

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Higiene y Medicina Preventiva

Cátedra de Microbiología y Parasitología

Prof. G. Piédrola de Angulo

TIPIFICACION DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR LA SUCEPTIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICROBIANOS USUALES

MARIA DEL CARMEN MARTOS JIMENEZ

Granada 1.981



CATEDRA DE
MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA
—
PROF. G. PIEDROLA

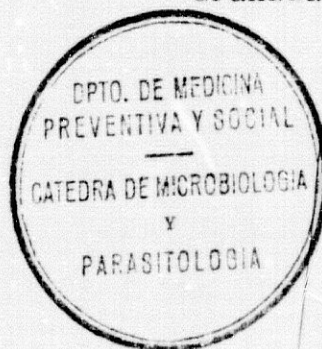
Avenida de Madrid, 9
Teléfono 958-280144
GRANADA

EL PROFESOR DR. D. GONZALO PIEDROLA ANGULO
CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesina que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Da Ma CARMEN MARTOS JIMENEZ, sobre el tema: "TIPIFICACION DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR LA SUCEPTIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICROBIANOS USUALES", ha sido realizada bajo mi dirección desde Diciembre de 1.980 en condiciones que le hacen acreedora del título de Licenciada siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, 15 Septiembre, 1.981.



[Firma manuscrita]



CATEDRA DE
MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA
DE LA
FACULTAD DE MEDICINA
—
PROF. G. PIEDROLA

Avenida de Madrid, 9
Teléfono 958-280144
GRANADA

EL PROFESOR DR. D. JOSE LIEBANA UREÑA
PROF. AYUDANTE DE MICROBIOLOGIA Y PA-
RASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICI-
NA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.

CERTIFICA:

Que la Tesina que presenta al superior juicio del Tribunal que designe la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada, Da Ma CARMEN MARTOS - JIMENEZ, sobre el tema: "TIPIFICACION DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR LA SUCEPTIBILIDAD IN VITRO A LOS ANTIMICROBIANOS USUALES", ha sido realizada bajo mi -- codirección desde Diciembre de 1.980 en condiciones que le hacen acreedora del título de Licenciada siempre que así lo considere el citado Tribunal.

Granada, 15 Septiembre de 1.980.



Dedicatoria: A mis padres

PROLOGO

He sido elegido para nuestra Tesina un microorganismo preponderante en las infecciones de nuestro medio ya que K. pneumoniae es una de las bacterias que más problemas plantean, debido a la gran incidencia de procesos en los que se encuentra implicada, a la vez que acarrea graves repercusiones económicas y sociales.

Debido a lo mencionado anteriormente, es necesario encontrar métodos para que sirviendo de ayuda a la Medicina Preventiva permitan controlar, seguir y erradicar estos procesos. Pese a sus imperfecciones, los marcadores epidemiológicos son los elementos más importantes para establecer la evidencia epidemiológica de los mismos. En K. pneumoniae y por diversos compañeros del Departamento, se han utilizado la biotipia, bacteriocinotipia y serotipia, nosotros como complemento a los mismos, hemos establecido otro marcador que sería la antibioticotipia, entendiendo como tal, la tipia bacteriana según la sensibilidad o resistencia a sustancias antimicrobianas. Al mismo tiempo hemos comparado este marcador con la biotipia como elemento de tipificación más fácil y asequible según estudios realizados por otros compañeros de Departamento.

Dividimos nuestro estudio en cinco capítulos con diversos apartados: En el primero realizamos una revisión sobre la importancia del género Klebsiella en las infecciones hospitalarias, centrándonos en la cadena epidemiológica de dichos microorganismos; en el segundo efectuamos una revisión de los

marcadores epidemiológicos del género en estudio, el tercero le dedicamos a la aportación personal, con el material y métodos, resultados y juicio crítico; el cuarto a las conclusiones y el quinto a la bibliografía general.

Quiero expresar mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. D. Gonzalo PIEDROLA DE ANGULO, mi maestro, por la colaboración y ayuda prestada en todo momento durante mi estancia en el Departamento.

A los Profesores Dr. D. Ramón GALVEZ VARGAS y Dra. D^a. M^a del Carmen MAROTO VELA, por los consejos de ellos recibidos.

Y de forma muy especial al Dr. José LIEBANA UREÑA, que introdu ciendome en el campo de la bacteriología, con su estímulo y ayuda infatigable inexpressable en unas palabras, ha hecho posible la realización de esta tesina.

A la Dra. Ana CASTILLO PEREZ, compañera y amiga, por su inestimable colaboración.

A los Doctores Antonio CUETO ESPINAR y Juan Antonio CARRION PAS - TOR por los consejos y ayuda prestada.

A Paula CARRION MENOR y Encarnación GUERRERO CANO, compañeras y - amigas por su ayuda material y su continuo apoyo.

Al resto de los compañeros del Departamento, personal Auxiliar y a M^a José MARTOS que mecanografió el original.

INDICE

| | |
|--|----------|
| CAPITULO PRIMERO. GENERO KLEBSIELLA : SU IMPORTANCIA EN LAS INFECCIONES HOSPITALARIAS | pág. 5 |
| 1-1 Notas bibliográficas al capítulo primero | pág. 13 |
| CAPITULO SEGUNDO. MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS DEL GENERO KLEBSIELLA | pág. 16 |
| 2-1 Biotipia | pág. 18 |
| 2-2 Fagotipia | pág. 39 |
| 2-3 Serotipia | pág. 47 |
| 2-4 Bacteriocinotipia | pág. 58 |
| 2-5 Antibioticotipia | pág. 79 |
| 2-6 Notas bibliográficas al capítulo segundo | pág. 88 |
| CAPITULO TERCERO . APORTACION PERSONAL | |
| 3-1 Parte primera. Material y Métodos | |
| 3.1.1 Identificación de cepas ensayadas y sistemática se- guida | pág. 95 |
| 3.1.2 Biotipia | pág. 133 |
| 3.1.3 Antibioticotipia | pág. 136 |
| 3-2 Parte segunda . Resultados | pág. 145 |
| 3-3 Parte tercera. Juicio crítico | pág. 190 |
| 3-4 Notas bibliográficas al capítulo tercero | pág. 194 |
| CAPITULO CUARTO. CONCLUSIONES | pág. 195 |

CAPITULO QUINTO. BIBLIOGRAFIA GENERAL pág. 198

CAPITULO PRIMERO

GENERO KLEBSIELLA: SU IMPORTANCIA EN LAS INFECCIONES HOSPITALARIAS

Las infecciones hospitalarias por microorganismos de género Klebsiella, están a la cabeza entre las producidas por Gram negativos.

Este gran aumento de estos microorganismos se debe, según la mayoría de los autores, a un incremento de resistencia a los antibióticos. Así DUNCAN (1), se refiere a las infecciones en el medio que nos ocupa, diciendo, que estas son más frecuentes en pacientes con tratamiento antibiótico; al mismo tiempo indica, que en los esputos de pacientes, que adquieren bacilos Gram negativos en el hospital, Klebsiella spp se encuentra en el 60% de los mismos.

PRICE y SLEIGH (2), establecen que entre los años 1.965-67, microorganismos del género Klebsiella aparecen en 1% de los esputos estudiados; en 1.968 su incidencia en los mismos productos es el 8%, mientras en 1.969, aparecen en 16% durante el mes de Enero, alcanzando un pico de 31% en el mes de Junio.

En 1.967 KESSNER y LEPPER (3), estiman que las infecciones hospitalarias por Klebsiella spp representan 19.4% de todas las infecciones producidas en el medio hospitalario.

CASSEWELL y PHILLIPS (4), en estudios realizados desde Noviembre de 1.969 y durante cuatro años, cifran la tasa de infecciones por K. pneumoniae en 24%.

LOVESIO y MOLTENI (5), refiriéndose a estudios realizados entre 1.973-75 sobre diversos productos patológicos procedentes de enfermos ingresados en una unidad de cuidados intensivos comprueban, los microorganismos del género Klebsiella representan 16'9% de las infecciones ocurridas en estos servicios, siendo las bacterias más frecuentemente aisladas.

COOKE, BRAYSON, EDMONDSON y HALL (6), comprueban, las infecciones hospitalarias por Klebsiella representan 16% de los coliformes productores de estos procesos.

Con respecto a la cadena epidemiológica de las infecciones hospitalarias por Klebsiella y refiriendonos a la especie estudiada por nosotros, K. pneumoniae, podemos consignar lo siguiente:

1.- Fuente de infección. Como en otros microorganismos son aportados al hospital por un sujeto enfermo o portador, así TUNNER y GRADDOCK (7), realizando un estudio en una unidad de cuidados intensivos indican que 176 pacientes admitidos, el 13% aportaban Klebsiella desde el medio extrahospitalario y un 14% la adquirían en el hospital.

El sujeto enfermo, contamina através de diversos productos patológicos tanto al personal, como a los objetos y al medio ambiente hospitalario. Al mismo tiempo el sujeto enfermo puede provocar autoinfección con gran facilidad debido -

a las circunstancias propias de su fisiología alterada. Por otra parte, existe una fuente de infección evidente que es la constituida por el personal hospitalario que considerándose sanos, vehiculan los microorganismos y comportándose como portadores, pueden intervenir en la producción de infecciones hospitalarias cruzadas.

Los estudios realizados por LEVY (8), refiriéndose a los portadores cutáneos, demuestran que las cifras de Klebsiella spp, están desplazando a las de E. coli, que eran consideradas como habituales a este nivel. CASEWELL y PHILLIPS (9) cifran en un 17% de las personas del staff como portadores cutáneos de Klebsiella. SHINEBAUM, COOKE, y BRAYSON (10), cifran en un 24% a las personas portadoras cutáneas de Klebsiella en una unidad de recién nacidos.

A medida que pasa el tiempo de hospitalización, se incrementa también la colonización por Klebsiella, fundamentalmente a nivel intestinal, tal como ha demostrado entre otros MONTGOMERIE y cols. (11).

2.- Mecanismo de transmisión.

2-1.- Contagio directo. En general se realiza a partir de lesiones abiertas con lo que las maniobras terapéuticas favorecen la colonización por flora endógena dando lugar a infecciones.

2-2.- Contagio indirecto. Es sin lugar a dudas el mecanismo más importante, donde juegan un papel fundamental los portadores. Así NORIEGA y cols (12), demuestran la importancia de las manos como mecanismo de transmisión indirecta. SALTZMAN (13), pone de manifiesto la presencia de Klebsiella spp de -- partículas vehiculadas en el aire y SHINEBAUM, COOKE y BRAYSON (14), comprueban en una unidad de recién nacidos mediante técnicas aeroscópicas en placas de Petri, como de 94 muestras analizadas, Klebsiella, aparece en seis de ellas. Sin embargo, CASEWELL y PHILLIPS (15), tras analizar 3.100 litros de aire del medio hospitalario en áreas de alto riesgo, no consiguieron aislar Klebsiella spp.

Los objetos existentes en un servicio son mecanismo de transmisión indirecta y así SHINEBAUM, COOKE, y BRAYSON (16), obtienen en una unidad de recién nacidos 28 positividades a Klebsiella en 85 muestras de fregaderos, 2 positividades en 21 floreros y 4 en 26 baños.

Los estudios realizados por CASEWELL y PHILLIPS (17) sobre alimentos como elementos de transmisión de infecciones hospitalarias en una unidad de cuidados intensivos mostraron que de 13 helados analizados 9 eran positivos a Klebsiella, 21 ensaladas de 47 analizadas, 3 de 9 dulces estudiados y otros 3 de 12 muestras de leche. SHOOTER (18) expresa que, de 643 muestras de alimentos estudiadas en 43 de ellas existían --

Klebsiella spp. Sin embargo, SELDEN y cols (19), no dan importancia a los alimentos como mecanismo de colonización intestinal de los pacientes, sino que esta colonización es para ellos una predisposición que existe por el uso indiscriminado de antibióticos.

3.- Sujeto sano susceptible. Numerosos factores influyen como elementos que disminuyen la resistencia a las infecciones: Abuso de antibióticos, inmunosupresores, enfermedades crónicas, malnutrición, etc.

Los estudios realizados por SHINEBAUM, COOKE y BRAYSON (20), demostraron que un 18 y 26% respectivamente -- estaban infectados por Klebsiella, mientras que otro grupo de recién nacidos de 2 y 6 días, nacidos en partos distócicos, estaban colonizados por Klebsiella en un 24 y 39% respectivamente, establecieron una relación de correspondencia entre partos distócicos y la mayor colonización de los niños por Klebsiella. En estos estudios se pone de manifiesto la influencia que la corta edad de los pacientes por un lado y por otra la del traumatismo que podría suponer un parto distócico juegan en la implantación de infecciones por Klebsiella.

Con el fin de efectuar una exposición ordenada de las infecciones por Klebsiella que pueden aparecer en estos sujetos sanos susceptibles las vamos a enumerar en cinco tipos:

1.- Infecciones respiratorias. Para MAZZEI y MASNATTA (21), la bronconeumonía por Klebsiella son más frecuentes en sujetos comprendidos entre los 40-60 años, representando a nivel hospitalario un 25%, mientras que en ambulatorios sólo representan un 1-4%. Para PRICE y SLEIGH (22), el 28% de pacientes de una unidad de cuidados intensivos desarrollan infecciones respiratorias por Klebsiella pneumoniae.

