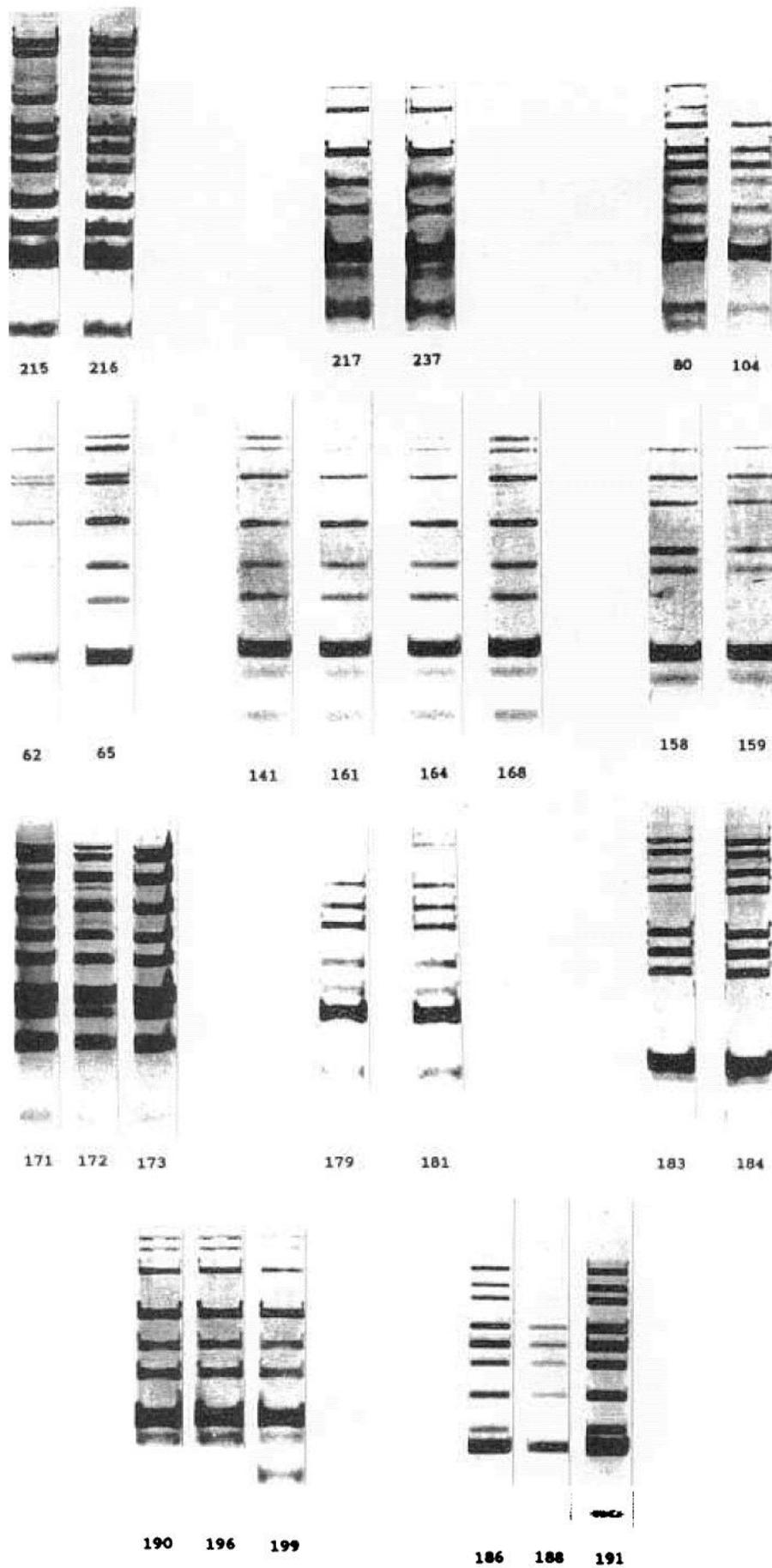


FIGURA 26 Cepas idénticas según ribotipo con posible relación epidemiológica.

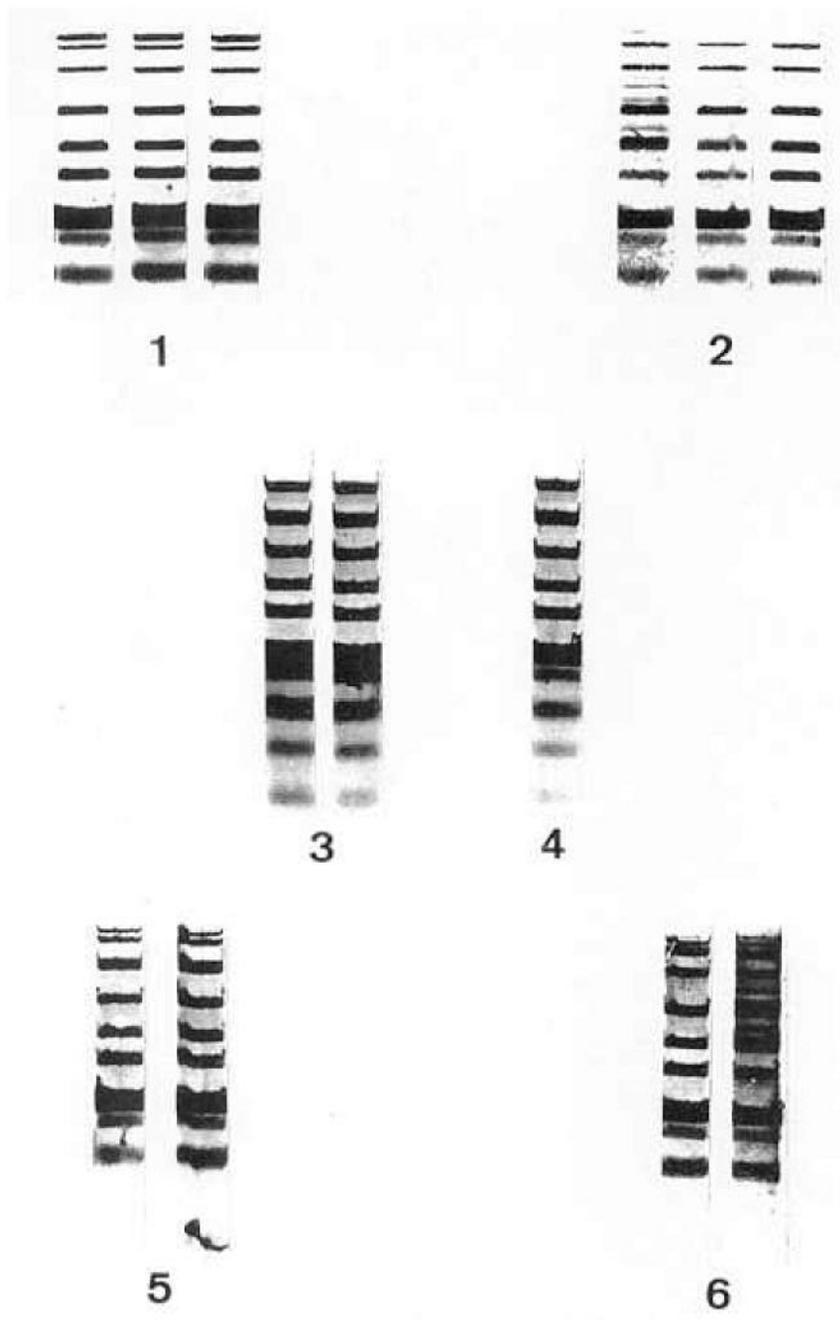


Figura 27 Cepas de *S. marcescens*, representativas de importantes epidemias ocurridas en países europeos. 1) Roselare Clinic for lung and heart diseases, Belgica; 2) Sophia children's Hospital de Rotterdam, Holanda; 3 y 4) St. James Hospital de Dublín, Irlanda; 5) Royal Infirmary de Leicester, Reino Unido y 6) Bereich Medizin (Charité) Der Humboldt-Universität zu Berlin Institute für Mikrobiologie en Berlín, Alemania.

epidemia de 12 aislamientos en el Roselare Clinic for Lung and Heart Diseases de Bélgica en 1989; El número 2 representa a 7 aislamientos realizados en el Sophia Children's Hospital de Rotterdam, Holanda en 1990. El 3 y el 4 con 2 epidemias de 23 y 18 aislamientos que acontecieron en 1987 y 1989 respectivamente en el St. James Hospital de Dublín, Irlanda y que parecen estar causadas por la misma cepa. El 5 representa a una epidemia consistente en 16 casos en el Royal Infirmary de Leicester, Reino Unido en 1990 y el 6 a un conjunto de 73 aislamientos efectuados en el Bereich Medizin (Charité) en la Humboldt-Universität del Berlin Institute für Mikrobiologie de Berlín, Alemania en 1990.

#### 4.8. COMPARACION ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE TIPACION ESTUDIADOS.

##### 4.8.1. OPERATIVIDAD Y EFICACIA DE LAS TECNICAS.

La **operatividad** (simplicidad) de cada método ha sido calculada mediante la descomposición de este parámetro en los siguientes parámetros parciales: no necesidad de un equipamiento especial; facilidad en la preparación de reactivos; estabilidad de productos y reactivos; sencillez del protocolo técnico; corto tiempo de realización y facilidad de interpretación. A cada uno de estos parámetros parciales, se le asignó una puntuación variable entre 1 y 100. Con la media aritmética de dichos valores se calculó el grado de simplicidad global, que aparece

---

reflejado en la tabla VIII.