2.- Infecciones urinarias. La incidencia de infecciones hospitalarias por K. pneumoniae tal como indican THIEMKE y NATHAM (23), se ven favorecidas en pacientes sometidos a citoscopia y que han tenido una profilaxis con gentamicina. Los estudios realizados por NOBLE y cols (24), muestran la alta frecuencia de infecciones urinarias en pacientes hospitalizados, particularmente en individuos sometidos a trasplante.

3.- Septicemias. WATT y OKUBADEJO (25), ponen de manifiesto la frecuencia de septicemias por Klebsiella spp y como la mortalidad por las mismas representan el 60% de las defunciones producidas por bacilos Gram negativos. Para SELDEN y cols (26), estas septicemias son más frecuentes en los servicios de cirugía o en unidades de cuidados intensivos.

4.- Meningitis. Los casos de meningitis por Klebsiella, habitualmente tienen un desenlace fatal y suelen producirse en el curso de un estado séptico; PRICE y SLEIGH (27)

en 7 casos estudiados en un servicio de neurocirugía demostraron que en todos ellos se encontraban K. pneumoniae en la sangre.

5.- Otros procesos. K. pneumoniae puede aislarse de multitud de productos patológicos; así, puede obtenerse a partir de artritis (28), de abscesos hepáticos (29), etc.

Por último citar, el papel que podría representar la propia flora del individuo como contaminante de un sujeto sano susceptible, así los estudios realizados por CARRION PASTOR (30) en 129 casos de pacientes hospitalizados y aplicando como marcadores epidemiológicos la biotipia y bacterocinotipia mostraron que en el 41'3% de las infecciones hospitalarias por K. pneumoniae, reconocen la existencia de este microorganismo a nivel faringeo y/o fecal en el propio sujeto.

1-1. NOTAS BIBLIOGRAFICAS AL CAPITULO PRIMERO.

- 1.- DUNCAN, I.B.R (1.975), pág. 1.215.
- 2.- PRICE, D.J.E; SLEIGH, J.D (1.970), pág. 280.
- 3.- KESSNER, D.M; LEPPER, M.H (1.967), pág. 45-46.
- 4.- CASEWELL, M.W; PHILLIPS, I (1.978), pág. 295-296.
- 5.- LOVESIO, C; MOLteni, O (1.976), pág. 32-33.
- 6.- COOKE, E.M; BRAYSON, J.C; EDMONSON, A.S; HALL, D (1.979), pág. 476.
- 7.- TUNNER, A.G; GRADDOCK, J.G (1.973), pag. 82.
- 8.- LEVY, A; JOURDAN, R(1.975), pág. 53.
- 9.- CASEWELL, M.W; PHILLIPS, I (1.977), pág. 1.315.
- 10.- SHINEBAUM, R; COOKE, E.M; BRAYSON, J.C (1.979), pág. 202-203.
- 11.- MONTGOMERIE, J.Z; TAYLOR, D.E.M; DOAK, P.B; NORTH, J.D.K(1.970), pág. 787.
- 12.- NORIEGA y cols (1975), pág. 47.
- 13.- LEVY, A; JOURDAN, R (1975), pág. 53 en referencia a SALTZMAN.
- 14.- SHINEBAUM, R; COOKE, E.M; BRAYSON, J.C (1.979), pág. 203.
- 15.- CASEWELL, M.W; PHILLIPS, I (1.977), pág. 1.316.
- 16.- SHINEBAUM, R; COOKE, E.M; BRAYSON, J.C (1.979), pág. 203.
- 17.- CASEWELL, M.W; PHILLIPS, I (1.978 b), pág. 845-846.
- 18.- LANCET (1.971), pág. 417.
- 19.- SELDEN, R y cols (1.971), pág. 659.
- 20.- SHINEBAUM, R; COOKE, E.M; BRAYSON, J.C (1.979), pág. 202-203.
- 21.- MAZZEI ,E.E; MASNATTA, G (1.971), pág. 44.
- 22.- PRICE, D.J.E; SLEIGH, J.D (1.970), pág. 1.215.

- 23.- THIEMKE, W.A; NATHAM, D.M (1.978), pág. 769.
- 24.- NOBLE, C.J y cols (1.979), todo el trabajo.
- 25.- WATT, P.J; OKUBADEJO, O.A (1.967), pág. 210-211.
- 26.- SELDEN, R y cols. (1.971), pág. 659.
- 27.- PRICE, D.J.E; SLEIGH, J.D (1.970), pág. 1.215.
- 28.- PEDRO PONS, A (1.968), pág. 331.
- 29.- GOLDMAN, J.M; KOWALEC, J.K (1.978), pág. 2.660.
- 30.- CARRION, J.A (1.980), Tesis doctoral, pág. 286-288.

CAPITULO SEGUNDO

MARCADORES EPIDEMIOLOGICOS DEL GENERO KLEBSIELLA

A la vista de lo indicado en el capítulo precedente, las infecciones por Klebsiella pneumoniae tienen una enorme importancia a nivel hospitalario, de ahí, la necesidad de establecer de forma clara la cadena epidemiológica de estos procesos con el fin de instaurar las medidas preventivas oportunas. La única forma de esclarecer la citada cadena epidemiológica, pese a sus múltiples inconvenientes, es la utilización de marcadores. Como tales marcadores se entiende aquellos elementos que podemos -- utilizar para comprobar la identidad de varias cepas dentro de -- una misma especie.

Los marcadores utilizados hasta ahora para Klebsiella son: biotipia, fagotipia, serotipia y bacteriocinotipia y cuya revisión sobre el estado de los conocimientos actuales sobre los mismos haremos a continuación. Por último, citaremos el marcador objeto de nuestro trabajo que hemos denominado -- antibioticotipia y que creemos que pese a sus defectos por otra parte equiparables a los de otros marcadores, puede tener una utilidad práctica para un laboratorio de diagnóstico microbiológico de rutina.

2-1. BIOTIPIA

En términos amplios la biotipia se puede definir como la tipificación de un microorganismo según su actuación frente a diferentes sustratos.

Sin embargo, esta amplia definición incluye tanto la separación en género o especies hasta la tipificación en sentido estricto. Por ello es necesario delimitar los sustratos que se pueden emplear dentro de una especie, para que la biotipia sea útil en la resolución del problema epidemiológico.

Vamos a establecer los criterios bioquímicos que seguiremos a lo largo de nuestro trabajo y que nos permitirán diferenciar, las tres especies del género Klebsiella.

Este género ha sido estudiado por múltiples autores; así en 1.972, EDWARDS y EWING (31), desglosan el género en tres especies (cuadro 1); LE MINOR (32), en este mismo año clasifica las mismas tres especies con criterios bioquímicos muy similares (cuadro 2); en 1.973 RICHARD (33), efectúa otra clasificación en especies de similares características a las clasificaciones ya comentadas (cuadro 3); así llegamos a 1.974 en donde COWAN y STEEL (34) hacen un diagnóstico diferencial del género en siete especies (cuadro 4).

Nosotros siguiendo el criterio de LIEBANA (35), que aglutina los criterios expuestos anteriormente, consideramos tres especies: K. pneumoniae, K. ozaenae y K. rhinoscleroma-

tis. En K. pneumo.iae admite 4 grupos, A, B, C y D, establece las diferencias por 6 pruebas fundamentales, indol, rojo de metilo, - Voges Proskauer, citrato de Simmons, gelatinosa y malonato sódico (cuadro 5).

Si bien el establecimiento de las especies de Klebsiella constituyen, una forma de tipificación en un sentido amplio, no es suficiente, como comentábamos anteriormente para - aportar datos que resuelvan el problema epidemiológico. Por esta razón, es necesario el estudio dentro de la variabilidad genética de cada especie, de una serie de pruebas bioquímicas, o dicho de otra forma, de la capacidad de actuación sobre diferentes sustratos, de tal forma que se aproveche esta variabilidad genética para subdividir las especies en grupos, que sólo tendrán validez práctica si las cepas que se van a estudiar presentan una dispersión suficiente como para obtener conclusiones válidas.

Los diversos sustratos empleados para la tipia, son diferentes según el criterio de los diversos autores.

ØRSKOV, en 1.957 (36), emplea sustratos como: Dulcitol, adonitol, inositol, sorbosa, indol, gelatina, - urea, d-tartrato, citrato sódico, mucato, y ramnosa, clasificando al género en 23 biotipos, y en 32 añadiendo gelatina e indol, con el inconveniente de que para él los biotipos eran una clasificación previa a la separación en especies, de tal forma que el biotipo 3 por ejemplo, pertenece a K. rhinoscleromatis; los biotipos 4, 5 y

6, por ejemplo, a K. ozaenae (cuadro 6).

Aunque más reducidas, ya que establece 16 biotipos, el esquema propuesto por DURLAKOWA y cols. en 1.967 (37) sufre en cierto modo de los mismos defectos que el de ØRSKOV, ya que utilizan pruebas tales como el gas en glucosa, lactosa, indol, rojo de metilo, Voges-Proskauer, citrato sódico, dulcitol y sacarosa, que constituyen la base bioquímica para la diferenciación de especies (cuadro 7).

RICHARD, en 1.973 (38), propuso basándose en la utilización de sorbosa, dulcitol y d-tartrato, un esquema de tipia, con lo cual al tratarse de sustrato que no se utiliza en la diferenciación de especies, permite la biotipia dentro de cualquier especie previamente establecida, o dicho de otra forma, permite la biotipia de las diferentes especies de Klebsiella.

Distingue 8 biotipos designados a, b, c, d, Da, Db, Dc, Dd (la mayúscula D indica que la fermentación del dulcitol es positiva). Por otra parte, las fermentaciones del adonitol y ramnosa permiten subdividir estos biotipos, en particular para K. ozaenae (cuadro 8). En lo que él denomina K. pneumoniae - estarán incluidos todos los biotipos predominando a, b, c, Dd. En K. oxytoca la distribución de los biotipos fue, en su estudio sólo de 4, Dc, c, Dd, d. En K. ozaenae predominan a, b, c, d, y fundamentalmente a y c. En K. rhinoscleromatis están presentes sólo -

los biotipos b y d. Este hecho lo consideramos de importancia a la hora de establecer criterios epidemiológicos en lo que se refiere a K. pneumoniae pues debido a la gran dispersión de los biotipos tendría gran aplicación práctica.

PUMAROLA y cols. (39), han encontrado en K. oxytoca de 107 cepas estudiadas, un 57'9% del biotipo c, un 27'1% del Dc, un 11'2% del Dd, un 2'9% d y un 0'9% del b, aplicando estos resultados en estudios epidemiológicos en dos instituciones, estos estudios resultan altamente interesantes.

RENNIE y DUNCAN (40), emplean una nueva sistemática por biotipos, efectuando una clasificación numérica merced a 3 grupos de pruebas: Grupo A, con indol, Voges Proskauer y citrato; grupo B, con lactosa, sacarosa, malonato y gluconato; grupo C, con dulcitol, lisina-decarboxilasa, ornitina-decarboxilasa y ureasa (cuadro 9).

Los trabajos de biotipia de LIEBANA (41) están basados en los biotipos de RICHARD, pero incrementándose estos en 8 por la adición de la prueba del consumo del citrato, tal y como se indica en el cuadro 10.

LIEBANA conserva la terminología original de RICHARD pero añade los tipos e, f, g, h, De, Df, Dg, Dh, los resultados del estudio de 120 cepas realizados por él, mostraron que aparecían todos los biotipos y como consecuencia de haberse -

aumentado en 8 los primitivos biotipos establecidos por RICHARD, - la diferenciación era mucho mejor y desde el punto de vista epidemiológico mucho más eficaz. Si bien existe una correlación entre los biotipos de RICHARD y LIEBANA (cuadro 11) la adición al esquema del primero de la prueba del citrato hace disminuir el número de cepas pertenecientes al biotipo inerte b.

La incondicional aceptación de este esquema, tendría que cumplir la exigencia de la estabilidad de los tipos. La comprobación de esta estabilidad "in vitro" fue realizada por el propio LIEBANA y confirmada por CASTILLO (42) que estudió las cepas utilizadas por LIEBANA realizando la biotipia aproximadamente 2 años después, encontrando que, si bien había algunas modificaciones, estas suponían el 4'1% de las cepas estudiadas, - lo que demuestra la hipótesis mantenida por LIEBANA.

HAVERKORN y MICHEL (43), estudiaron la consistencia de los biotipos, por medio de la aplicación del esquema de ØRSKOV (pero sin utilizar el inositol y la ramnosa como sustratos) tiparon 20 especies de Klebsiella 20 veces, efectuaron esta tipia a partir de gelatina-nutritiva. La discrepancia de tipia se presentó en 5 de las 20 veces en la mitad de las cepas tipadas, lo que supone un 2'5% de discrepancias. Según los autores, esta distribución hace imposible estimar el efecto de la consistencia en los criterios epidemiológicos.

La utilidad del esquema propuesto por -
LIEBANA, en relación a la epidemiología hospitalaria de los micro
organismos del género Klebsiella es demostrada en 1.978 por ROMAN
(44), así como por LIEBANA y cols. (45) y por CARRION PASTOR (46).

CUADRO 1

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL GENERO KLEBSIELLA. EDWARDS Y EWING

| | <u>K. pneumoniae</u> | <u>K. ozaenae</u> | <u>K. rhinoscleromatis</u> |
|--------------------------|----------------------|-------------------|----------------------------|
| Indol | - | - | - |
| Rojo de motilo | V- | + | + |
| Voges Proskauer | V+ | - | - |
| Citrato de Simmons | + | V | - |
| Malonato | + | - | + |
| Mucato | + | V | - |
| L.D.C. | + | V | - |
| Gas de glucosa | + | V | - |
| Lactosa | + | V | V+ ^L |
| Ureasa | + | V- | - |
| C N K | + | V+ | + |

CUADRO 1 (continuación)

- Admiten K. oxytoca como biotipo de K. pneumonise productora de indol y gelatinolítica.

- : Prueba negativa † : Prueba positiva V: Prueba variable

V†: Prueba variable generalmente positiva V- : Prueba variable generalmente negativa

V†_L: Prueba variable generalmente positiva lenta.

CUADRO 2

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL GENERO KLEBSIELLA. LE MINOR

I II III

| | | | |
|--------------------------|----|----|---|
| Indol | - | - | - |
| Rojo de metilo | - | + | + |
| Voges Proskauer | + | - | - |
| Citrato de Simmons | + | V | - |
| L.D.C. | + | V | - |
| Malonato | V+ | - | + |
| Mucato | V+ | V- | - |
| C N K | + | + | - |
| Ureasa | + | V | - |
| Gas de glucosa | + | V | - |

- : Prueba negativa + : Prueba positiva V+ : Prueba variable generalmente positiva

V- : Prueba variable generalmente negativa.

I. K. pneumoniae

II. K. ozaenae

III. K. rhinoscleromatis

- Admite K. oxytoca como indoligenas
y gelatinolíticas lentas (50%).

CUADRO 3

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL GENERO KLEBSIELLA. RICHARD

| | <u>I</u> | <u>II</u> | <u>III</u> | <u>IV</u> | |
|--------------------------|---|-----------|-------------------|-----------|-------------------------|
| Indol | - | + | - | - | |
| Rojo de metilo | V- | V- | + | + | |
| Voges Proskauer | V+ | V+ | - | - | |
| Citrato de Simmons | + | + | V | - | |
| L.D.C. | + | + | V | - | |
| Lactosa (ONPG) | + | + | + | - | I. K. pneumoniae |
| Malonato | V+ | + | - | V+ | II. K. oxytoca |
| Ureasa | + | + | V | - | III. K. ozaenae |
| Gelatinasa | - | V | - | - | IV. K. rhinoscleromatis |
| C N K | + | + | V | V- | |
| + | : Prueba positiva | - | : Prueba negativa | V | : Prueba variable |
| V+ | : Prueba variable generalmente positiva | | | | |
| V- | : Prueba variable generalmente negativa | | | | |

CUADRO 4

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL GÉNERO KLEBSIELLA. COWAN Y STEEL

| | <u>I</u> | <u>II</u> | <u>III</u> | <u>IV</u> | <u>V</u> | <u>VI</u> | <u>VII</u> | |
|--------------------|----------|-----------|------------|-----------|----------|-----------|------------|---|
| Fimbrias | + | - | + | - | - | - | . | I. K. aerogenes |
| Glucosa (gas) | + | - | + | + | - | + | + | II. K. edwardsii |
| Lactosa | + | (+) | + | (+) | - | (+) | + | III. K. pneumoniae |
| Indol | - | - | - | - | - | - | + | IV. K. atlantae |
| Rojo de metilo ... | - | V | + | + | + | + | - | V. K. rhinoscleromatis |
| Voges Proskauer .. | + | + | - | V | - | - | + | VI. K. ozaenae |
| Citrato de Simmons | + | V | + | + | - | V | + | VII. K. oxytoca |
| Ureasa | + | + | + | + | - | V | + | |
| L.D.C. | + | + | + | + | - | V | + | |
| Mal'nato | + | V | + | - | + | - | + | |
| Dulcitol | V | - | + | - | - | - | + | |
| C N K | + | + | - | + | + | + | + | |
| Gelatinasa | V- | - | - | - | - | - | + | |
| + | | | | | | | | (+) : Prueba positiva lenta |
| - | | | | | | | | |
| V- | | | | | | | | |
| V | | | | | | | | |
| | | | | | | | | (+) : Prueba positiva generalmente negativas. |

CUADRO 5

DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DEL GENERO KLEBSIELLA. LIEBANA

| | <u>Indol</u> | <u>Rojo Metilo</u> | <u>Voges Proskauer</u> | <u>Citrato Simmons</u> | <u>Gelatinasa</u> | <u>Malonato</u> | <u>Ureasa</u> | <u>O.N.P.C.</u> |
|-----------------------------|--------------|--------------------|------------------------|------------------------|-------------------|-----------------|---------------|-----------------|
| <u>K. pneumoniae</u> | | | | | | | | |
| Grupo A | - | - | + | + | - | + | + | + |
| Grupo B | + | - | + | + | (¹) | + | + | + |
| Grupo C | - | + | - | + | - | + | + | + |
| Grupo D | V | V | V | V | V | V+ | + | + |
| <u>K. ozaenae</u> | - | + | - | V | - | - | V | + |
| <u>K. rhinoscleromatis.</u> | - | + | - | - | - | + | - | - |

(¹) Gelatina + : oxytoca Gelatina - : indoligena

+ Reacción positiva tras 1 ó 2 días de incubación

- Reacción negativa

V Reacción variable

V+ Reacción variable generalmente positiva

CUADRO 6

BIOTIPOS DE ØRSKOV

| <u>Biotipos</u> | <u>Ad.</u> | <u>Du.</u> | <u>In.</u> | <u>So.</u> | <u>Ind.</u> | <u>Gelat.</u> | <u>Ur.</u> | <u>d-tart.</u> | <u>Cit.</u> | <u>Muc.</u> |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|------------|----------------|-------------|-------------|
| 1 Ram † | † | † | † | - | - | - | † | - | † | † |
| 2 Ram - | † | † | † | - | - | -- | † | - | † | † |
| 3 | † | - | † | - | - | - | - | - | - | - |
| 4 | † | - | † | - | - | - | x | x | x | † |
| 5 | † | - | † | † | - | - | x | † | † | † |
| 6 | † | - | † | † | - | - | - | † | - | † |
| 7 a | † | - | † | - | - | - | † | † | † | † |
| 7 b | † | - | † | - | - | - | † | † | † | † |
| 8 | † | - | † | - | - | - | † | - | - | † |
| 9 | † | - | † | - | - | - | †(-) | - | † | † |
| 10 | † | - | † | - | - | - | † | † | - | † |
| 11 | † | - | † | † | - | - | † | - | † | † |
| 12 a | † | - | † | † | - | - | † | † | † | † |
| 12 b | † | - | † | † | - | - | † | † | † | † |
| 13 | † | - | † | † | - | - | † | - | - | † |
| 14 a | † | - | † | † | - | - | - | - | - | † |
| 14 b | † | - | † | † | - | - | - | - | - | - |
| 15 | † | † | † | - | - | - | † | † | - | † |
| 16 | † | † | † | - | - | - | † | - | - | † |
| 17 | † | † | † | - | - | - | † | - | † | † |
| 18 | † | † | † | † | - | - | † | † | - | † |
| 19 | † | † | † | † | - | - | † | † | † | † |
| 20 | † | † | † | † | - | - | † | - | - | † |

CUADRO 6 (continuación)

| <u>Biotipos</u> | <u>Ad.</u> | <u>Du.</u> | <u>In.</u> | <u>So.</u> | <u>Ind.</u> | <u>Gelat.</u> | <u>Ur.</u> | <u>d-tart.</u> | <u>Cit.</u> | <u>Muc.</u> |
|-----------------|------------|------------|------------|------------|-------------|---------------|------------|----------------|-------------|-------------|
| 21 a | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + |
| 21 b | + | + | + | + | - | - | + | - | + | + |
| 22 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | + |
| 23 | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 24 | - | + | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 25 | - | - | + | + | - | - | + | - | + | + |
| 26 | - | - | + | + | - | - | + | + | - | + |
| 27 | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 28 | + | - | + | + | + | - | + | - | + | + |
| 29 | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + |
| 30 | + | + | + | - | - | + | + | - | + | + |
| 31 | + | - | + | - | - | + | - | - | + | + |
| 32 | + | + | + | + | - | + | + | + | - | + |
| 33 a | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 33 b | + | - | + | + | (+) | + | + | - | + | + |
| 34 | + | - | + | + | + | + | + | + | +(x) | + |
| 35 | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| 36 a | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 36 b | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + |

Ad : Adonitol

Ur : Urea

+: Prueba positiva

Du : Dulcitol

d-tart : d-tartrato

- : Prueba negativa

In : Inositol

Cit : Consumo citra

x : Irregularmente positiva

So : Sorbosa

to sódico

Ind : Indol

Muc : Mucato

Gelat : Gelatina

Ram : Ramnosa

CUADRO 7

ESQUEMA DE BIOTIPOS DE KLEBSIELLA SEGUN DURLAKOWA Y cols.

| Biotipos | Gas glucosa | Lactosa | Indol | R.M | V.P | C.Simmons | Dulcitol | Sacarosa |
|----------|-------------|---------|-------|-----|-----|-----------|----------|----------|
| 1 | + | + | - | - | + | + | + | + |
| 2 | + | + | - | - | + | + | + | - |
| 3 | + | + | - | - | + | + | - | + |
| 4 | + | + | - | - | + | + | - | - |
| 5 | + | + | - | + | - | + | + | + |
| 6 | + | + | - | + | - | + | + | - |
| 7 | + | + | - | + | - | + | - | + |
| 8 | + | + | - | + | - | + | - | - |
| 9 | V | + | - | + | - | + | + | + |
| 10 | V | + | - | + | - | + | + | + |
| 11 | V | + | - | + | - | + | - | + |
| 12 | V | + | - | + | - | + | - | - |
| 13 | - | - | - | + | - | + | + | + |
| 14 | - | - | - | + | - | + | + | - |
| 15 | - | - | - | + | - | + | - | + |
| 16 | - | - | - | + | - | + | - | - |

V : Prueba variable

- : Prueba negativa

+

CUADRO 8

ESQUEMA DE BIOTIPOS DE KLEBSIELLA SEGUN RICHARD

| | <u>a</u> | <u>b</u> | <u>c</u> | <u>d</u> | <u>Da</u> | <u>Db</u> | <u>Dc</u> | <u>Dd</u> |
|------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dulcitol | - | - | - | - | + | + | + | + |
| Sorbosa | - | - | + | + | - | - | + | + |
| d-tartrato | + | - | + | - | + | - | + | - |

La fermentación de adonitol y ramnosa permite subdividir eventualmente estos biotipos en particular para K. ozaenae

CUADRO 9

BIOTIPOS DE RENNIE Y DUNCAN

GRUPO A

| <u>Código</u> | <u>Indol</u> | <u>V.P.</u> | <u>Citrato de Simmons</u> |
|---------------|--------------|-------------|---------------------------|
| 1 | - | + | + |
| 2 | - | - | + |
| 3 | - | + | - |
| 4 | - | - | - |
| 5 | + | + | + |
| 6 | + | - | + |
| 7 | + | + | - |
| 8 | + | - | - |

GRUPO B

| <u>Código</u> | <u>Lactosa</u> | <u>Sacarosa</u> | <u>Malonato</u> | <u>Gluconato</u> |
|---------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| 1 | + | + | + | + |
| 2 | + | + | - | + |
| 3 | + | + | + | - |
| 4 | + | - | - | + |
| 5 | - | - | - | + |
| 6 | - | - | + | - |

GRUPO C

| <u>Código</u> | <u>Dulcitol</u> | <u>L.D.C.</u> | <u>O.D.C.</u> | <u>Ureasa</u> |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 1 | + | + | - | + |
| 2 | - | + | - | + |

CUADRO 9 (continuación)

| <u>Código</u> | <u>Dulcitol</u> | <u>L.D.C.</u> | <u>O.D.C.</u> | <u>Ureasa</u> |
|---------------|-----------------|---------------|---------------|---------------|
| 3 | + | + | - | - |
| 4 | - | + | - | - |
| 5 | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - |

CUADRO 10

BIOTIPOS DE KLEBSIELLA SEGUN LIEBANA

| | a | b | c | d | e | f | g | h | Da | Db | Dc | Dd | De | Df | Dg | Dh |
|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Sorbosa | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + |
| d-tartrato | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| Citrato | + | + | + | + | - | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |

CUADRO 11

RELACION ENTRE LOS BIOTIPOS APLICADOS DE LIEBANA Y LOS DE RICHARD

NUUESTRO ESTUDIO

a
b
c
d
e
f
g
h
Da
Db
Dc
Dd
De
Df
Dg
Dh

RICHARD

a
b
c
d
e
b
c
d
Da
Db
Dc
Dd
Da
Db
Dc
Dd

2-2. FAGOTIPIA

En 1.924, CAUBLLOT obtiene, con propósitos terapéuticos, un fago que lisó el bacilo de Friedlaender a partir de las heces de pacientes con septicemias. HADLEY en 1.925 aisló fagos de Klebsiella, procedentes de aguas residuales, con los cuales distinguió las variantes S y R. De K. rhinoscleromatis PRA SEK y PRICA, en 1.928, obtuvieron unos fagos específicos capaces de aumentar las formas no capsuladas en cultivos homólogos, empleándolas como antígenos en los test de aglutinación. Otros fagos de K. rhinoscleromatis fueron aislados también por GERKES, en 1.940, tras 7 semanas en caldo y por IZRAITEL, en 1.964, después de 5-7 semanas de cultivo en agar (47).