La **eficacia** ha sido previamente descrita para cada método (ver capítulos anteriores) desglosándola en tres valores: tipabilidad, reproducibilidad y discriminación. En la tabla IX se recogen dichos valores para cada técnica de tipación, así como el valor de simplicidad calculado de la forma anteriormente indicada.

#### 4.8.2. GRADO DE ACUERDO ENTRE LOS DISTINTOS METODOS DE TIPACION.

El grado de acuerdo se calculó estudiando los resultados de cada método de tipación en todas las posibles parejas de cepas de nuestra colección. Con la comparación de estas matrices, dos a dos, se calculó un coeficiente porcentual de similitud (**S**) entre parejas de técnicas de la siguiente manera:

$$S = [(cs + cd) / N] \times 100$$

Siendo **cs** el número de coincidencias de similitud, es decir, número de parejas de cepas que resultan idénticas por los dos métodos en estudio; **cd** el número de coincidencias de disimilitud, número de parejas de cepas que resultan distintas según los dos métodos en estudio y **N** el número total de posibilidades: coincidencias de

	Marces.	Biot.	API	Serot.	Ser+Fag	Ribot.
No equipamiento especial	80	80	80	50	40	20
Fácil preparación de reactivos	30	30	100	10	10	20
Estabilidad de prods. y react.	80	20	80	50	30	50
Sencillez de protocolo técnico	80	80	90	70	60	50
Poco tiempo de realización	90	90	90	80	60	50
Facilidad de interpretación	90	10	80	70	10	90
<b>SIMPLICIDAD GLOBAL</b>	<b>75</b>	<b>52</b>	<b>87</b>	<b>55</b>	<b>35</b>	<b>45</b>

TABLA VIII. Valoración estimativa de la simplicidad de los distintos métodos empleados. Para cada uno de los parámetros y las técnicas de tipación se ha dado un valor de 1 a 100. La simplicidad global se ha calculado como media aritmética de los valores parciales de cada parámetro.

	EFICACIA			OPERAT.
	Tipabil.	Reproducib.	Discrimin.	Simplic.
Marcescintipia	56	97	74	75
Grupos	100	85	78	52
Biotipia				
Tipos	100	72	89	52
API-tipación	100	62	82	87
Serotipia	96	97	87	55
Serot + Fagot	97	78	97	35
<b>Ribotipia</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>92</b>	<b>45</b>

TABLA IX. Valoración de la eficacia (tipabilidad, reproducibilidad y discriminación) y operatividad (simplicidad) de cada uno de los métodos de tipación (valores porcentuales).

	Serot.+ Fagot.	Ribotipia
Marcescinotipia	70.3	66.6
API-tipación	38.5	75.3
Biotipia	88.4	84.4
Bioagrupación	69.8	75.5
Serot. + Fagot.	--	91.3

TABLA X. Valores porcentuales del grado de acuerdo entre métodos de tipación. Se consideraron acuerdos en similitudes y disimilitudes.

similitud + coincidencias de disimilitud + diferencias (número de parejas de cepas que, siendo iguales según un método, resultan distintas según el otro). Dicho coeficiente se calculó para las combinaciones de la técnica de referencia (serotipia + fagotipia) y la técnica molecular (ribotipia), con el resto de técnicas. Los resultados se esquematizan en la tabla X.

## **V. DISCUSSION**

A la vista de nuestros resultados de identificación de los microorganismos recibidos, se puede ver, como era de esperar, que la especie mayoritaria del género *Serratia* es sin duda alguna *Serratia marcescens*, seguida a distancia considerable por *S. liquefaciens*, quizá esto pueda deberse a que son estas dos especies las mayoritarias también en medios naturales (5). La frecuencia de aislamiento de *S. liquefaciens* indicada por Johnson y Ellner (1974) (109) es próxima a la nuestra (9% versus 6%), otros autores (5,110) indican sin embargo frecuencias menores. *S. rubidea* se aisló en nuestra serie en un porcentaje del 1%, frecuencia algo inferior a la propuesta por Johnson y Ellner (1974) (109), y similar a la de Croyce y Lenoc (1977) que indican el aislamiento de una cepa de *S. rubidea* de un total de 111 (8). No hemos encontrado referencia alguna que haga mención a aislamientos en el hombre de *S. plymuthica*, descrita como mayoritariamente habitante de aguas en medios naturales (3).

La mayoría de las cepas estudiadas cumplen las características bioquímicas típicas del género *Serratia*: hidrólisis de la gelatina e incapacidad de fermentación de la rhamnosa. Existen sin embargo un porcentaje estimable de microorganismos identificados como *S. liquefaciens* con capacidad de fermentación de dicho azúcar, se podría considerar su pertenencia a las biovariedades RB o RQ, posibles subespecies "rhamnosa positivas" dentro de la especie *S. liquefaciens* (4).

---

El análisis de las diferencias mayores (más del 15% de divergencia) entre los resultados obtenidos con nuestra serie y los esperados para la prueba API 20E, se comentan a continuación:

En el test de fermentación de la melibiosa, observamos la mayor divergencia de nuestros resultados (6.8% positivas) respecto de los indicados por el fabricante (68%) para *Serratia marcescens*, este test es también origen de discrepancia, aunque en el sentido opuesto para *S. liquefaciens* (75% de positividad en API 20E y 91% en nuestra serie). Sin embargo, nuestros resultados, corresponden mejor que los de API, a lo esperado según tablas de diferenciación: Grimont *et al.* (4) consideran que la melibiosa debe de ser negativa en *Serratia marcescens* y positiva en *S. liquefaciens* en más del 90% de los casos. Es posible que la base de datos en la que se fundamenta el sistema API, haya incluido cepas de clasificación incierta.

Para la prueba de Voges-Proskauer, hemos encontrado porcentajes de positividad del 93.2% y 81.2% para *Serratia marcescens* y *S. liquefaciens* respectivamente. Dichos valores, se desvían más del 15% de los esperados según API, no obstante, son muy próximos a los indicados por otros autores. Farmer *et al.* indican porcentajes del 98% y 93% para los dos microorganismos nombrados con anterioridad (97).

Destaca en comparación con la bibliografía consultada, el alto porcentaje de positividad que indica API (19%) para la fermentación de la arabinosa por *S.*

*marcescens*. El resultado experimental obtenido de un 3.1% está mucho más de acuerdo con los expresados por otros autores (97,111). De forma similar, API propone un porcentaje de positividad para la hidrólisis de la gelatina por *S. liquefaciens* de un 60%, porcentaje que nos parece bajo comparado con el propuesto por Farmer (97) cuyos resultados coinciden más con los nuestros.

No hemos encontrado justificación en la bibliografía consultada para las diferencias observadas en la fermentación del citrato de Simmons por *S. marcescens* (69.6% de las cepas en lugar de un 97-98%), ni en la fermentación del inositol donde se han encontrado porcentajes de positividad menores de los esperados tanto para *S. marcescens* como para *S. liquefaciens*.

Las diferencias observadas en la fermentación del adonitol en comparación con los resultados obtenidos por Farmer (40% de positividad) (97) son notablemente altas, sin embargo, Grimont indica una positividad del 97% (111), lo cual es bastante cercano al valor experimental del 94% obtenido por nosotros.

El espectro de resistencia de un grupo de cepas microbianas depende en último término de la selección que el uso de antibióticos ha provocado sobre dicho conjunto. La presión selectiva en los medios naturales es muy escasa, pero se acrecienta dramáticamente cuando las bacterias llegan a formar parte de la flora asociada al hombre y, en particular, al enfermo hospitalizado. Hemos tenido ocasión en el presente trabajo de tener acceso al primer grupo de aislamientos clínicos de

*Serratia* efectuados en nuestro país en 1969. Hasta entonces, podría considerarse que el reservorio natural de estos microorganismos era sólo el medio ambiente. A partir de entonces, el enfermo hospitalizado se convierte en reservorio y fuente de diseminación de éste tipo de microorganismos, que distribuyéndose en el medio hospitalario acrecienta su posibilidad de contacto con múltiples quimioterápicos. La comparación del espectro de resistencia de las cepas aisladas en el período 1988-90 con aquellas que lo fueron en 1969 es muy revelador (figura 2). Los aislamientos recientes muestran una alta tasa de resistencia a cefoxitina (mayor del 60%), que podría interpretarse como una elevación de la expresión de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica, sin embargo ésta hiperproducción debería afectar de una forma mayor a cefotaxima y ceftazidima, y en menor cuantía a ticarcilina, a no ser que estuvieran implicadas  $\beta$ -lactamasas plasmídicas (112,113). En general, el patrón de resistencias a  $\beta$ -lactámicos que se observa, sugiere la presencia frecuente de mecanismos de permeabilidad alterada, que afectarían de manera preferente a la cefoxitina como ya ha sido reconocido en alguna publicación (114), mecanismo probablemente asociado a expresión normal o elevada de  $\beta$ -lactamasas en parte de las cepas. En las cepas "históricas", no se detectaron con los antibióticos que se utilizaron, ninguna resistencia a cefalosporinas de la segunda o la tercera generación.