La diferenciación de Klebsiella por fagos específicos fue intentada por RAKIETEN y cols., en 1.940, quienes señalaron la íntima correlación entre los antígenos capsulares y la sensibilidad a los fagos aislados de aguas residuales; en sus estudios distinguen tres tipos: A, B y C, siendo el B capaz de lisar al antiguo Aerobacter. PARK, en 1.956, describe con detalle un fago de origen desconocido y específico para Klebsiella. ADAMS y PARK, en 1.956, estudiaron la naturaleza del halo circundante a las placas producidas por acción fágica, mostrando que fue producido por un enzima que difundía más rápidamente que el fago. Por otra parte, HATSELDUCH, en 1.958, obtenía por adaptación un fago específico para el empleo en cepas de K. rhinoscleromatis (48).

EUSTATZIOU y cols. en 1.962 (49), investigan la asociación entre serotipos y propiedades lisogénicas en 68 cepas de Klebsiella; 12 cepas eran lisosensibles (alrededor del 17%), 2 eran lisosensibles y lisógenas y otras 6 (alrededor del 8%) - eran sólo lisógenas. Las cepas lisosensibles pertenecían a los tipos serológicos 1, 2, 9 y 13, dos no eran tipables y tres serían variantes S de los tipos 1, 5 y 7. Los fagos fueron liberados, 4 por cepas del serotipo 1 y 1 por las cepas de los serotipos 3, 5, 6 y 7. Las cepas sensibles del serotipo 1 son sensibles únicamente a los fagos de cepas del serotipo 1, los grupos heterólogos - formados por los tipos 2, 9 y 13 testados con los fagos de los tipos 1, 3, 5 y 7 son más sensibles a los del tipo 1 a excepción de la cepa del serotipo 13 que no lo es. Las cepas no tipables - son sobre todo sensibles a los fagos de los serotipos 3, 5 y 6, menos al 1 y nada al 7. Las variantes "s" acapsuladas son prácticamente sensibles a todos los fagos. Estos autores indican que los fagos de Klebsiella son específicos de grupo pero en lo concerniente a la especificidad de tipo esto es menos neto ya que - se limitan al serotipo 1 sólo sensibles a los del tipo 1, todo - lo contrario de lo que ocurre con las variantes no capsuladas. - La conclusión final de estos autores en su trabajo, con el ya - citado de ADAMS y PARK, sobre el papel de los enzimas en el sistema fago-bacteria en Klebsiella, ponen en duda la posibilidad - de la fagotipia en la clasificación y diagnóstico de este grupo

de microorganismos. GABRILOVITCH en 1.964 examina con fagos aislados de cultivo lisógenos de rinoscleroma, la asociación entre la sensibilidad a los fagos y la lisogenicidad de 7 cultivos de rinoscleroma y basandose en estas propiedades divide las cepas en cuatro grupos (50).

En 1.964 MILCH y DEAK, en Hungría, obtienen 12 fagos que clasifican serológicamente por reacción de neutralización cruzada en cinco grupos: A, B, C1, C2 y D. Los 12 fagos son denominados 4, 328(A), 2, 42(B), 6, 171(C1), 106, 165, 181(C2), 823, 937, 765(D). Las cepas de Klebsiella se dividieron en cinco grupos y trece tipos:

Grupo I, con cinco tipos: 1a, 1b, 1c 1d y 1d.

Grupo II, con dos tipos: 2a y 2b.

Grupo III, con dos tipos: 3a y 3b.

Grupo IV, con tres tipos: 4a, 4b y 4c.

Grupo V, con un tipo 5a.

De las 802 cepas estudiadas, procedentes de diversas instituciones, el 68'1% son tipables. En el hospital denominado A en las epidemias, predominan los tipos 1a y 1b - del grupo I, en el hospital B destacan los tipos 4b y 4c del grupo IV. De la estabilidad de los fagotipos comprueban que los cambios ocurridos en época de epidemias o en cepas conservadas en el laboratorio sólo encuentran alteraciones intragrupos pero nun

ca intergrupos; de ahí el posible valor epidemiológico del esquema. Por otra parte, demuestran que no existe relación clara entre serotipo y fagotipo (51).

En 1.966 PRZONDO-HESSEK, en Polonia, obtiene 35 fagos de los que 33 proceden de aguas residuales y 2 de secreciones nasales y heces, determinando las condiciones óptimas para la producción, reacción bacteria-fago y la sensibilidad de 480 cepas de Klebsiella pertenecientes a todos los tipos capsulares (52).

En un segundo trabajo PRZONDO-HESSEK y SLOPEK, estudian la morfología de las placas de lisis y la sensibilidad térmica de los 35 fagos así como el aspecto bajo microscopio electrónico del fago K-3. Basándose en la morfología de las placas dividen en tres grupos los fagos de Klebsiella, uno primero formado por aquellos cuyas zonas de lisis están comprendidas entre 1-2'5 mm., un segundo con zonas de lisis entre 0'5 y 0'9 mm. de diametro y un tercero entre 0'1 y 0'3. El estudio a la sensibilidad térmica, mostró que mientras unos resistían 20 minutos a 75° C, otros fueron inactivados 10 minutos a 60° C (53).

En 1.967, PRZONDO-HESSEK, SLOPEK y MIDONSKA estudian 34 fagos serológicamente por medio de reacciones de neutralización cruzada, obteniendo 11 grupos con diversos subgrupos dentro de los grupos I, II, IV, y V y observando que no

existe correlación entre la actividad lítica y las propiedades serológicas (54).

En ese mismo año PRZONDO-HESSEK y SLOPEK, tipan con 34 fagos 851 cepas de Klebsiella, de las que 575 (87'6%) fueron sensibles, obteniendo un total de 194 fagotipos; siendo los más frecuentes los denominados 28, 43, 79, 82, 93, 31, 149, 150 y 156. K. rhinoscleromatis entró dentro de 9 tipos y K. ozaenae mostró la menor sensibilidad a los fagos utilizados en este esquema (55).

PRZONDO-HESSEK y SLOPEK, comparan las colecciones de fagos húngara y polaca, comprobando que existen entre ellas diferencias líticas y serológicas. De las 851 cepas de Klebsiella 19'5% fueron tipables con la colección húngara y 67'6% con la polaca; la diferencia fundamental surge en K. rhinoscleromatis tipable sólo en un 8'3% con la primera y en 100% con la segunda. Desde un punto de vista serológico existe una íntima relación entre los grupos C1 y XI (56 y 57).

Con el fin de establecer un único esquema fágico SLOPEK, PRZONDO-HESSEK, MILCH y DEAK proponen uno con 15 fagos, 13 provienen de la colección polaca y 2 de la húngara. Son denominados con números romanos del I al XV. El esquema se divide en 15 grupos según la sensibilidad a los diversos fagos, así por ejemplo el grupo I está formado por cepas sensibles al fago I. El grupo I se divide en 4 subgrupos (A, B, C y D). Los

grupos II, III, V, VII, IX y XV tienen 2 subgrupos (A y B). Los grupos IV, VII, IX, X, XI, XII y XV tienen un subgrupo ya sea A ó B y el grupo VI 3 subgrupos (A, B y E). Los mejores resultados de tipificación se obtienen para K. rhinoscleromatis y los peores para K. ozaenae (58).

En un estudio posterior realizado en Rumanía por POPOVICI y cols. utilizando el esquema citado anteriormente encuentran que 250 cepas estudiadas sólo un 22'4% son tipables predominando el grupo I; los demás grupos no muestran relación con el origen de las cepas, si bien los microorganismos provenientes de infecciones son más lisotipables que los que proceden de personas sanas. Una de sus conclusiones más importantes es que los esquemas fágicos en Klebsiella deben ser preparados adicionando fagos de origen autóctono, lo que sería la única forma de aumentar el número de cepas tipables (59).

En Rusia, GABRILOVICH utiliza 3 fagos C, Sd y 483 para la tipificación de 116 cepas de K. rhinoscleromatis con fines epidemiológicos en vistas a detectar las fuentes de infección (60). MILCH y DEAK demuestran, en un estudio realizado en 1.968, que de 422 cepas, 254 (60%) fueron lisogénicas y 79% lisosensibles y lisogénicas, no encontrando relación entre el antígeno K y el fagotipo, así el fago liberado por la cepa K-23 denominado Br 29 lisa a cepas pertene -

cientes a 27 serotipos distintos (61).

En un trabajo de PRZONDO- HESSEK, SLOPEK y MIODONSKA para tipar 156 cepas de K. rhinoscleromatis recurren a 12 fagos de la colección polaca, la mayoría distintos del juego de 15 antes empleado, con lo que obtienen 12 fagotipos. Los distintos fagotipos predominan según el país de procedencia, así el fagotipo 5 se encuentra fundamentalmente en la región de Lublin (Polonia) y el 6 en la región de Minsk(U.R.S.S.) (62).

Los estudios de GABRILOVICH y cols. (63) sobre fagos de 3 serotipos distintos, muestran 4 tipos morfológicos por microscopia electrónica y que la actividad fágica está ligada a la estructura de la partícula lítica, siendo la especificidad mayor a la medida que aumenta la diferenciación estructural. Otros trabajos similares sobre la ultraestructura de fagos de Klebsiella han sido realizados en 1.972 por KRZYWY (64 y 65).

No parece pues que exista unanimidad en cuanto a la adopción de un esquema internacional para la tipificación fágica de Klebsiella. Parece lógico que a los esquemas más o menos adoptados internacionalmente se añadan otros autóctonos porque el que sirve para un país no es válido de forma clara para otro, de ahí la poca importancia de estos métodos de clasificación desde un punto de vista de aplicación universal.

2-3. SEROTIPIA

Uno de los sistemas clasicamente empleado como marcador epidemiológico del género Klebsiella es la serotipia, para comprenderla es imprescindible conocer, aunque sólo sea someramente, la estructura antigénica de estos microorganismos.

Según EDWARDS y EWING (66), el género Klebsiella posee cuatro antígenos; M, de envoltura mucosa; K, de la capsula; O, somático de formas lisas y R, somático de formas rugosas. Los estudios de KAUFFMANN (1.949-1.966), citados por autores anteriores, permiten distinguir dos tipos de colonias de acuerdo con la constitución antigénica:

A.- Formas lisas

- 1.-MKO, mucosas capsuladas con antígeno O.
- 2.-KO, no mucosas, capsuladas con antígeno O.
- 3.-Mo, mucosas, no capsuladas con antígeno O.
- 4.-O, no mucosas, no capsuladas con antígeno O.

B.- Formas rugosas

- 1.-MKR, mucosas, capsuladas, si antígeno O.
- 2.-KR, no mucosas, capsuladas, sin antígeno O.
- 3.-MR, mucosas, no capsuladas, sin antígeno O.
- 4.-R, no mucosas, no capsuladas, sin antígeno O.

Como es prácticamente imposible diferenciar los antígenos M y K, al ser muy semejantes químicamente el

material mucoso y capsular, la tendencia actual es la de considerarlos idénticos (67).

El antígeno O es de naturaleza glúcido-lípido proteica, termostable 2 horas y 30 minutos a 100° C, resistiendo el ácido fénico y el alcohol. La aglutinación O es lenta de producir, granular, difícil de disociar y polar. Poco se conoce de la estructura íntima de estos antígenos somáticos, debido a la dificultad para ponerlos de manifiesto, ya que están recubiertos por los antígenos capsulares, igualmente termostables a 100° C, siendo necesario obtener formas escapsuladas por pases en caldo biliado al 50% con el consiguiente riesgo de que el microorganismo se degrade no quedando más que el antígeno R. De todas formas parece ser que existen 5 antígenos O, estando el 2 subdividido en numerosas fracciones (2a, 2b, 2c, etc) por otra parte difíciles de distinguir unas de otras (68) y con relaciones antigénicas con ciertos antígenos O de E.coli (69).

PICKETT y CABELLT, describieron un antígeno específico de grupo (Sm) íntimamente ligado al antígeno O y situado debajo de la cápsula (70). Sin embargo, EDWARDS y EWING no admiten esta distribución tan clara poniendo en duda su existencia; de todas formas, el estudio del antígeno O con fines prácticos, por las dificultades que hemos ido viendo, no suele hacerse (71).

El antígeno K es un polisacárido que comportándose

como un hapteno, precipita el suero antimicrobiano homólogo y --
siendo específico de tipo (72). En 1926, JUNIANELLE describe los
tipos serológicos A, B y C y con las cepas que no puede incluir-
en ninguno de estos tres tipos forma el grupo X, señalando ade-
más la estrecha relación antigénica, debida a la existencia de -
un antígeno parcial común, entre el polisacárido capsular del -
neumococo tipo II y el de Klebsiella del tipo B (73). KAUFFMANN,
en 1949, demuestra la existencia de 14 tipos serológicos diferen-
tes y BROOKE, en 1951, amplía este número en 27 más designándolos
con números arábigos del 1 al 41. Los trabajos de WOLFEL-FERGUSON
(1951), EDWARDS y FIFE (1952-1955), KAUFFMANN (1954-1966) y ØRS-
KOV (1955) han permitido distinguir 72 tipos capsulares (74). La
posibilidad de un número mayor, es de hecho bastante factible y
en este orden de cosas SLOPEK amplía los tipos a 80 (75), lo -
cual no está admitido internacionalmente.