Una similar evolución se produce en resistencias a las quinolonas. La resistencia al ácido nalidíxico no existía en 1969 y en la actualidad supera el 40% (probablemente *Serratia* es la enterobacteria con mayor tasa de resistencias a

---

quinolonas en la actualidad), con una alta resistencia también a las nuevas fluoroquinolonas como norfloxacin o ciprofloxacina.

La resistencia a los aminoglicósidos, por el contrario, se encontraba ya presente en 1969 aunque sólo para la kanamicina; la introducción en períodos posteriores de gentamicina, tobramicina y amikacina han provocado un desarrollo muy alto de resistencias, en particular para los dos primeros antibióticos, cuyas resistencias en la actualidad se encuentran en torno al 40% de los aislamiento de *S. marcescens*.

En la figura 3 se puede observar la deriva hacia CMI's más altas de las cepas recientes respecto a las "históricas", incluso considerando niveles de CMI correspondientes a sensibilidad. La mayor parte de las cepas "históricas" eran inhibibles por menos de 0.25 µg/ml de cefotaxima, existiendo un pequeño pico en la distribución en torno a 2-4 µg/ml. Esta subpoblación de las cepas "históricas", parece haberse convertido en la población "sensible" de las cepas actuales, habiendo desaparecido la primera población mayoritaria de muy baja sensibilidad. Por el contrario, no hay variación en la distribución de las CMI's de imipenem en las cepas aisladas en ambos períodos.

En el caso de las quinolonas, se puede observar en las cepas "históricas", la presencia de una subpoblación "sensible" con CMI's elevadas (4 µg/ml) al ácido nalidíxico respecto a la población inhibida por 0.25 µg/ml. 20 años más tarde esta población sensible de baja CMI ha desaparecido y no se encuentra ninguna cepa con

CMI's menores de 8 µg/ml. La elevación del nivel de resistencia en cepas sensibles a norfloxacin es también muy importante. En 1969 no existían cepas con CMI's mayores de 0.5 µg/ml, mientras que en la actualidad no existe ninguna con CMI's inferiores a 1 µg/ml. Verosimilmente, esta situación refleja la influencia en el desarrollo de resistencias a quinolonas de defectos de permeabilidad (probablemente los mismos que afectan a la cefoxitina) unido al desarrollo de DNA girasas mutadas que incrementan la CMI de la norfloxacin. Las diferencias de comportamiento en este sentido entre la norfloxacin y la ciprofloxacina pueden achacarse a la mayor actividad intrínseca de esta última quinolona (40,115).

La resistencia a aminoglicósidos en las dos series no es muy diferente en lo que respecta a la kanamicina, único aminoglicósido ampliamente utilizado en 1969; el incremento de la CMI observado para la tobramicina, gentamicina y en escaso menor grado para la amikacina, sugeriría la emergencia de enzimas modificantes de escaso efecto sobre kanamicina, tales como la acetilasa AAC(6') (38) presente incluso en cepas consideradas como "sensibles". La distribución de CMI's de cloranfenicol en cepas sensibles, fue casi idéntica en ambos períodos. Al igual que en el caso de la kanamicina, este antibiótico era de frecuente utilización en los años 60.

Se puede plantear si las diferencias observadas entre las cepas "históricas" y las recientes sea debida a una pérdida de elementos genéticos producida durante el largo almacenaje; sin embargo, si se comparan las distribuciones en ambos períodos

---

correspondientes a los antibióticos en uso en 1969 (ácido nalidíxico, kanamicina y cloranfenicol) no parecen detectarse variaciones significativas.

Sin poder descartar completamente este fenómeno, los datos son demostrativos del efecto selectivo del uso de antimicrobianos durante décadas sobre el espectro de resistencias de *S. marcescens*. La variación constante en los patrones de sensibilidad provoca una limitación importante en la definición de antibiotipos utilizables en la tipación intraespecífica. Como esta variación ha sido descrita incluso durante un mismo brote epidémico, la antibiotipia tiene un valor limitado en la descripción de grupos intraespecíficos.

Los datos obtenidos e la tipación por sensibilidad a bacteriocinas (marcescinas), según la técnica de Traub (55), se presenta en la tabla IV. Es notable que la mayor parte de nuestras cepas no sean tipables por esta técnica, o bien que muestren patrones líticos previamente no descritos. Esto indicaría la presencia de una considerable variación biológica en *Serratia* desde el momento en que fueron definidas (1971). Dado que las bacteriocinas de Traub son realmente colas de bacteriófagos, se deben haber producido variaciones en los receptores de la membrana externa, que anularían o alterarían la especificidad de la interacción bacteriocina-bacteria. Probablemente se hace necesario mantener esta técnica en uso para ir definiendo nuevos marcescintipos que sustituyan a los primeros.

El porcentaje de cepas clasificadas como no tipables superó, en nuestro caso, el 40%, porcentaje muy alto respecto al de otras series (2), generalmente cercano o inferior al 20%. El 31% de los aislamientos corresponden a nuevos marcescintipos y solamente el 30% corresponden a marcescintipos conocidos. Los marcescintipos VII y XXXI han sido obtenidos con relativa frecuencia en nuestro país (116), pero los marcescintipos XL y LVIII se han aislado muy infrecuentemente tanto en nuestro país como en otros (2).



Con la excepción de los marcescintipos "históricos" obtenidos en La Ciudad Sanitaria "La Paz" en 1969, los aislamientos recientes muestran cierta uniformidad a pesar de proceder de distintos Hospitales. En los Hospitales Ramón y Cajal, Gregorio Marañón y Universitario de San Carlos, los tipos más frecuentes son B y M1, con representación abundante de los marcescintipos VII y XL. Los Hospitales Universitario de San Carlos y Ramón y Cajal comparten la presencia del marcescintipo LVIII. El marcescintipo VII es el predominante en la Fundación Jimenez Díaz, donde ya había sido aislado en una cierta proporción en 1977 (117). Este marcescintipo se puede identificar también entre las *Serratias* aisladas en 1969.

El marcescintipo M2 se encuentra en todos los Hospitales estudiados excepto en la Fundación Jiménez Díaz y era ya identificable en 1969.

Sería importante para el estudio de la variabilidad de los marcescintipos en *Serratia* el identificar la naturaleza de los receptores y sus posibles funciones

fisiológicas. La variación en estos receptores, podría ponerse en correlación con la evolución de los patrones de resistencia a antibióticos.

La distribución de nuestras cepas en biogrupos se refleja en la figura 7. Los biogrupos predominantes en nuestra serie son A3 (32%), A8 (30%), A6 (12%), A1 (7%), A4 (5%), A2 (4%) y TC (4%). Según Grimont (5), el biogrupo más adaptado al medio hospitalario es el A8, siendo el A3 el más ubicuo de entre los descritos. Aunque existen pocos elementos de comparación, cuatro de los seis biogrupos más frecuentes en la población de referencia coinciden con cuatro de los seis primeros en nuestra serie (A3, A8, A4 y A2). La proporción de biotipos dentro de cada uno de los biogrupos predominantes en cada serie es variable. Para el biogrupo A3, nuestro biotipo dominante es el b (17%), seguido del a (18%) y del c (12%), mientras que para Grimont, el biotipo a es el predominante dentro del biogrupo A3. La proporcionalidad en los biotipos del biogrupo A8 (A8a y A8b), es similar en ambas series. Disparidades con la serie de Grimont, se encuentran también en el biotipo A4b, que no se encuentra en la serie francesa, y en el biotipo A2a muy escaso entre los A2 franceses y mucho más frecuente entre los nuestros. El biogrupo A6, tercero en nuestra serie, sólo estuvo representado en un 0.1% de las cepas estudiadas por Grimont.

En la repartición por Hospitales, una vez más se destaca como diferente el grupo de cepas "históricas", con el biogrupo TC como mayoritario, que sólo se encuentra muy raramente en las cepas de reciente aislamiento. A8, A3 y, en menor grado, A6,

están entre los biogrupos predominantes en todos los Hospitales, pudiéndose reconocer ya entre los aislamientos "históricos". Sin embargo, en estos primeros aislamientos el biogrupo A3 viene representado por el biotipo A3c que sólo aparece en muy escasa cantidad en el Hospital Universitario de San Carlos en el período actual. El serotipo predominante en estas cepas del biogrupo A8 es el A8b, presente en alta proporción en todos los Hospitales. El biotipo A3a sólo se encuentra en proporción relevante en el Hospital Ramón y Cajal y el Universitario de San Carlos; en estos mismos Hospitales, el biotipo predominante es el A3b, que se encuentra en menor cuantía en el resto de Hospitales estudiados.

El perfil API-tipo mayoritario en nuestra serie, es el "n", que se encuentra también en los biotipos API más prevalentes en otras series (47,61). Los siguientes tipos en nuestra colección de cepas corresponden a las variantes urea positivo ("w"), citrato negativo ("h") o la combinación de ambos caracteres, urea positivo y citrato negativo ("i"). El biotipo urea negativo ("w"), se da tanto en nuestra serie como en otras en torno al 10% de las cepas estudiadas; sin embargo, nuestra serie es mucho más abundante que otras en la variedad citrato negativo ("h"). Es posible que esto explique la mayor prevalencia en nuestro grupo de cepas del biotipo citrato negativo, urea positivo ("i"). La representación en nuestra serie de los biotipos "p" (variante melibiosa positivo) y "x" (variante urea positivo y melibiosa positivo), es muy escasa, aunque estos biotipos son frecuentes en otras series (47,61).

La repartición hospitalaria de los API-tipos, muestra alguna divergencia. El API-tipo "e" (citrato negativo, inositol negativo), sólo aparece de forma importante entre las cepas "históricas", aunque no es descartable en este caso una pérdida de caracteres debida a la conservación. El biotipo "n" es el más común en todos los casos excepto en el Hospital Gregorio Marañón, donde el API-tipo prevalente es el "i" (urea positivo, citrato negativo).

La distribución de serotipos por la nueva técnica de ELISA (método en fase de publicación), que se refleja en la figura 15, corresponde en su gran mayoría a lo obtenido en otras publicaciones. Confirmamos el predominio del serotipo O:14 al que corresponde la tercera parte de las cepas; no deja de ser sorprendente la constancia de esta proporción en los distintos países (2,54); es posible que este resultado ponga de manifiesto la falta de especificidad del antisuero frente al antígeno O:14 (50). En nuestra serie, los serotipos más prevalentes después de O:14, corresponden a O:1254 y O:2355. Ambos antígenos han sido caracterizados sólo muy reciente a partir de una colección de cepas aislada en el Reino Unido (48). La frecuencia de aparición de este grupo de cepas fue relativamente alta (14% y 4% respectivamente), de forma análoga a lo que ocurre en nuestra serie (17% y 12%). Igualmente, las altas frecuencias de los serotipos O:6 y O:21 en otras series, coinciden con las nuestras. Algunas publicaciones describen el serotipo O:2 como el predominante mientras que está escasamente representado en nuestra serie, así como en la de Pitt. Independientemente de los fenómenos de reacción inespecífica, puede sugerirse la existencia de una repartición bastante homogénea de los serotipos

somáticos en *Serratia* procedentes de distintas series de distintos países, lo que plantearía la posibilidad de la asociación de determinados serotipos con la capacidad colonizante de mucosas en el hombre; esto plantearía la cuestión del estudio comparativo de serotipos en cepas medioambientales.

La distribución por Hospitales refleja una vez más la disparidad de los serotipos "históricos" respecto de los actuales, con predominio del serotipo O:20 que está muy escasamente representado en nuestros días. Sin embargo, los "nuevos" serotipos O:3255 y O:1254 se encontraban ya en 1969 con elevada frecuencia en nuestro país.

Como ya se ha comentado, la técnica de fagotipia se ha utilizado para complementar el poder discriminativo de la serotipia, así como para la caracterización de cepas implicadas en procesos epidémicos, en estos casos es frecuente la asociación de un patrón fijo de lisis a un determinado serotipo (ver tabla VII más adelante).

El fagotipado debe, pues, considerarse como una técnica complementaria con escasa utilidad por sí misma, condicionada por la difícil interpretación y la variabilidad de los resultados, probablemente derivada de los cambios en expresión de proteínas receptoras de fagos en la membrana externa de la bacteria. Esta variabilidad no se observa, sin embargo, al utilizar colas de bacteriófago purificadas (marcescinotipia), por lo que podría sugerirse una heterogeneidad en la capacidad replicativa y/o lítica de los bacteriófagos en las distintas cepas de *Serratia*.

---

La técnica de ribotipación exige, como fase previa, la extracción de DNA total de las cepas a estudiar. Aunque los procedimientos habituales de extracción con G.E.S. han mostrado su eficacia en distintos géneros bacterianos (*Legionella*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Campylobacter*, *Neisseria*, etc.) (101), parecieron en un primer momento inaplicables para el caso de *S. marcescens*. Incluso con períodos de incubación tan cortos como 5 minutos, se producía, al tratar con endonucleasas de restricción, una degradación completa del DNA, sin que pudieran apreciarse bandas en los geles. Esta dificultad pudo ser soslayada mediante una modificación en el protocolo original que incluía una desproteínización química y enzimática del extracto. La recuperación de un patrón de bandas tras la aplicación de este método modificado, sugiere que la degradación era producida por enzimas de *Serratia* activas en los extractos como las DNAsas características de este microorganismo. La técnica G.E.S. fue diseñada para trabajar en condiciones de alta actividad nucleasa y, de hecho, no presenta problemas en su aplicación a otros microorganismos productores de DNasa extracelular tales como *Staphylococcus aureus*. Posiblemente, la deoxirribonucleasa de *S. marcescens* presenta una mayor actividad o es producida en mayor cantidad que la de *Staphylococcus*. En todo caso, la modificación introducida en este trabajo permitió la aplicación del método a la ribotipación de *S. marcescens*.

La digestión con 10 enzimas distintas de la preparación del DNA obtenida, ofreció una serie heterogénea de patrones de restricción. La multiplicidad de cortes producida por HaeIII, con práctica degradación total del cromosoma, excluyó la

---

posibilidad de utilización de este enzima. Se puede sugerir que la corta secuencia de reconocimiento característica de HaeIII, GG↓CC, es particularmente frecuente en el cromosoma de *Serratia*, género con una alta proporción de G + C (60%). Por el contrario, la enzima finalmente elegida, SspI, da lugar a un número adecuado de bandas y reconoce una secuencia, probablemente menos frecuente en el cromosoma de *Serratia* (AAT↓ATT) (100). En el caso de *E. coli*, con un porcentaje de G + C del 50%, SspI produce unos 250 cortes según los datos de GenBank (118).

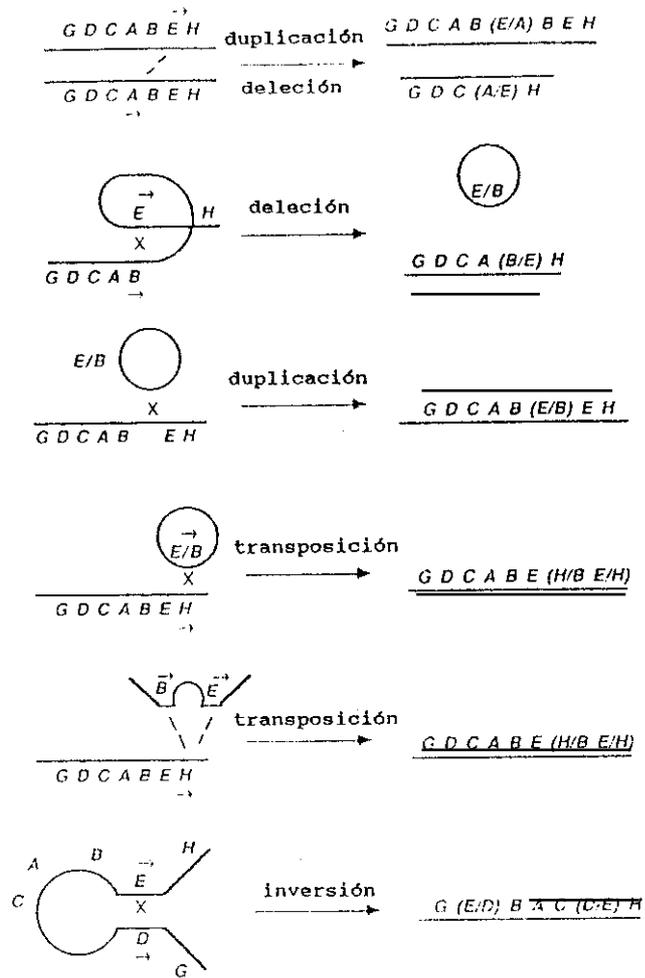
Según los resultados obtenidos, las secuencias de rRNA de *S. marcescens* son reconocidas eficazmente por una sonda desarrollada a partir de secuencias rRNA de *E. coli*. Este es el resultado esperado, ya que se ha comprobado que el rRNA de *E. coli* o *Pseudomonas* hibrida "in vitro" con los cistrones de rRNA de un alto número de bacterias gram positivas y negativas, como posible consecuencia del hecho del alto grado de conservación en este tipo de secuencias (69). Con el grupo de enzimas ensayado, hemos obtenido entre 4 y 13 fragmentos capaces de hibridar con la sonda utilizada. Se desconocen cuantas unidades transcripcionales rRNA contiene *Serratia* (7 en el caso de *E. coli*); sin embargo, puesto que la hibridación con la misma sonda sobre el cromosoma de otras enterobacterias ofrece un número similar de fragmentos con distintas enzimas, podría inferirse un número de operones rRNA igualmente similar al de *E. coli*. Es difícil interpretar la presencia de bandas de alta densidad que podría corresponder a la suma de fragmentos de igual peso molecular conteniendo una secuencia (o fragmento) rRNA, o bien, a la presencia de un fragmento único conteniendo varios operones rRNA. En *E. coli*, al menos 4 operones se encuentran

---

situados en un fragmento de 10 minutos del cromosoma (119). Esta última interpretación es poco verosímil, dado que, al menos en *E. coli*, el operón rRNA mide unas 6kb, tamaño muy superior al de la banda de alta densidad obtenida tras la hibridación de fragmentos de restricción obtenidos con SspI (2.9kb). Podría sugerirse una hipótesis alternativa considerando que la secuencia del operón rRNA contuviese una diana SspI en su zona central y dos próximas a ambas zonas marginales, de este modo, existirían dos zonas de hibridación para un único operón rRNA y cada una de estas zonas produciría una hibridación completa con la sonda, puesto que cada una tendría unas 3kb. Esto justificaría que la banda de alta densidad suela estar entre las de más bajo peso molecular, y además, se encuentre en el 100% de las cepas estudiadas, como correspondería a la presencia de frecuencias altamente conservadas en todas las cepas. Razonamiento similar podría explicar la presencia de bandas de alta frecuencia en las cepas. La frecuencia de bandas infrecuentemente localizables en los geles, implicaría la pérdida o la adquisición de secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción.