La determinación de los tipos capsulares
puede hacerse en porta, tubo, por precipitación y por la reacción
capsular específica (Reacción de NEUFELD) (76). En la práctica -
puede realizarse la aglutinación sobre porta y en un segundo --
tiempo la reacción de NEUFELD con los antisueros que den positi-
vos. Este autor describió el fenómeno de QUELLUNG en 1902 y des-
de entonces se ha vuelto de aplicación general. La reacción de -
NEUFELD es, en realidad, una precipitación de los polisacáridos
capsulares por el antisuero, lo que determina una opacificación

de la càpsula simulando un engrosamiento que puede ponerse de ma
nifiesto por diversos procedimientos (tinta china, azul de metile
no, microscopio de contraste de fases, etc). Lo que se observa en
realidad no es aumento de la càpsula, sino que alrededor de las
bacterias aparece un halo refringente en relación con un testigo
donde no se pone antisuero (77).

Los 72 antisueros, admitidos universal -
mente, estan incluidos en 18 "pools" que proponen EDWARDS y EWING
a partir de los cuales se individualizan los distintos serotipos.
Estos antisueros pueden obtenerse comercializados o bien prepa -
rarse por los distintos laboratorios. Para esto último, puede -
seguirse la tècnica preconizada por EDWARDS y EWING para lo cual
es necesario disponer de las 72 cepas tipo de Klebsiella y que -
pueden obtenerse, por ejemplo, del Statens Serum Institut de Co -
penhague. El procedimiento no es fàcil y por supuesto no ase qui -
ble casi a ningùn laboratorio de diagnòstico rutinario. A conti -
nuaciòn y de modo resumido explicamos las pautas a seguir (78).

En un primer tiempo, se seleccionan las
colonias de Klebsiella provistas de càpsulas de dimensiones me -
dianas (cuya anchura estè comprendida, aproximadamente, entre el
largo y la mitad del largo del cuerpo bacteriano), ya que las ce -
pas fuertemente capsuladas son poco inmunògenas.

En un segundo tiempo, se siembra una de

estas colonias en 50 ml. de caldo glucosado al 2%. Tras 4-8 horas de incubación a 37° C y después de un examen de cultivo con tinta china para controlar que las cápsulas producidas son cualitativas y cuantitativamente satisfactorias, se matan las bacterias adicionando 0'5% de formol.

La inoculación se realiza en inyecciones (via intravenosa) al conejo de 0'5 - 1 - 2 - 3 - 3 y 3 ml. de cultivo tratado con formol, a intervalos de cuatro días. Cuatro días después de la última inyección, se efectua una toma de sangre y se determina el título del suero buscando la dilución de este suero que da una reacción de NEUFELD positiva con la cepa en estudio. Si los títulos obtenidos son inferiores a 1/16, los conejos se angran cinco o seis días después de la última inyección, si no suben, se practican dos nuevas inyecciones de 3 ml. y se procede a un nuevo control. Los títulos entre 1/16 y 1/64 son suficien - tes para practicar la reacción de NEUFELD. Los conejos cuyo tí - tulo siga siendo inferior a 1/16, tras bas dos últimas inyeccio - nes, se eliminan debiendo ser de nuevo immunizados.

En razón de la comunidad antigénica existente entre gran número de tipos capsulares, es necesario para - los sueros anticapsulares sean específicos, em absorberlos por uno a tres, excepcionalmente cuatro, antígenos heterólogos (79)

La reacción de NEUFELD es más fácil de

realizar cuando las cápsulas son voluminosas para lo cual se pueden cultivar las cepas en estudio en un medio hipersacarosado como es el de WOLFEL-FERGUSON. Tras 24 horas de incubación a 37° C, se aprecia si el tamaño de la cápsula es o no el adecuado mediante examen por tinta china. Si la Klebsiella en estudio está suficientemente capsulada se procede a su tipaje. Se prepara una suspensión apenas opalescente en solución salina isotónica formulada al 5%, se deposita una gota de esta suspensión sobre los diversos portas donde añadimos las mezclas polivalentes, se recubre con un cubre y se examinan con inmersión por microscopio de contraste de fases. Posteriormente, se procede, de igual forma, con los sueros monovalentes específicos que corresponden a las mezclas de sueros que dieron una reacción de NEUFELD positiva.

Esta técnica preconizada por RICHARD, (80) puede modificarse en pequeños aspectos haciéndola más sencilla - tal como hacen SANCHEZ-BUENAVENTURA y GARCIA SABATER (81) realizando primero una aglutinación en porta y solo en los casos positivos recurrir a realizar la reacción de NEUFELD o empleando azul de metileno y suero de conejo tal como indica la casa que comercializa los antisueros y siendo el resto de la técnica prácticamente igual a lo indicado por RICHARD (82).

Algunas cepas poseen poco antígeno capsular K y bastante antígeno mucoso M. Estas cepas son difíciles de colocar en suspensión y además cuando se les examina por tinta -

china presentan un aspecto muy particular: el cuerpo bacteriano rodeado de un débil halo capsular parece flotar en una envoltura mucosa no delimitada por la tinta (83).

De los estudios realizados por RICHARD (84), SANCHEZ-BUENAVENTURA y GARCIA SABATER (85), se deduce que del 9 al 13% de las cepas de Klebsiella pneumoniae no son tipables y que el resto se reparten en una gran variedad de serotipos. La mayor frecuencia de cepas acapsuladas se encuentran en K.oxytoca, del 20 al 24%, distribuyéndose las demás cepas en un número más restringido de serotipos pero sin ninguna especialidad. En K. ozaenae, los estudios de RICHARD (86) señalan como tipo capsular más frecuente al 4 (59%) y después 3, 5, 6, 1 y 37, siendo las cepas no tipables bastante raras. En K. rhinoscleromatis el tipo 3 es prácticamente el único detectado por este autor.

La distribución de los tipos capsulares por productos patológicos es muy variable y prácticamente sin ningún interés, aunque numerosos trabajos se han publicado al respecto. Así PONS (87) llama la atención sobre los tipos 1 y 2 de K. pneumoniae que son muy virulentos para el ratón y producen en el hombre infecciones del sistema respiratorio y sobre los tipos 8, 9 y 10 que no son virulentos para el ratón y se aíslan preferentemente de infecciones del aparato urinario. EICHKOFF y cols (88) determinaron el tipo de 306 cepas de Klebsiella pneumoniae aisladas en pacientes de Boston, Massachusetts clasificando el 84%

de ellas en 38 tipos. De ellos, el 1, 3, 4, y 5 se obtuvieron más frecuentemente de las vías respiratorias, mientras que el 2 se encontraba en gran proporción en la orina; siendo el tipo 24 hallado en más del 25% de todas las cepas clasificadas. SANCHEZ-BUENAVENTURA y GARCIA SABATER en su estudio serológico realizado en Valencia (89), observaron también que el tipo 2 es el que más predomina en orina, así como en esputo y K. oxytoca tipos 59, 7 y 8 son los más frecuentes en las infecciones urinarias y el tipo 10 en los productos de expectoración. En las dos especies, K. oxytoca y K. pneumoniae, los tipos obtenidos de heces sufren una gran variación. Por otra parte, BROOKE (90) ha destacado, sin confirmación posterior por otros autores, la alta incidencia del serotipo 7 en cepas de K. pneumoniae aisladas de secreciones uterinas.

Los estudios realizados por CASTILLO PEREZ (91) muestran que un 21'6% de las cepas probadas no fueron tipables; encontrándose el mayor número en K. pneumoniae B con un 34'7% de la distribución de serotipos por productos patológicos - llama la atención la mayor incidencia de los tipos 2 en orina, 5 en esputos y la no detección de los tipos 8, 9 y 10 en orina. La autora confirma que la serotipia no es un buen marcador porque a sus dificultades técnicas hay que unir que el porcentaje de tipificaciones positivas se ve claramente superado por la biotipia y bacteriocinotipia.

Las cepas no tipables, en general, son - debido a la falta de cápsula o a que ésta sea insuficiente para pro

vocar la reacción de NEUFELD. La proporción en el género varia del 13 al 22% (92) debido a la alta incidencia de cepas acapsuladas, como ya vimos, pertenecientes a K. oxytoca.

Existen reacciones cruzadas entre los antígenos K de Klebsiella y otros procedentes de distintas bacterias, por ejemplo, con el A de E. coli, con el D. pneumoniae tipo II -- (Klebsiella K-2), los cuales son muy similares químicamente y con sueros inmunes de uno u otro organismos se obtienen reacciones de precipitación cruzada y protección recíproca en ratones (93). Relaciones similares se presentan con el antígeno M de S. paratyphi B (94).

¿Cual es la composición química del polisacárido capsular de Klebsiella? Hoy día no es conocida con seguridad la estructura de los 72 polisacáridos, si bien se ha progresado bastante en su estudio. HEIDELBERGE (95) ha realizado una extensa revisión sobre el tema y a él vamos a seguir fundamentalmente. Los polisacáridos capsulares se aíslan por un proceso complejo que lleva consigo la extracción con fenol-agua y una purificación por precipitación bajo la acción de $C_6H_5(CH_3)_3N Br$.

La mayoría de los tipos contienen ácido glucurónico, si bien el ácido galacturónico está presente en los tipos 3, 7, 8, 9, 11, 20, 21, 29, 34, 40, 49, 57 y 63, el ácido 3-deoxy-L-gliceropentulosónico en el tipo 38, mientras que un -

ácido no identificado aparece en los tipos 22, 37 y 56. Varios tipos poseen ácido pirúvico como 1, 5, 6, 68 y 32. Los azúcares más corrientemente encontrados son galactosa, glucosa, manosa, ramnosa y fucosa; así la glucosa y fucosa aparecen en los tipos 1,3 y 54; galactosa y ramnosa en los tipos 9, 47 y 52; glucosa y manosa en los tipos 5 y 24; glucosa ramnosa y manosa en el tipo 64; glucosa, manosa y galactosa en los tipos 7 y 21; galactosa y glucosa en los tipos 8 y 11; manosa y galactosa en el tipo 20, etc...

Otro antígeno presente en Klebsiella es el R de naturaleza protéinica y cuya importancia en el diagnóstico serológico es nulo (96).

En cuanto a las variaciones antigénicas, ya decíamos al hablar de la constitución antigénica, que había dos formas, S y R, a las que habría que añadir las fases M. Es posible obtener variaciones M-S-R por la adición al medio de cultivo de verde brillante (al 1/5.000.000), cloruro de litio (1%), por inmunosuero (10%) o bien por cultivo a 40° C (97). Ya vemos la existencia de formas intermedias y que las cepas R desprovistas de antígeno O eran avirulentas, aunque podían, en algunos casos, volver a recobrar su virulencia por pases en animal y recuperar la cápsula.

2-4. BACTERIOCINOTIPIA

El primer trabajo que marca el inicio de los estudios sobre las bacteriocinas del género Klebsiella se debe a HAMON y PERON (98).

Aunque los intentos encaminados a la tipificación del género han sido escasos, nosotros a continuación disponemos los diversos esquemas de bacteriocinotipia propuestos con la finalidad de conseguir un esclarecimiento en la epidemiología de estos microorganismos.

MARESZ-BABCZYSZYN y cols. (99), tiparon 851 cepas de Klebsiella mediante el grupo de colicinas de FRE - DEPICQ, las cepas tipadas pertenecían a diversos biotipos y serotipos; los resultados obtenidos fueron malos, pues sólo el 6'1% (52 cepas) fueron tipables y según las sensibilidades fueron clasificadas en 36 colicinotipos.

Con posterioridad estos mismos autores (100), probaron la sensibilidad de estas mismas 851 cepas frente al grupo de colicinas de ABBOT y SHANDONN; el 38'9% (331 cepas) fueron sensibles y clasificadas en 32 colicinotipos. Aunque estos resultados es evidente que se deben de considerar interesantes, su aplicación práctica era muy restringida debido a que el 83'7% de las cepas tipables pertenecían a un mismo colicinotipo, lo cual evidencia una dispersión baja de colicinotipos con una garantía de aplicación epidemiológica relativa. K. ozaenae tenía un porcentaje grande de falta de sensibilidad, y las pocas clasificables pertenecían casi todas al colicinotipo más frecuente, don

de también se incluían todas las cepas de K. rhinoscleromatis. - La sensibilidad del resto de las cepas varía desde el 52'9% de K. aerogenes al 38'9% de K. rhinoscleromatis.

Ante la falta de interés de tipificación heteróloga, MARESZ-BABCZYSZYN y cols. (101), utilizaron 7 cepas productoras pertenecientes a diversas especies de Klebsiella. Las cepas numeradas como 902 (K. aerogenes); 114 (K. pneumoniae var. atlanticae); 1205 (K. aerogenes) y 823 (K. aerogenes); 525 (K. pneumoniae); 212 (K. aerogenes) y 2813 (K. aerogenes). Como microorganismos a tipar emplearon las mismas 851 cepas de Klebsiella spp 455 fueron clasificadas, es decir, un 53'5%. La sensibilidad según las diversas especies es muy variable y según ésta se obtuvieron 32 bacteriocinotipos, de los cuales 6 se presentaron en una proporción superior al 2'6, llegando uno (el 20) al 25'5%. La sensibilidad de K. rhinoscleromatis es baja, 12'9%, la K. aerogenes y K. aerogenes var. edwardsii por el contrario es bastante alta, 64'2% y 75'7%, respectivamente. El 42'7% de K. ozaenae fueron tipables, debido a que esta especie es difícilmente tipable por fagos y por serología, la tipificación con bacteriocinas tendría un gran interés práctico.