Se utilizaron para ribotipación los fragmentos de pesos moleculares superiores al de la banda N de alta densidad, excluyendo las hibridaciones con bandas de bajo peso molecular (inferior a 2.9kb) que producen señales más débiles y que se encuentran en zonas de baja resolución del gel. A partir de las 91 cepas estudiadas, se han obtenido 41 ribotipos distintos, lo que parece mostrar la alta frecuencia de los polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) en *S. marcescens*. Se podría considerar que esta variabilidad implicaría una falta de estabilidad en el mapa

genético. El alto grado de polimorfismo es debido a la similitud en secuencias de los distintos operones rRNA, lo que les convierte en excelentes sustratos potenciales para la recombinación homóloga. En dependencia de la posición y orientación de los genes y del grado de sobrecruzamiento entre ellos, se produce una variedad de configuraciones distintas. Hay que tener en cuenta que en *Serratia*, como ocurre en *E. coli*, debe existir un alto grado, pero no una completa homología entre las distintas secuencias rRNA.



Reordenaciones cromosómicas.

Estudios realizados sobre regiones genéticas duplicadas en *E. coli* (120), mostraron que las regiones flanqueadas por operones rRNA tienen mucha más facilidad de duplicarse que otras porciones del genoma. Las reorganizaciones cromosómicas debidas a sobrecruzamientos entre operones rRNA producen, además, deleciones inversiones y transposiciones (121,122). En la figura se muestran algunos de estos fenómenos de reordenamiento cromosómico por sobrecruzamiento. Se han realizado algunos estudios sobre la frecuencia de estos acontecimientos en *E. coli* (122), en este microorganismo, las deleciones entre *rrnB* y *rrnE* ocurren a frecuencias de 0.1

---

a  $0.2 \times 10^{-3}$ , e inversiones entre operones *rrn* separados por 18 minutos de cromosoma pueden darse con frecuencias de  $10^{-5}$  (123). Puesto que parece que las reorganizaciones cromosómicas se dan con una frecuencia mucho mayor que la mutación por sustitución de bases, se puede plantear si estas alteraciones provocan alguna modificación en la biología del microorganismo. En general, los fenómenos de selección periódica favorecen la permanencia de una configuración predominante, sin embargo, dado que la expresión de algunos genes puede beneficiarse de una determinada organización, factores ambientales podrían favorecer la supervivencia, en un determinado hábitat, de una configuración secundaria sobre la original. Por otra parte, no se puede excluir la presencia en *Serratia* de otras reordenaciones cromosómicas como resultado de la recombinación entre otros genes múltiples diseminados en el cromosoma, como es el caso de las secuencias de inserción, secuencias para RNA transferentes además de genes codificadores de proteínas análogas y secuencias *rhs* (124). En este último caso, el tamaño de las secuencias *rhs*, 3.8kb, es análogo al de los genes *rrn*, y la frecuencia con la que se produce reorganización por recombinación *rhs* es, como en el caso anterior, del orden de  $10^{-4}$ .

La variabilidad observada en los ribotipos esconde, posiblemente, grados distintos de homología. El análisis de los dendrogramas (figura 25), indica un grado de homología de bandas superior al 85% entre los ribotipos R14, R15, R18, R21, R25 y R33, que podría corresponder a configuraciones alternativas de microorganismos relacionados entre sí. Este conjunto de ribotipos constituye, de

hecho, más del 40% de todas las cepas estudiadas. Es posible que un estudio prolongado de los ribotipos en el seno de una institución, permitiera observar variaciones evolutivas; en este sentido, el ribotipo R15 corresponde al mayoritario en las primeras cepas aisladas en España, habiendo sido sustituido en épocas recientes por el R21 que difiere de él tan solo en la banda F (presente en el R15 y ausente en el R21). Esto podría ser interpretado como una evolución de un ribotipo en otro por pérdida de una banda.

Puede ser de interés en la evaluación del estado de endemidad de una determinada bacteria dentro de una institución, la consideración del nivel mínimo de similitud en el ribotipo de sus aislamientos. De este modo, en nuestro caso, el Hospital Ramón y Cajal tendría el menor grado de endemidad (máxima variabilidad) en sus aislamientos, con una similitud mínima del 43%, mientras que la Fundación Jiménez Díaz tendría el máximo grado de endemidad con un 62% de similitud mínima (figuras 25e y 25b respectivamente). Estos coeficientes deberían ser corregidos, en análisis más amplios, para asegurar que no se incrementan de forma no significativa a partir de un número muy limitado de cepas con escaso nivel de similitud.

El valor de la ribotipia en la definición de brotes epidémicos se refleja en su alto grado de correlación con serotipos y fagotipos concretos aislados en contextos espacio-temporales determinados (tabla VIII). Este trabajo ha puesto de manifiesto la posible clonalidad de distintos aislamientos de *Serratia* en 11 brotes

intrahospitalarios madrileños. El patrón homogéneo de bandas (figura 26) permitió la consideración de brote epidémico de cada grupo de aislamientos producido durante un tiempo limitado en un único Servicio. Una demostración de la eficacia del método de ribotipia en la definición de brotes epidémicos, se realizó al estudiar por este método aislamientos procedentes de situaciones epidémicas establecidas por otros criterios. A tal efecto se obtuvieron cepas procedentes de epidemias bien establecidas en distintos países europeos. En cada una de esas epidemias se obtuvieron cepas cuyos ribotipos presentaban, una vez más, patrones homogéneos de bandeo (figura 27).

La introducción de un nuevo método de análisis intraespecífico debe ser necesariamente valorado en relación con la operatividad y eficacia de los métodos preexistentes. La operatividad (simplicidad) mayor entre los métodos previamente descritos, corresponde a la API-tipación (87%); sin embargo, la utilidad global de este procedimiento queda reducida por el bajo nivel de reproducibilidad (62%). La marcescinotipia por la técnica de Traub tiene un buen nivel de simplicidad, pero el bajo número de aislamientos tipables limita la eficacia del método. La biotipia, con un alto nivel de tipabilidad, posee sin embargo una limitación importante: la dificultad de interpretación y lectura de resultados. Lo mismo ocurre con la técnica de referencia, que combina serotipia y fagotipia; aunque la eficacia de esta técnica es muy alta, tiene importantes problemas en cuanto a su realización e interpretación, poseyendo el menor índice de simplicidad. La ribotipia, de realización algo más fácil que el método de referencia, supera a este claramente en su nivel de

reproducibilidad, un carácter especialmente importante en la definición de brotes epidémicos. Una valoración conjunta de las técnicas ensayadas se refiere en la tabla X, en la que se compara, en especial, el grado de acuerdo entre la técnica de referencia y la ribotipia con el resto de los métodos. De forma global, la ribotipia muestra grados de acuerdo similares o mayores que la técnica de referencia respecto al resto de técnicas. En particular, la combinación serotipia–fagotipia correlaciona muy escasamente con la API–tipación, mientras que la ribotipia consigue un grado de acuerdo considerable.

La evaluación conjunta muestra que la ribotipia parece ofrecer ventajas prácticas sobre otros métodos para la realización de análisis intraespecíficos en aislamientos clínicos de *S. marcescens*.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. En el estudio de 250 cepas del género *Serratia* aisladas en 5 Hospitales de Madrid, se han identificado 230 *S. marcescens* (92%), 15 *S. liquefaciens* (6%), 3 *S. rubidea* (1%) y 2 *S. plymuthica* (1%).
2. Parece haber existido una evolución importante hacia la resistencia a antibióticos en este género afectando, preferentemente, a la cefoxitina, quinolonas y aminoglicósidos. Esta evolución se pone de manifiesto no solamente en la elevación de los porcentajes de cepas resistentes, sino también en la menor susceptibilidad de los aislamientos catalogados como sensibles.
3. Las técnicas de análisis intraespecífico de base funcional (biotipia, bioagrupación y API-tipación) muestran bajos niveles de reproducibilidad, siendo estos más elevados en las técnicas de base estructural (marcescinotipia, serotipia y ribotipia).
4. La tipabilidad es muy alta en todos los métodos ensayados excepto en el caso de la marcescinotipia. Con esta técnica, así como con la bioagrupación, el poder discriminante es, así mismo, relativamente bajo (menor del 80%).
5. Los mejores resultados globales, en cuanto a tipabilidad y valor discriminante, se obtienen con la técnica de referencia (serotipia + fagotipia) y con la ribotipia, pero esta última supera a la anterior en reproducibilidad (100% versus 78%).

6. Aplicando la técnica de ribotipación, se han definido 41 patrones distintos de organización genómica con la endonucleasa de restricción seleccionada (SspI) en *S. marcescens*.
7. La aplicación de esta técnica ha permitido reconocer 11 brotes epidémicos en Hospitales madrileños con idénticos patrones de hibridación. El estudio de cepas procedentes de 5 brotes epidémicos europeos bien establecidos, ha permitido también la validación de este método para el análisis epidemiológico.
8. El análisis comparativo conjunto entre métodos de caracterización intraespecífica, demuestra que la ribotipia es la técnica con mayor grado de acuerdo con los distintos métodos en uso, lo que implicaría la posibilidad de convertirse en método de referencia considerando, además, su alto grado de eficacia (tipabilidad, reproducibilidad y discriminación).

## **VII. BIBLIOGRAFIA**

1. Gaughran, E.E.L. *From Superstition to Science: the History of a Bacterium*. Trans NY Acad Sci. 1965. 31. 3.
2. Von Graevenitz, A.; Rubin, S.J. *The Genus Serratia*. CRC Press. 1980. Boca Raton, Florida.
3. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Krieg, N.R. & Holt, J.G. Eds. 1984. Baltimore. London.
4. Grimont, P.A.D.; Jackson, T.A.; Ageron, E & Noonan, M. *Serratia entomophila sp. nov. Associated with Amber Disease in the New Zealand Grass Grub Costelytra zealandica*. Int. J. Syst. Bacteriol. 1988. 38. 1. 1.
5. Grimont, P.A.D. & Grimont, F. *The Genus Serratia*. Ann. Rev. Microbiol. 1978. 32. 221.
6. Ewing, W.H.; Davies, B.R. & Fife, M.A. *Biochemical Characterization of Serratia liquefaciens and Serratia rubidea*. 1972. Center for Disease Control, Atlanta.
7. Johnson, E & Ellner, P. *Distribution of Serratia Species in Clinical Specimens*. Appl. Microbiol. 1974. 28. 513
8. Croize, J & LeNoc, P. *Fréquence Actuelle des Différentes Espèces de Serratia Isolées au Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble*. Pathol. Biol. 1977. 25. 617.
9. Grimont, P.A.D & Grimont, F. *Biotyping of Serratia marcescens and Its Use in Epidemiological Studies*. J. Clin. Microbiol. 1978. 8. 1. 73-83.
10. Trias, J.; Viñas, V; Guinea, J. & Lorén, G.J. *Induction of Yellow Pigmentation in Serratia marcescens*. Appl. Environ. Microbiol. 1988. 54. 12. 3138.
11. Poole, K & Braun, V. *Influence of Growth Temperature and Lipopolysaccharide on Hemolytic Activity of Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 1988. 170. 11. 5146.

12. Scievel, E. & Braun, V. *Integration of the Serratia marcescens Haemolysin into Human Erythrocyte Membranes*. Mol. Microbiol. 1989. 3. 3. 445.
13. Prinsloo, H.E. *Bacteriocines and Phages Produced by Serratia marcescens*. J. Gen. Microbiol. 1966. 45. 205.
14. Gaston, M.A. & Pitt, T.L. *O-Antigen Specificities of the Serotype Strains of Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. 1989. 27. 12. 2697.
15. Yu, V.L. *Serratia marcescens*. New. Engl. J. Med. 300. 16. 887.
16. Stamm, W.H.E.; Kolff, C.A.; Dones, E.M.; Javariz, R.; Anderson, R.L.; Farmer, J.J. & deQuinones, H.R. *A Nursery Outbreak Caused by Serratia marcescens Scalp-Vein Needles as a Portal of Entry*. J. Ped. 1976. 89. 96.
17. Kwitko, A.O.; Hamra, L.K. & Atkinson, J.M. *Serratia: Opportunistic Pathogen of Increasing Clinical Importance*. Med. J. Aust. 1977. 2. 119
18. Khintchuk, A.G. *Bacillus Prodigiosus in Pyelitis*. Vestnt. Mikrobiol. Epidemiol. Parazitol. 1930. 9. 112.
19. Wise, G.J.; Jacobson, L.E.; Bottone, E; Scheneierson, S.S. & Brendler, H. *Fatal Septicemia Due to Nonpigmented Serratia marcescens*. N.Y. State J. Med. 1970. 70. 564.
20. Black, W.A. & Hodgson, R. *Search for Serratia*. J. Clin. Pathol. 1971. 24. 444.
21. Meltz, D.W. & Grieco, M.H. *Characteristics of Serratia marcescens Pneumonia*. Arch. Intern. Med. 1973. 132. 359.
22. Henjyoji, E.Y., Whitson, T.C., Ohashi, D.K. & Allen, B.D. *Bacteriemia Due to Serratia marcescens*. J. Trauma. 1971. 11. 417.
23. Myerowitz, R.L.; Medeiron, A.A. & O'Brien, T.F. *Recent Experience with Bacillemia Due to Gram-Negative Organisms* J. Infect. Dis. 1971. 124. 239.

24. Cetre, J.C.; Baratin, D.; Tissot, F.; Nicolle, M.C.; Reverdy, E.; Parvaz, P; Motin, J. & Sepetjan, M. *Septicémies Nosocomiales et Pseudo-Bactériémies á Serratia marcescens* La Presse Médicale, 1988. 17.24. 1255.
25. Bouza, E. García de la Torre, M.; Erice, A.; Cercenado, E.; Loza, E. & Rodríguez-Creixems, M. *Serratia Bacteriemia* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 1987. 7. 237.
26. Mangi, R.J.; Quintilian, R & Andriole, V.T. *Gram-Negative Bacillary Meningitis*. Am. J. Med. 1975. 59. 829.
27. Theccanat, G. Hirschfield, L. & Isenberg, H. *Serratia marcescens Meningitis*. J. Clin. Microbiol. 1991. 29. 4. 822.
28. Grieco, M.H.; McCray, R.S. & Nay, H.R. *Gentamicine Therapy for Liver Abscesses Due to P. aeruginosa and S. Marcescens*. N.Y. State J. Med. 1973. 73. 1108.
29. Mintz, L. & Mollett, G.H. *Serratia Vertebral Osteomyelitis in Narcotic Addicts*. Ann. Intern. Med. 1975. 83. 668.
30. Lowe, J.; Kaplan, L.; Liebergall, M. & Flowman, Y. *Serratia Osteomyelitis Causing Neurological Deterioration After Spine Fracture* J. Bone and Joint Surg. 1989. 71-B. 256.
31. Atlee, W.E.; Burns, R.P. & Oden, M. *Serratia marcescens Keratoconjunctivitis*. Am. J. Ophthalmol. 1970. 70. 31.
32. Fernandez-Guerrero, M.L. Azofre, J. Macarrón, P. & Barros, C. *Osteomyelitis of the Femur Complicating S. marcescens Bacteriaemia Arising from an Infected intravascular catheter*. J. Infect. 1988. 16. 1.
33. Conn, J.H.; Hardy, J.D.; Chavez, C.M. & Fain, W.R. *Infected Arterial Grafts: Experience in 22 Cases with emphasis on unusual bacteria and techniques*. Ann. Surg. 1970. 171. 704.

34. Gutmann, L. & Chabbert, Y. *Different Mechanisms of Resistance to Latamoxef (Moxalactam) in Serratia marcescens*. J. Antimicrob. Chemother. 1984. 13. 15.
35. Eng, R.H.K.; Cherubin, C.E.; Pechere, J.C. & Beam, T.R. *Treatment Failures of Cefotaxime in Meningitis Caused by Enterobacter and Serratia spp.* J. Antimicrob. Chemother. 1987. 20. 903.
36. Yang, Y.; Wu, P. & Livermore, D.M. *Biochemical Characterization of a  $\beta$ -Lactamase that Hydrolyzes Penems and Carbapenems from Two Serratia marcescens Isolates*. Antimicrob. Agents Chemother. 1990. 34.5. 755.
37. John, J.F.; McNeill, W.F.; Price, K.E. & Kresel, P.A. *Evidence for a Chromosomal Site Specifying Amikacine Resistance in Multiresistant Serratia marcescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 1982. 21. 4. 587.
38. Larson, T.A.; Garret, C.R. & Gerding, D.N. *Frequency of Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase among Serratia Species During Increased Use of Amikacine in the Hospital*. Antimicrob. Agents Chemother. 1986. 30. 1. 176.
39. Gomez-Lus, R.; Rivera, M.J.; Bobey, D.; Martin, C. & Navarro, M. *Chromosomal Origin of Acetyltransferase AAC(6') Specifying Amikacine Resistance in Serratia marcescens*. Microbiología (SEM). 1987. 3. 185.
40. Fujimaki, K.; Fujii, T.; Aoyama, H.; Sato, K.I.; Inoue, Y.; Inoue, M. & Mitsuhashi, S. *Quinolone Resistance in Clinical Isolates of Serratia marcescens*. Antimicrob. Agents Chemother. 1989. 33. 5. 785.
41. Watanabe, M.; Kotera, Y.; Yosue, K.; Inoue, M. & Mitsuhashi, S. *In Vitro Emergence of Quinolone-Resistant Mutants of Escherichia coli, Enterobacter cloacae and Serratia marcescens*. Antimicrob. Agents and Chemother. 1990. 34. 1. 173.
42. Yannelli, B.; Schoch, P. & Cunha, B.A. *Serratia marcescens*. Clinical Microbiology Newsletter. 1987. 9. 20. 157.