Con la finalidad de ampliar más el número de cepas clasificadas, SLOPEK y MARESZ-BABCZYSZYN (102), presentan un esquema más amplio, empleando como cepas productoras - prácticamente todas las especies de Klebsiella hasta un total de

13 (cuadro 12), en la práctica el esquema fue reducido a 8 especies: 114, 902, L-4, F-5052, D-33, D-40, 823 y 525. En total tiparon 504 cepas pertenecientes 100 a K. aerogenes, 30 a K. aerogenes var. edwardsii, 34 a K. pneumoniae; 113 a K. pneumoniae var. atlantae; 155 a K. ozaenae y 72 a K. rhinoscleromatis.

De acuerdo con las sensibilidades obtenidas, distinguieron 65 bacteriocinotipos (cuadro 13); así el número 1, por ejemplo, estaría constituido por una cepa sensible a la 8, el número 65 cuando sólo es sensible a la cepa 525, etc.

Fueron tipables 295 cepas, lo que supone el 58'5%, el empleo de las 13 bacteriocinas aumentó solo en 3 el número de las clasificadas.

Los bacteriocinotipos más representativos fueron, 1, 15, 34, 41, 43, 44, 46, 49, 56, y 65. Aunque los autores sólo estudiaron especies pertenecientes a los serotipos K-1 K-3, K-4, K-13 y K-37 con gran diversidad bioquímica, pensaron que su esquema podría tener aplicación práctica.

LIEGANA y cols (103), aplicaron este esquema a diversas cepas aisladas en nuestro medio. Estudiaron 120 cepas como indicadores y observaron como 112 fueron tipables, lo cual venía a representar un 93'3%, apareciendo uno de los tipos en el 70% de los casos a pesar de haber utilizado la cepa K-23 que permitió dividir los microorganismos de este tipo en K-23 positivo y K-23 negativo. La aplicación práctica en una serie de -

casos, que fueron estudiados, de una forma seriada, revelò el es caso interès pràctico, pues todas las cepas, aun sin ninguna relación epidemiològica pertenecieron al mismo bacteriocinotipo. A partir de esto, los autores afirmaron al igual que hacia POPOVICI y cols. en la fagotipia, que para la bacteriocinotipia del gènere en estudio deben emplearse cepas autóctonas.

BUFFENMYER y cols. (104), emplearon también el esquema de SLOPEK y MARESZ-BABCZYSZYN previa inducción con mitomicina C en medio líquido de las cepas productoras. Efectuaron un sistema numérico de notación de los tipos con 4 números, tal como se observa en el cuadro 14. Tiparon 296 cepas de Klebsiella procedentes de pacientes intra y extrahospitalarios, así como del ambiente de tres hospitales, un 67% de los microorganismos fueron tipables, obteniendo una dispersión de 16 tipos. En el estudio de la consistencia se mostrò que un 19'1% de los modelos cambiaron en dos días seguidos de detección; estas cifras disminuyeron al emplear diluciones más bajas de las cepas L-4 y D-33. Los autores inciden en el hecho de la conservación de las cepas productoras por liofilizado a -48° C en medio mínimo. Estudian la influencia de la conservación de las bacteriocinas a -20° C y -68° C en las diluciones de inhibición (ID).

HALL (105), utilizò otro esquema para la tipificación del gènere consistente en 10 cepas productoras, éstas fueron obtenidas de la siguiente forma, en un primer paso probò

106 cepas como productoras, de entre las cuales encontró 42 que lo fueron y de estas seleccionó las 10 anteriormente mencionadas (cuadro 15). Su forma de definir un bacteriocinotipo es muy simple ya que lo indica por las cepas que tuvieron actividad sobre las de prueba, así el 3/27/77 sería el bacteriocinotipo correspondiente al microorganismo sensible a las cepas 3, 27 y 77. Fueron tipables aproximadamente el 72% sobre los cultivos probados. Obtuvo 50 modelos diferentes de actividades, si bien, la mayoría pertenecen al 16 (cuadro 16). El esquema, según la autora, tenía una pequeña limitación como era la repetición frecuente de las cepas 3 y 27 como productoras. La aplicación epidemiológica demostró la utilidad del esquema en algunos casos, así el bacteriocinotipo 3/4/7/23/24/27 apareció en unos tarros de crema para lavarse las manos, en diferentes hospitales; los bacteriocinotipos 4/7 y 3/4/7/27, aparecieron contaminando los biberones de una Sección de Lactantes y los mismos bacteriocinotipos se encontraron en las heces de los niños de la sala. Sin embargo, estos mismos tipos fueron encontrados, en algunos casos, en enfermos no relacionados, así como en productos patológicos diferentes, lo cual a nuestro juicio no es una limitación pues idénticos hechos ocurren con otros marcadores.

HEDDELL y MITCHELL (106), emplearon el esquema de HALL modificado, incrementándole 4 cepas obtenidas por los propios autores y que denominaron como cepas AM 1, 4, 7 y 21.

La denominación de los diferentes bacteriocinotipos se encuentra reflejada en el cuadro 17. Estudiaron 200 cepas de K. aerogenes, y obtuvieron un 93% de tipables y 11 tipos diferentes. La aplicación epidemiológica, en diversos brotes epidémicos en el ambiente hospitalario dió resultados satisfactorios. Según expresan los autores en el trabajo, consideramos errónea la técnica de tipificación empleada como bacteriocinotipo del género, ya que se deduce que estudian microcinas en lugar de bacteriocinas (107).

LIEBANA y cols. (108), mediante un estudio estadístico y computarizado de la acción de 260 cepas de Klebsiella sobre 31 indicadores, eligieron 7 para estructurar un esquema de sensibilidades, y 6 para estructurar un esquema de producción (cuadro 18 y 19). En el esquema por sensibilidades utilizaron 9 cepas productoras autóctonas numeradas como cepas 21, 69, 76, 84, 98, 141, 167, 171, 178 y cuya procedencia era, de heces - cuatro cepas; dos de orina; una de sangre; una de faringe y una de esputo; la especie utilizada como productora fue K. pneumoniae y dentro de ella se utilizaron los grupos K. pneumoniae A (7 cepas); K. pneumoniae B (1 cepa); K. pneumoniae C (1 cepa). Con estas cepas se formaron 3 grupos, con tres cepas cada uno de ellos.

Grupo I: Cepas 21, 69, 76

Grupo II: Cepas 84, 98, 141

Grupo III: Cepas 167, 171, 178

Se empleó una clasificación numérica de

de 1 al 8 para la tipia de las cepas investigadas, de tal forma que un microorganismo se clasificaría como 1 cuando fuese sensible a las tres cepas bacteriocinógenas que forman un grupo, como 2 cuando lo fuese a las dos primeras, etc. Como se emplearon tres grupos, la clasificación numérica final, estaría dada por un número de tres cifras, por ejemplo 111, cuando la cepa estudiada - fuese sensible a las tres cepas de cada grupo; 221 cuando la cepa fuese sensible a las dos primeras del grupo I y del grupo II y sensible a las tres cepas del grupo III. Aplicando el esquema a 120 cepas, observaron como el 100% de las cepas investigadas fueron tipables por el esquema por sensibilidades, obtuvieron un total de 44 bacteriocinotipos.

El otro esquema empleado es uno por producción, detectándose producción de unas cepas problemas frente a otras indicadores standars, éstas últimas son 6 y se encuentran divididas en dos grupos, empleándose una clasificación por letras según un código preestablecido (cuadro 19), de las 120 cepas tipadas por los autores sólo el 17'5% fueron clasificables, obteniendo un total de 57 bacteriocinotipos de tal forma que ninguno de ellos se presentó con una frecuencia superior al 20%.

CASTILLO (109), investigó la estabilidad de los bacteriocinotipos obtenidos por LIEBANA y cols. (110) - tras un año de conservación de las cepas en gelatina nutritiva. La aplicación del esquema en estudios epidemiológicos sobre K. -

ozar se también ha dado buenos resultados (111). Los estudios - realizados por CARRION PASTOR (112) sobre su aplicación epidemiológica y estabilidad confirmaron la viabilidad del esquema por sensibilidades.

EDMONDSON y COOK (113), empleando el método de inducción con mitomicina C ya comentado, enfrentan 190 cepas a las mismas 190 cepas y seleccionan 19 como productoras para su esquema. Esta cifra, obtenida por un estudio computarizado fuè posteriormente disminuida a 15. Tiparon un total de 227 cepas de las cuales todas, excepto 9, fueron clasificables. obteniendo un total de 130 modelos diferentes de actividad. La denominación de los tipos fuè hecha de acuerdo con los criterios establecidos por FARMER (114) tal como puede observarse en el cuadro 20. Efectuaron igualmente un estudio de reproductividad del esquema en 98 cepas tipándolas dos veces en el intervalo de 1 semana con preparados frescos y conservados a 4° C, los resultados pueden observarse en el cuadro 21.

Por otra parte, tiparon 10 colonias procedentes de un mismo cultivo y varias de heces durante 2-4 semanas del mismo, sujeto, mostrando el esquema su alta reproductividad.- El estudio de cepas de diferentes localizaciones de un mismo paciente, mostrò también interés práctico y otro tanto ocurrió con su empleo epidemiológico como marcador en brotes epidémicos.

CUADRO 12

CEPAS PRODUCTORAS DE PNEUMOCINAS. ESQUEMA DE SLOPEK Y MARESZ-BABCZYSZYN

| <u>Número</u> | <u>Especie</u> | <u>Tipo de pneumocina</u> | <u>Serotipo</u> |
|---------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------|
| 114 | K. pneumoniae var. atlantae | A | K-3 |
| 902 | K. aerogenes | A | K-16 |
| L-4 | K. ozaenae | A | K-4 |
| F-5052 | K. ozaenae | A | K-6 |
| L-34 * | K. ozaenae | A | K-4 |
| E-5051 * | K. ozaenae | A | K-5 |
| D-33 * | K. rhinoscleromatis | A | K-3 |
| D-35 * | K. rhinoscleromatis | A | K-3 |
| D-36 * | K. rhinoscleromatis | A | K-3 |
| D-40 | K. rhinoscleromatis | A | K-3 |
| 923 | K. aerogenes | C | K-10 |
| 525 * | K. pneumoniae | D | K-62 |
| 2813 (1) | K. aerogenes | F | K-23 |

* No incluidas en el juego de 8

(1) Aplicada para subdividir el bacteriocinotipo más frecuente

CUADRO 13

PNEUMOCINOTIPOS DE KLEBSIELLA SEROTIPOS 1, 3, 4, 13 y 37, SEGUN

SLOPEK y MARESZ-BABCZYSHYN

| <u>Pneumocinotipos</u> | <u>114</u> | <u>902</u> | <u>L-4</u> | <u>K-6</u> | <u>D-33</u> | <u>D-40</u> | <u>823</u> | <u>525</u> | <u>Nº cepas</u> |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| 1 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | 13 |
| 2 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | 6 |
| 3 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | ↓ | 1 |
| 4 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | ↓ | ↓ | 1 |
| 5 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | ↓ | ↓ | 7 |
| 6 | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | ↓ | | 3 |
| 7 | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | 3 |
| 8 | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | ↓ | ↓ | | 2 |
| 9 | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | ↓ | | | 1 |
| 10 | ↓ | ↓ | ↓ | | | ↓ | | | 1 |
| 11 | ↓ | ↓ | ↓ | | | | ↓ | ↓ | 8 |
| 12 | ↓ | ↓ | ↓ | | | | | ↓ | 1 |
| 13 | ↓ | ↓ | ↓ | | | | ↓ | | 2 |
| 14 | ↓ | ↓ | | ↓ | | | ↓ | ↓ | 1 |
| 15 | ↓ | ↓ | | | | | ↓ | ↓ | 15 |
| 16 | ↓ | ↓ | | | | | | ↓ | 2 |
| 17 | ↓ | | ↓ | ↓ | | | | | 1 |
| 18 | ↓ | | ↓ | | | | | | 1 |
| 19 | ↓ | | | | | | | | 2 |
| 20 | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | 2 |
| 21 | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | 2 |
| 22 | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | ↓ | | 1 |

CUADRO 13 (continuación)

| <u>Pneumocinotipos</u> | <u>114</u> | <u>902</u> | <u>L-4</u> | <u>K-6</u> | <u>D-33</u> | <u>D-40</u> | <u>823</u> | <u>525</u> | <u>Nº cepas</u> |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| 23 | | + | + | + | + | | | | 1 |
| 24 | | + | + | + | | + | + | | 2 |
| 25 | | + | + | + | | | + | | 7 |
| 26 | | + | + | + | | | + | + | 1 |
| 27 | | + | + | + | | | | | 3 |
| 28 | | + | + | | + | + | + | | 3 |
| 29 | | + | + | | + | + | | + | 1 |
| 30 | | + | + | | + | + | | | 1 |
| 31 | | + | + | | + | | + | + | 2 |
| 32 | | + | + | | + | | | + | 1 |
| 33 | | + | + | | | | + | | 6 |
| 34 | | + | + | | | | + | + | 10 |
| 35 | | + | + | | | | | + | 1 |
| 36 | | + | + | | | | | | 5 |
| 37 | | + | | | + | + | + | | 1 |
| 38 | | + | | | + | + | | + | 1 |
| 39 | | + | | | + | + | | | 3 |
| 40 | | + | | | + | | | | 3 |
| 41 | | + | | | | | + | | 21 |
| 42 | | + | | | | | | + | 7 |
| 43 | | + | | | | | + | + | 11 |
| 44 | | + | | | | | | | 17 |
| 45 | | | + | + | + | + | | + | 1 |

CUADRO 13 (continuación)

| <u>Pneumocinotipos</u> | <u>114</u> | <u>902</u> | <u>L-4</u> | <u>K-6</u> | <u>D-33</u> | <u>D-40</u> | <u>823</u> | <u>525</u> | <u>Nº capas</u> |
|------------------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----------------|
| 46 | | | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | | | 10 |
| 47 | | | ↓ | ↓ | ↓ | | | | 1 |
| 48 | | | ↓ | ↓ | | ↓ | | | 4 |
| 49 | | | ↓ | ↓ | | | | | 10 |
| 50 | | | ↓ | | ↓ | ↓ | ↓ | | 1 |
| 51 | | | ↓ | | ↓ | ↓ | | | 5 |
| 52 | | | ↓ | | ↓ | | | ↓ | 1 |
| 53 | | | ↓ | | ↓ | | | | 1 |
| 54 | | | ↓ | | | ↓ | | | 2 |
| 55 | | | ↓ | | | | | ↓ | 2 |
| 56 | | | ↓ | | | | | | 16 |
| 57 | | | | ↓ | | ↓ | | | 2 |
| 58 | | | | ↓ | | | | | 3 |
| 59 | | | | | ↓ | ↓ | | ↓ | 1 |
| 60 | | | | | ↓ | ↓ | | | 16 |
| 61 | | | | | ↓ | | | | 7 |
| 62 | | | | | | ↓ | | | 4 |
| 63 | | | | | | | ↓ | ↓ | 1 |
| 64 | | | | | | | ↓ | | 3 |
| 65 | | | | | | | | ↓ | 20 |

CUADRO 14

ESQUEMA DE SLOPEK Y MARESZ-BABCZYSZYN SEGUN LA UTILIZACION
DE BUFFENMYER y cols.

CLASIFICACION NUMERICA

| Reacción de dos Klebocinas | Número |
|----------------------------|--------|
| + + | 1 |
| + - | 2 |
| - + | 3 |
| - - | 4 |

EJEMPLOS

| CEPAS PRODUCTORAS | TIPO 1331 | | TIPO 4244 | |
|-------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| | | Reacción Nº | | Reacción Nº |
| 114 | + | 1 | - | 4 |
| 902 | + | | + | |
| L-4 | - | 3 | + | 2 |
| K-6 | + | | - | |
| D-33 | - | 3 | - | 4 |
| D-40 | + | | - | |
| 823 | + | 1 | - | |
| 825 | + | | - | 4 |

CUADRO 15

CEPAS PRODUCTORAS DEL ESQUEMA DE HALL

| Cepa klebsiella | Procedencia | Bacteriocinotipo | Fagotipo | Especies |
|-----------------|-------------------|------------------|--------------|-----------------------------|
| 3 | Exudado ocular | 4/7/23 | 1/5/10/16/10 | K. aerogenes |
| 4 | Exudado de herida | 3 | 2/16/17 | K. edwardsii var. edwardsii |
| 5 | Hemocultivo | 3 | ND | K. aerogenes |
| 7 | Orina | 3 | 2/16 | K. aerogenes |
| 23 | Espudo | 3 | 2 | K. pneumoniae |
| 24 | Orina | 3/27/9137 | ND | K. edwardsii var. edwardsii |
| 27 | Espudo | 3/4/7/23 | 2/7 | K. aerogenes |
| 30 | Orina | 3 | 2/3/17 | K. aerogenes |
| 77 | Exudado vaginal | 3 | ND | K. aerogenes |
| 9137 | NCTC | 4/7/23/27 | NT | K. spp |

NCTC : National Collection of Type Cultures ND : No tipada NT : No tipable

CUADRO 16

BACTERIOCINOTIPOS DE KLEBSIELLA SPP. OBTENIDOS POR HALL

| Bacteriocinotipo | Cepas di- versas | Orina | Espuito | Ex. he- rida | Ex. va- ginal | Heces adulto | Heces niño | Quema duras | Epide- mias | Comida niños | Ambiente |
|------------------------|---------------------|-------|---------|-----------------|------------------|-----------------|---------------|----------------|----------------|-----------------|----------|
| 3 | 53 | 24 | 37 | 27 | 43 | 67 | 18 | 50 | 42 | 19 | 31 |
| 3/27 | 7 | 15 | 6 | 7 | 10 | 0 | 12 | 12 | 1 | 4 | 3 |
| 3/4/7/27 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 58 | 0 |
| 27 | 2 | 3 | 4 | 9 | 5 | 0 | 29 | 1 | 2 | 0 | 2 |
| 4/7/23/24/27 | 0 | 3 | 8 | 13 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 8 |
| 3/4/7/23/24/27 | 0 | 4 | 4 | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 |
| 3/27/9137 | 1 | 11 | 2 | 9 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 3/9137 | 0 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 3/5/30/77 | 1 | 1 | 4 | 2 | 5 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 9137 | 0 | 0 | 4 | 0 | 10 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 3/27/77 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| 4/7/23/24 | 0 | 2 | 2 | 0 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 4/7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 |
| 7 | 1 | 3 | 2 | 2 | 0 | 0 | 6 | 0 | 1 | 6 | 0 |
| 5/30/77 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3/4/5/30 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NT | 22 | 15 | 20 | 23 | 22 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| Otros tipos | 13 | 12 | 5 | 4 | 0 | 11 | 5 | 3 | 7 | 0 | 1 |
| Nº de cepas tipadas | 106 | 110 | 49 | 45 | 21 | 9 | 49 | 108 | 132 | 36 | 65 |

CUADRO 17

ESQUEMA DE HALL MODIFICADO POR HEDELL Y MITCHELL

| Tipos | Cepas de Hall | | | | | | | | | | Cepas Heddell Mitchell | | | |
|-------|---------------|---|---|---|----|----|----|----|----|------|---------------------------|---|---|----|
| | 1 | 4 | 5 | 7 | 23 | 24 | 27 | 30 | 77 | 9137 | 1 | 4 | 7 | 21 |
| 1 | + | | | | | | | | | | + | + | + | + |
| 2 | | + | | | | + | | | | | + | + | + | + |
| 3 | | | + | | | + | | | | | + | + | + | + |
| 4 | | | | | | + | | | | | + | + | + | + |
| 5 | | | | | | + | | | | | + | + | + | + |
| 6 | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | + | | | | | + | | | | | + | + | + | + |
| 8 | | | | | | + | | | | | + | + | + | + |
| 9 | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | | | | | | + | + | | | | + | + | + | + |
| 11 | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

CUADRO 18

METODO PARA LA BACTERIOCIOTIPIA DEL GENERO KLEBSIELLA. ESQUEMA POR SENSIBILIDADES (LIEBANA y cols.)

CEPAS PRODUCTORAS

| <u>Número</u> | <u>Procedencia</u> | <u>Especie</u> |
|---------------|--------------------|-----------------|
| 21 | Orina | K. pneumoniae A |
| 69 | Faringe | K. pneumoniae B |
| 76 | Orina | K. pneumoniae A |
| 84 | Sangre | K. pneumoniae A |
| 98 | Espuito | K. pneumoniae C |
| 141 | Heces | K. pneumoniae A |
| 167 | Heces | K. pneumoniae A |
| 171 | Heces | K. pneumoniae A |
| 178 | Heces | K. pneumoniae A |

Grupo I : 21, 69, 76

Grupo II : 84, 98, 141

Grupo III: 167, 171, 178

CLASIFICACION NUMERICA

| | | | | | | | |
|-----|---|---|---|-----|---|---|---|
| 1 : | + | + | + | 5 : | + | - | + |
| 2 : | + | + | - | 6 : | - | + | + |
| 3 : | + | - | - | 7 : | - | + | - |
| 4 : | - | - | - | 8 : | - | - | + |

CUADRO 19

METODO PARA LA BACTERIOCINOTIPIA DEL GENERO KLEBSIELLA. ESQUEMA POR PRODUCCION (LIEBANA Y cols.)

CEPAS INDICADORAS

| <u>Número</u> | <u>Procedencia</u> | <u>Especie</u> |
|---------------|--------------------|-----------------|
| 101 | Orina | K. pneumoniae A |
| 102 | Orina | K. pneumoniae B |
| 103 | Orina | K. pneumoniae A |
| 109 | Orina | K. pneumoniae A |
| 114 | Heces | K. pneumoniae A |
| * 9KC | - | - |

Grupo I : Cepas 101, 102, 103
 Grupo II : Cepas 109, 114, 9KC

* Enviada por MARESZ-BABCZYSZYN

CLASIFICACION

| | |
|-----------|-----------|
| A : + + + | E : + - + |
| B : + + - | F : - + + |
| C : + - - | G : - + - |
| D : - - - | H : - - + |

CUADRO 20

ESQUEMA DE EDMONSDSON Y COOKE. REGLAS NEMOTECNICAS

DENOMINACION DE LAS CEPAS PRODUCTORAS P1 A P15

| <u>Especie</u> | <u>Número</u> |
|---------------------|---------------|
| K. aerogenes | 12 |
| K. atlantae | 1 |
| K. edwardsii | 1 |
| K. rhinoscleromatis | 1 |

CEPAS PRODUCTORAS

REGLAS NEMOTECNICAS (FARMER)

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| + | + | : | 1 | + | - | : | 5 |
| + | + | - | 2 | - | + | - | 6 |
| + | - | + | 3 | - | - | : | 7 |
| - | + | + | 4 | - | - | : | 8 |

EJEMPLO: BACTERIOCINOTIPO 12888

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Cepa indicadora | P1 | P2 | P3 | P4 | P5 | P6 | P7 | P8 | P9 | P10 | P11 | P12 | P13 | P14 | P15 |
| | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

CUADRO 21

REPRODUCTIVIDAD DEL ESQUEMA DE EDMONDSON Y COOKE EN 98 CEPAS
TIPADAS DE DOS FORMAS EN EL INTERVALO DE UNA SEMANA

| | Número de cambios | | | | |
|-----------------------|-------------------|-----|----|----|----|
| | en los patrones | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| Preparaciones frescas | 67% | 22% | 3% | 3% | 3% |
| Preparaciones a 4°C | 46% | 33% | 8% | 7% | 4% |

2-5. ANTIBIOTICOTIPIA

Con el nombre de antibioticotipia no hemos encontrado tras una amplia revisión bibliográfica ningún esquema de tipificación de K. pneumoniae. Por supuesto, sí existe una gran multitud de trabajos donde se estudia la susceptibilidad "in vitro" de Klebsiella.

La sensibilidad de K. pneumoniae a los diversos antimicrobianos es muy variable y casi siempre es necesario realizar, para determinarla, un antibiograma. De los numerosos estudios realizados y fijando la atención fundamentalmente en los de LIEBANA (115) por haber realizado sus investigaciones en Granada y con cepas autóctonas podemos realizar el siguiente resumen.

- 1) K. pneumoniae es altamente resistente al grupo de las penicilinas.
- 2) La sensibilidad al grupo de las cefalosporinas es variable.
- 3) En el grupo de aminoglucosidos, gentamicina, tobramicina, amikacina y dibekacina son altamente efectivos.
- 4) Muy escasas cepas hospitalarias son resistentes a la colimicina, que parece ser el antibiótico más eficaz.
- 5) Las tetraciclinas tienen sobre K. pneumoniae, una actividad variable.
- 6) Los macrólidos no son eficaces.
- 7) Rifampicina y cloranfenicol tienen una acción variable, mien-

tras que la fosfomicina no es muy eficaz.

8) Las sulfamidas suelen ser ineficaces en la mayoría de las oca
ciones.

9) Los quimioterápicos tipo ac. nalidíxico, ac. oxolínico, uran
toina y nibiol son de gran utilidad.

Remitimos a los cuadros 22, 23, 24, 25, y
26 que indican los resultados obtenidos por LIEBANA y que han -
servido de base a nuestro estudio para realizar el esquema de an
tibioticotipia como luego veremos.