43. Hunter, P.R. & Gaston, M. *Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity*. J. Clin. Microbiol. 1988. 26. 11. 2465
44. Hunter, P.R. *Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods*. J. Clin. Microbiol. 1990. 25. 9. 1903.
45. Pitt, T.L. & Erdman, J. *Serological Typing of Serratia marcescens*. Methods in Microbiology. vol 15. Academic Press. 1984. London.
46. Traub, W.H. & Kleber, I. *Serotyping of Serratia marcescens: Evaluation of Le Minor's H-Immobilization test and description of three new flagellar H antigens*. J. Clin. Microbiol. 1977. 5. 115.
47. Rubin, S.J.; Brock, S. Chamberland, M. & Lyons, R.W. *Combined Serotyping and Biotyping of Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. 3. 582. 1976.
48. Gaston, M.A. & Pitt, T.L. *Improved O-Serotyping Method for Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. 27. 12. 2702.
49. Traub, W.H. *Phenotypic Variations of Bacteriocin Susceptibility, O-Antigen Determinants, and Serum Susceptibility among Isolates of a Multiple-Drug Resistant, Nosocomially Significant Strain of Serratia marcescens*. Hyg. Abt. 1978. 240. 57.
50. Gaston, M.A. Duff, P.S. & Pitt, T.L. *Lipopolysaccharide Heterogeneity in Strains of Serratia marcescens Agglutinated by O14 Antiserum*. Curr. Microbiol. 1988. 17. 27.
51. Pillich, J; Hradnecna, Z & Kocur, M. *An Attempt at Phage Typing in the Genus Serratia*. J. Appl. Bacteriol. 1964. 27. 65.
52. Farmer, J.J. *Bacteriophage Typing of Serratia. Provisional Method #1*. Center for Disease Control. 1976. Atlanta.

- 
53. Pitt, T.L.; Erdman, J. & Butcher, C. *The Epidemiological Type Identification of Serratia marcescens from Outbreaks of Infection in Hospitals* J. Hyg. 1980. 84. 269.
  54. Pitt. T.L. *State of the Art: Typing of Serratia marcescens*. J. Hosp. Infect. 1982. 3. 9.
  55. Traub, W.H.; Raymond, E.A. & Startzman, T.S. *Macteriocin (Marcescin) Typing of Clinical Isolates of Serratia marcescens*. Appl. Microbiol. 1971. 21. 5. 837.
  56. Farmer J.J. *Epidemiological Differentiation of Serratia marcescens: Typing by Bacteriocin Sensitivity*. Appl. Microbiol. 1972. 23. 226.
  57. Traub, W.H. *Continued Surveillance of Serratia marcescens infections by Bacteriocin typing: Investigation of Two Outbreaks of Cross-Infection in an Intensive Care Unit*. Appl. Microbiol. 1972. 23. 982.
  58. Farmer, J.J. *Epidemiological Differentiation of Serratia marcescens: Typing by Bacteriocin Production*. Appl. Microbiol. 1972. 23. 218.
  59. Anderhub, B. Pitt, T.L. Erdman, Y.J. & Willcox, W.R. *A Comparison of Typing Methods for Serratia marcescens*. J. Hyg. 1977. 79. 89.
  60. Butler, D.A.; Lobregat, C.M. & Gaban, T.L. *Reproducibility of the Analytab (API 20E) System* J. Clin. Microbiol. 1975. 2. 322.
  61. Roemisch, E. & Kocka, R.E. *Comparison of Methods for Differentiating Among Serratia marcescens isolated from Clinical Specimens*. Am. J. Clin. Pathol. 1976. 66. 96.
  62. Dijkshoorn, L; Michel, M.F. & Degener, J.E. *Cell Envelope Protein Profiles of Acinetobacter calcoaceticus Strains Isolated In Hospitals* J. Med. Microbiol. 1987. 23. 313.

- 
63. Dijkshoorn, L; Van Vianen, W; Degener, J.E. & Michel, M.F. *Typing of Acinetobacter calcoaceticus Strain Isolated from Hospital Patients by Cell Envelope Protein Profiles*. Epidemiol. Infect. 1987. 99. 659.
  64. Bollman, R.; Halle, E.; Skolowska-Köhler, W.; Grauel, E.L.; Buchholz, P.; Klare, I.; Tschäpe, H. & White, W. *Nosocomial Infections Due to Serratia marcescens. Clinical Findings, Antibiotic Susceptibility Patterns and Fine Typing* Infect. 1989. 17. 294.
  65. Fistrovici, E. & Collins-Thompson, D.L. *Use of Plasmid Profiles and Restriction Endonuclease Digest in Environmental Studies of Listeria spp. from raw milk*. Internat. J. Food Microbiol. 1990. 10. 43.
  66. Simor, A.E.; Shames, B; Drumm, B.; Sherman P.; Low, D.E. & Penner, J.L. *Typing of Campylobacter pylori by Bacterial DNA Restriction Endonuclease Analysis and Determination of Plasmid Profile*. J Clin. Microbiol. 1990. 28. 1. 83.
  67. Ott, M. Bender, L. Marre, R. & Hacker, J. *Pulsed Field Electrophoresis of Genomic Restriction Fragments for the Detection of Nosocomial Legionella pneumophila in Hospital Water Supplies*. J. Clin. Microbiol. 1991. 29. 4. 813.
  68. Patton, C.M. Wachsmuth, I.K. Evins, G.M. Kiehlbauch, J.A. Plikaytis, B.D. Troup, N. Tompkins, L. & Lior, H. *Evaluation of 10 Methods to Distinguish Epidemic-Associated Campylobacter Strains*. J. Clin. Microbiol. 1991. 29. 4. 680.
  69. Owen, R.J. *Chromosomal DNA Fingerprinting. A New Method of Species and Strain Identificacion Applicable to Microbial Pathogens*. J. Med. Microbiol. 1989. 30. 89.
  70. Krapperud, G.; Nesbakken, T; Aleksic, S. & Mollaret, H.H. *Comparison of Restriction Endonuclease Analysis and Phenotypic Typing Methods for Diferenciacion of Yersinia enterocolitica Isolates*. J. Clin. Microbiol. 1990. 28. 26. 1125.

- 
71. Bradbury, W.C.; Pearson, A.D.; Marko, M.A.; Congi, R.V. & Penner, J.L. *Investigation of a Campylobacter jejuni Outbreak by Serotyping and Chromosomal Restriction Endonuclease Analysis*. J. Clin. Microbiol. 1984. 19. 3. 342.
  72. McGeer, A.; Low, D.E.; Penner, J.; NG, J.; Goldman, C. and Simor, A.E. *Use of Molecular Typing to Study The Epidemiology of Serratia marcescens* J. Clin. Microbiol. 1990. 28. 1. 55.
  73. Ades, A.E.; Garrett, A.J.; Cowell, J.; Chin, K.S. & Peckham, C.S. *Computer Matching of Oligonucleotide Patterns on Electrophoretic gels: An Application to the Epidemiology of Cytomegalovirus*. Epidemiol. Infect. 1988. 100. 467.
  74. Langer, P.R.; Waldrop, A.A. & Ward, D.C. *Enzymatic Synthesis of Biotin-Labeled Polynucleotides: Novel Nucleic Acid Affinity Probes*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1981. 78. 11. 6633.
  75. Learly, J.J.; Brigati, D.J. & Ward, D.C. *Rapid and Sensitive Colorimetric Method for Visualizing Biotin-Labeled DNA Probes Hybridized to DNA or RNA immobilized on Nitrocellulose: Bio-Blots*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1983. 80. 4045.
  76. Gebeyehu, G.; Rao, P.Y.; SooChan, P.; Simms, D.A. & Klevan, L. *Novel Biotinilated Nucleotide. Analogs for Labeling and Colorimetric Detection of DNA*. Nuc. Ac. Res. 1987. 15. 11. 4513.
  77. Tompkins, L.S.; Troup, N.; Labigne-Roussel, A.; Cohen, M.L. *Cloned, Random Chromosomal Sequences as Probes to Identify Salmonella Species*. J. Infect. Dis. 1986. 154. 156.
  78. Pappenheimer, A.M.; Murphy, J.R. *Studies on the Molecular Epidemiology of Diphtheria*. Lancet. 1983. 2. 923.
  79. Grimont, F. & Grimont, P.A.D. *Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Restriction Patterns as Potential Taxonomic Tools*. Ann. Inst. Pasteur/Microbiol. 1986. 137 B. 165.

80. Stull, T.L. LiPuma, J.J. & Edlind, T.D. *A Broad-Spectrum Probe for Molecular Epidemiology of Bacteria: Ribosomal RNA*. J. Infect. Dis. 1988. 157. 2. 280.
81. Woese, C.R. *Bacterial Evolution*. Microbiol. Rev. 1987. 51. 221.
82. Owen, R.J.; Allistaire, B.; Dayal, P. & Dawson, C. *Detection of Genomic Variation in Providencia stuartii Clinical Isolates by Analysis of DNA Restriction Fragment Length Polymorphisms Containing rRNA Cistrons*. J. Clin. Microbiol. 1988. 26. 10. 2161.
83. Irino, K.; Grimont, F.; Casin, I.; Grimont, P.A.D. & The Bazilian Purpuric Feve Study Group. *rRNA Gene Restriction Patterns of Haemophilus influenzae Biogrup Aegyptius Strains Associated with Brazilian Purpuric Fever*. J. Clin. Microbiol. 1988. 26. 8. 1535.
84. Moureau, P.; Derclaye, I.; Gregoire, M.; Janssen, M. & Cornelis, G.R. *Campylobacter Species Identification Based on Polymorphism of DNA Encoding rRNA*. J. Clin. Microbiol. 1989. 27. 7. 1514.
85. Romaniuk, P.J. & Trust, T.J. *Rapid Identification of Campylobacter Species Using Oligonucleotide Probes to 16S ribosomal RNA*. Mol. Cell. Probes. 1989. 3. 133.
86. Altwegg, M.; Hickman-Brenner, F.W. & Farmer, J.J. *Ribosomal RNA Gene Restriction Patterns Provide Increased Sensitivity for Typing Salmonella typhi Strains*. J. Infect. Dis. 1989. 160. 1. 145.
87. Grimont, F.; Lefèvre, M.; Ageron, E. & Grimont, P.A.D. *rRNA Gene Restriction Patterns of Legionella Species: A Molecular Identification System*. Res. Microbiol. 1989. 140. 615.
88. Lawson, P.A. Shah, H.N. & Clark, D.R. *Heterogeneity within Fusobacterium Species Determined Using Ribosomal RNA Gene Probes*. Clinical and Molecular Aspects of Anaerobes. S.P. Borrielo Ed. 1990. Wrihston Biomedical Publishing Ltd. Petersfield.



- 
89. Koblavi, S.; Grimont, F. & Gimont, P.A.D. *Clonal Diversity of Vibrio cholerae 01 Evidenced by rRNA Gene Restriction Patterns*. Res. Microbiol. 1990. 141. 645.
90. Goering, R.V. & Duensing, T.D. *Rapid Field Electrophoresis in Combination With an rRNA Gene Probe in the Epidemiological Evaluation of Staphylococci*. J. Clin. Microbiol. 1990. 28. 3. 426.
91. Martinetti, F. Altwegg, M. *rRNA gene Restriction Patterns and Plasmid Analysis as a Tool for Typing Salmonella enteritidis*. Res. Microbiol. 1990. 141. 9. 1151.
92. Baquero, F. *Activity of Gentamicin on Nonpigmented Serratia Strains Isolated from Pediatric Infections*. Advances in Antimicrobial and Antineoplastic Chemotherapy. Vol. I/1. Proceedings of The VII<sup>th</sup> International Congress of Chemotherapy. 1971. 653–655. Prague.
93. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 1985. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard*. Publication M7–A. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova. Pa.
94. Veron, M. *Nutrition et Taxonomie des Enterobacteriaceae et Bactéries Voisines. I. Méthodes d'Etudes des Auxanogrammes*. Ann. Microbiol. (Paris). 1975. 126a. 267.
95. Le Minor, L. Chippaux, M. Pichinoty, F. Coynault, C. & Piéchaud, M. *Méthodes Simples Permettant des Rechercher la Tetrathionate–Réductase en Cultures Liquides ou sur Colonies Isolées*. Ann. Inst. Pasteur. 1970. 119. 733.
96. Williams, R.P. & Hearn, W.R. *Prodigiosine, P*. In D. Gottlieb, & P.D. Shaw Eds., Antibiotics. II. Biosynthesis. 1967. Springer–Verlag New York.
97. Farmer, J.J. Davis, B.R. Hickman–Brenner, F.W. McWhorter, A. Huntley–Carter, G.P. Asbury, M.A. Riddle, C. Wathen–Grady, H.G. Elias, C. Fanning, G.R. Steigerwalt, A.G. O'Hara, C. M. Morris, G.K. Smith, P.B. & Brenner, D.J.

- Biochemical Identification of New Species and Biogroups of Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Specimens.* J. Clin. Microbiol. 1985. 21. 1. 46.
98. The Copy Kit™. cDNA Synthesis System. Instruction Manual. Version 2.0. Invitrogen.
99. BluGENE™. Nonradioactive Nucleic Acid Detection System. BRL. Bethesda Research Laboratories. Life Technologies Inc.
100. Sambrook, J. Fritsch, E.F. Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup>. Edition. 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y.
101. Pitcher, D.G. Saunders, N.A. & Owen, R.J. *Rapid Extraction of Bacterial DNA with Guanidin Thiocyanate.* Lett. Appl. Microbiol. 1989. 8. 151.
102. Sokal, R.R. Michener, C.D. *A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships.* Kansas University Science Bulletin. 38. 1409.
103. Alonso, R. Nicholson, P.S. & Pitt, T.L. *Rapid Extraction of High Purity Chromosomal DNA from Serratia marcescens.* FEMS Microbiol. Lett. (en prensa).
104. Palomar, J. Guasch, J.F. Regué, M. & Viñas, M. *The Effect of Nuclease on Transformation Efficiency in Serratia marcescens.* FEMS Microbiol. Lett. 1990. 69. 255.
105. Boom, R. Sol, C.J.A. Salimans, M.M.M. Jansen, C.L. Wertheim-van Dillen, P.M.E. & Van der Noordaa, J. *Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids.* J. Clin. Microbiol. 1990. 28. 3. 495.
106. Marmur, J. *A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Microorganisms.* J. Mol. Biol. 1961. 3. 208.

- 
107. Timmis, K. Winkler, U. *Isolation of Covalently Closed Circular Deoxyribonucleic Acid from Bacteria which Produce Exocellular Nuclease*. J. Bacteriol. 1973. 113. 1. 508.
108. VacuGene™ XL Vacuum blotting System. Instruction Manual. VacuGene XL Protocol No. 1. Pharmacia. Pharmacia LKB Biotechnology.
109. Johnson, E. Ellner, P.D. Appl. Microbiol. 1974. 28. 513.
110. Tbaqchali, S. Chambers, T.J. & Brook, H.J.L. *Serratia marcescens* in Hospital Practice. Lancet. 1977. i. 306.
111. Grimont, P.A.D. Grimont, F & Dulong de Rosnay, H.L.C. *Taxonomi of the Genus Serratia*. J. Gen. Microbiol. 1977. 98. 35.
112. Bush, K. *Classification of  $\beta$ -Lactamases: Groups 1, 2a, 2b, and 2b'*. Antimicrob. Agents Chemother. 1989. 33. 264.
113. Swedish Study Group. *Cefuroxime versus Ampicillin and Chloramfenicol for the Treatment of Bacterial Mennigitis*. Lancet. 1982. 1. 295.
114. Nikaido, H. *Outer Membrane Barrier as a Mechanism of Antimicrobial Resistance*. Antimicrob. Agents Chemother. 1989. 33. 11. 1831.
115. Baquero, F. *Resistance to Quinolones in Gram-Negative Microorganisms: Mechanisms and Prevention*. Eur. Urol. 1990. 17 (suppl 1). 3
116. Dominguez, V. Conde, M. Rey, J. Carrasco, J.L. & Mugica, N. *Marcetinotipia y Biotipia como Marcadores Epidemiológicos en la Infección por Serratia*. Rev. Clin. Española. 1982. 165. 4. 255.
117. Dominguez, V. Ales, J.M. & Soriano, G. *Estudio sobre Serratia marcescens: Comportamiento Bioquímico, Marcetinotipos y Sensibilidad frente a los Antimicrobianos*. Rev. Clin. Española. 1977. 145. 4. 265.

118. Drlica, K & Riley, M. Eds. *The bacterial Chromosome*. 1990. American Society for Microbiology. N.W.
119. King, T.C. Sirdeskmukh, R. Schlessinger, D. *Nucleolytic Processing of Ribonucleic Acid Transcripts in Procaryotes*. Microbiol. Rev. 1986. 50. 4. 428.
120. Anderson, R.P. & Roth, J.R. *Gene Duplication in Bacteria: Alteration of Gene Dosage by Sister-Chromosome Exchanges*. 1978. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 43. 1083.
121. Hill, C.W. & Harnish, B.W. *Inversions Between Ribosomal RNA Genes of Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci. 1981. 78. 7069.
122. Hill, C.W. & Harnish, B.W. *Transposition of a Chromosomal Segment Bounded by Redundant rRNA Genes Into Other rRNA Genes in E. coli*. J. Bacteriol. 1982. 149. 449.
123. Hill, C.W. & Gray, J.A. 1988. *Effects of Chromosomal Inversion on cell fitness in Escherichia coli K-12 Genetics*. 119. 771. 1988. 119. 771.
124. Lin, R.J. Capaje, M & Hill, C.W. *A Repetitive DNA Sequence, rhs, Responsible for Duplications Within the Escherichia coli K-12 Chromosome*. J. Mol. Biol. 1984. 177. 1.