CUADRO 22

RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN K. PNEUMONIAE A
CEPAS HOSPITALARIAS

| Antimicrobianos | Sensibles | | Sensib. mod. | | Resistencia | |
|-----------------|-----------|------|--------------|------|-------------|------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Ampicilina | 3 | 4'7 | 10 | 15'8 | 50 | 79'3 |
| Carbenicilina | 8 | 12'6 | 15 | 23'8 | 40 | 63'9 |
| Cefaloridina | 40 | 63'4 | 10 | 15'8 | 13 | 20'6 |
| Cefazolina sod. | 60 | 95'2 | - | - | 3 | 4'7 |
| Estreptomina | 16 | 25'3 | 40 | 63'4 | 7 | 11'1 |
| Gentamicina | 63 | 100 | - | - | - | - |
| Tobramicina | 63 | 100 | - | - | - | - |
| Colimicina | 63 | 100 | - | - | - | - |
| Tetraciclina | 35 | 55'5 | 10 | 15'8 | 18 | 28'5 |
| Minociclina | 40 | 63'4 | 12 | 19 | 11 | 17'4 |
| Cloranfenicol | 40 | 63'4 | 2 | 3'1 | 21 | 33'3 |
| Fosfomicina | 30 | 47'6 | 13 | 20'6 | 20 | 31'7 |
| Nitrofurantoina | 40 | 63'4 | 10 | 15'8 | 13 | 20'6 |
| Ac. nalidísico | 61 | 96'8 | 1 | 1'5 | 1 | 1'5 |
| Trimetropin-S | 52 | 82'5 | 7 | 11'1 | 4 | 6'3 |
| Nibiol | 61 | 96'8 | 1 | 1'5 | 1 | 1'5 |
| Ac. oxolínico | 61 | 96'8 | 1 | 1'5 | 1 | 1'5 |
| Sulfadiacina | 10 | 15'8 | 5 | 7'9 | 48 | 76'1 |

CUADRO 23

RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN K. PNEUMONIAE A
CEPAS AMBULATORIAS

| Antimicrobianos | Sensibles | | Sensib. mod. | | Resistencia | |
|-----------------|-----------|-----|--------------|----|-------------|----|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Ampicilina | 1 | 5 | 3 | 15 | 16 | 80 |
| Carbenicilina | 4 | 20 | 8 | 40 | 8 | 40 |
| Cefaloridina | 10 | 50 | 6 | 30 | 4 | 20 |
| Cefazolina sod. | 15 | 75 | 3 | 15 | 2 | 10 |
| Estreptomina | 6 | 30 | 12 | 60 | 2 | 10 |
| Gentamicina | 19 | 95 | - | - | 1 | 5 |
| Tobramicina | 19 | 95 | - | - | 1 | 5 |
| Colimicina | 20 | 100 | - | - | - | - |
| Tetraciclina | 9 | 45 | 5 | 25 | 6 | 30 |
| Minociclina | 12 | 60 | 5 | 25 | 3 | 15 |
| Cloranfenicol | 11 | 55 | 6 | 30 | 3 | 15 |
| Fosfomicina | 11 | 55 | 8 | 40 | 1 | 5 |
| Nitrofurantoina | 10 | 50 | 6 | 30 | 4 | 20 |
| Ac. nalidixico | 17 | 85 | 2 | 10 | 1 | 5 |
| Trimetropin-S | 14 | 70 | 3 | 15 | 3 | 15 |
| Nibiol | 17 | 85 | 2 | 10 | 1 | 5 |
| Ac. oxolínico | 17 | 85 | 2 | 10 | 1 | 5 |
| Sulfadiazina | 3 | 15 | 4 | 20 | 13 | 65 |

CUADRO 24

RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN K. PNEUMONIAE B

| Antimicrobianos | Sensibles | | Sensibilidad mod. | | Resistencia | |
|-----------------|-----------|-------------|-------------------|-------------|-------------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Ampicilina | 1 (-) | 7'4 (-) | 2 (1) | 14'2 (11'1) | 11 (8) | 78'5 (88'8) |
| Carbencilina | 3 (1) | 21'4 (11'1) | 4 (3) | 28'5 (33'3) | 7 (5) | 50 (55'5) |
| Cefaloridina | 8 (5) | 57'1 (55'5) | 1 (1) | 7'1 (11'1) | 5 (3) | 35'7 (33'3) |
| Cefazolina sod. | 9 (6) | 64'2 (66'6) | 1 (2) | 7'1 (22'2) | 4 (1) | 28'5 (11'1) |
| Estreptomicina | 4 (2) | 28'5 (22'2) | 7 (5) | 50 (55'5) | 3 (2) | 21'4 (22'2) |
| Gentamicina | 14 (8) | 100 (88'8) | - | - | - (1) | - (11'1) |
| Tobramicina | 14 (8) | 100 (88'8) | - | - | - (1) | - (11'1) |
| Colimicina | 14 (9) | 100 (100) | - | - | - | - |
| Tetraciclina | 4 (2) | 28'5 (22'2) | 3 (3) | 21'4 (33'3) | 7 (4) | 50 (44'4) |
| Minociclina | 5 (3) | 35'7 (33'3) | 6 (4) | 42'8 (44'4) | 3 (2) | 21'4 (22'2) |
| Cloranfenicol | 3 (3) | 21'4 (33'3) | 9 (2) | 64'2 (22'2) | 2 (4) | 14'2 (44'4) |
| Fosfomicina | 6 (4) | 42'8 (44'4) | 5 (3) | 35'7 (33'3) | 3 (2) | 21'4 (22'2) |
| Nitrofurantoina | 7 (4) | 50 (44'4) | 6 (2) | 42'8 (22'2) | 1 (3) | 7'1 (33'3) |
| Ac. nalidixico | 12 (7) | 85'7 (77'7) | 1 (2) | 7'1 (22'2) | 1 (-) | 7'1 (-) |
| Trimetropin-S | 10 (6) | 83'3 (66'6) | 3 (2) | 21'4 (22'2) | 1 (1) | 7'1 (11'1) |

CUADRO 24 (continuación)

| Antimicrobianos | Sensibles | | Sensibilidad mod. | | Resistencia | |
|-----------------|-----------|-------------|-------------------|------------|-------------|-------------|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Nibiol | 13 (8) | 92'8 (88'8) | 1 (1) | 7'1 (11'1) | - | - |
| Ac. oxolínico | 12 (7) | 85'7 (77'7) | 1 (2) | 7'1 (22'2) | 1 (-) | 7'1 (-) |
| Sulfadiazina | 2 (1) | 14'2 (11'1) | 1 (2) | 7'1 (22'2) | 11 (6) | 78'5 (66'6) |

Entre paréntesis figuran cepas de origen ambulatorio

CUADRO 25

RESULTADO DEL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN K. PNEUMONIAE C

| Antimicrobianos | Sensible | | Sensib. mod. | | Resistencia | |
|-----------------|----------|----|--------------|----|-------------|----|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Ampicilina | 1 | 10 | 2 | 20 | 7 | 70 |
| Carbenicilina | 2 | 20 | 5 | 50 | 3 | 30 |
| Cefaloridina | 5 | 50 | 2 | 20 | 3 | 30 |
| Cefazolina sod. | 7 | 70 | 2 | 20 | 1 | 10 |
| Estreptomina | 2 | 20 | 5 | 50 | 3 | 30 |
| Gentamicina | 7 | 70 | - | - | 3 | 30 |
| Tobramicina | 7 | 70 | - | - | 3 | 30 |
| Colimicina | 8 | 80 | 1 | 10 | 1 | 10 |
| Tetraciclina | 4 | 40 | 2 | 20 | 4 | 40 |
| Minociclina | 5 | 50 | 3 | 30 | 2 | 20 |
| Cloranfenicol | 5 | 50 | 3 | 30 | 2 | 20 |
| Fosfomicina | 5 | 50 | 2 | 20 | 3 | 30 |
| Nitrofurantoina | 5 | 50 | 2 | 20 | 3 | 30 |
| Ac. nalidixico | 7 | 70 | 2 | 20 | 1 | 10 |
| Trimetropin-S | 6 | 60 | 2 | 20 | 2 | 20 |
| Nibiol | 8 | 80 | 1 | 10 | 1 | 10 |
| Ac. oxolínico | 7 | 70 | 2 | 20 | 1 | 10 |
| Sulfadiazina | 2 | 20 | 3 | 30 | 5 | 50 |

Se incluyen cepas de origen hospitalario y ambulatorio

CUADRO 26

RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD EN K. PNEUMONIAE D

| Antimicrobianos | Sensibles | | Sensib. mod. | | Resistencia | |
|-----------------|-----------|-----|--------------|----|-------------|-----|
| | Nº | % | Nº | % | Nº | % |
| Ampicilina | - | - | - | - | 4 | 100 |
| Carbenicilina | - | - | - | - | 4 | 100 |
| Cefaloridina | 1 | 25 | 2 | 50 | 1 | 25 |
| Cefazolina sod. | 3 | 75 | 1 | 25 | - | - |
| Estreptomicina | 1 | 25 | 3 | 75 | - | - |
| Gentamicina | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Tobramicina | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Colimicina | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Tetraciclina | 2 | 50 | - | - | 2 | 50 |
| Minociclina | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Cloranfenicol | 2 | 50 | - | - | 2 | 50 |
| Fosfomicina | 3 | 75 | - | - | 1 | 25 |
| Nitrofurantoina | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Ac. nalidixico | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Trimetropin-S | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Nibiol | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Ac. oxolínico | 4 | 100 | - | - | - | - |
| Sulfadiazina | 1 | 25 | - | - | 3 | 75 |

Se incluyen cepas de origen hospitalario y ambulatorio.

2-6. NOTAS BIBLIOGRAFICAS AL CAPITULO SEGUNDO.

- 31.- EDWARDS, P.R; EWING, W.H (1.972), pág. 290-299.
- 32.- LE MINOR, L (1.972), pág. 120-123.
- 33.- RICHARD, C. (1.973), pág. 302 y resto.
- 34.- COMAN, S.T; STEEL, K.J (1.974), pág. III y tabla 7.9a (pág. 106) y 7.9a (pág. 110).
- 35.- LIEBANA, J (1.977), pág. 15-16.
- 36.- ØRSKOV, I (1.957), todo el trabajo.
- 37.- DURLAKOWA, J; LACHOWICZ, Z; SLOPEK, S (1.967), pág. 496.
- 38.- RICHARD, C (1.973), todo el trabajo en relación con la biotipia.
- 39.- PUMAROLA y cols. (1.978), comunicación personal.
- 40.- RENNIE, R.P; DUNCAN, B.R (1.974), pág. 535.
- 41.- LIEBANA, J (1.977), pág. 241.
- 42.- CASTILLO, A (1979), pág. 82.
- 43.- HAVERKORN, M.L; MICHEL, M.F (1.979), pág. 180.
- 44.- ROMAN, J (1.978), pág. 24 y 153.
- 45.- LIEBANA, J y cols. (1.978 a), todo el trabajo.
- 46.- CARRION, J.A (1.980), Tesis doctoral, pág. 286-288.
- 47.- MILCH, H y DEAK, S (1.964), pág. 252.
- 48.- Ibidem.
- 49.- EUSTATZIOU, S y cols. (1.962), todo el trabajo.
- 50.- MILCH, H y DEAK, S (1.964), pág. 252-253.
- 51.- Ibidem, todo el trabajo.
- 52.- PRZONDO - HESSEK, A (1.967), todo el trabajo.

- 53.- PRZONDO - HESSEK, A y SLOPEK, S. (1.967 a), todo el trabajo.
- 54.- PRZONDO - HESSEK, A y cols. (1.967), todo el trabajo.
- 55.- PRZONDO - HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967 b), todo el trabajo.
- 56.- PRZONDO - HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967 c), todo el trabajo.
- 57.- PRZONDO - HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967 d), todo el trabajo.
- 58.- SLOPEK, S y cols. (1.967), todo el trabajo.
- 59.- POPOVICI, M y cols., todo el trabajo.
- 60.- GABRILOVICH, I.M; todo el trabajo.
- 61.- MILCH, H y DEAK, S (1.968), todo el trabajo.
- 62.- PRZONDO - HESSEK, A y cols. (1.968), todo el trabajo.
- 63.- GABRILOVICH, I.M y cols., extracto
- 64.- KRZYWY, T (1.972 a), resumen.
- 65.- KRZYWY, T (1.972 b), resumen.
- 66.- EDWARDS, P.R y EWING, W.H, pág. 294-295.
- 67.- ROSE, A.H, pág. 15-16.
- 68.- LE BOUAR, Y, pág. 305.
- 69.- EDWARDS, P.R y EWING, W.H, pág. 295 y 296.
- 70.- ZINSSER, pág 706.
- 71.- LE BOUAR, Y; pág. 305.
- 72.- DUMAS; J; pág. 389h-389i.
- 73.- ZINSSER; pág. 706 y 707.
- 74.- PEDRO PONS, A; pág. 330.
- 75.- ØRSKOV, I (1.974), pág. 323.
- 76.- LE BOUAR, Y; pág. 305.

- 77.- LE MINOR; pág. 123 y 124.
- 78.- RICHARD, C; pág. 296 y 297.
- 79.- EDWARDS, P.R y EWING, W. H; pág. 297.
- 80.- RICHARD, C; pág. 296 y 297.
- 81.- SANCHEZ BUENAVENTURA, J y GARCIA SABATER, J.F; pág. 11 y 12.
- 82.- DIFCO, según instrucciones que acompañan a los antisueros -
comercializados.
- 83.- RICHARD, C; pág. 296-297.
- 84.- Ibidem, todo el trabajo.
- 85.- SANCHEZ BUENAVENTURA, J y GARCIA SABATER, J.F; todo el tra-
bajo.
- 86.- RICHARD, C; pág. 300-301.
- 87.- PEDRO PONS, A; pág. 330.
- 88.- EICKHOFF, T.C y cols.; todo el trabajo.
- 89.- SANCHEZ BUENAVENTURA, J y GARCIA SABATER, J.F; todo el traba-
jo.
- 90.- PEDRO PONS, A; pág. 330 en referencia a BROOKE.
- 91.- CASTILLO PEREZ, A (1.979), Tesina de Licenciatura.
- 92.- LE BOUAR, Y; pág. 305.
- 93.- ZINSSER, pág. 707.
- 94.- ØRSKOV, I (1.974), pág. 323 y 324.
- 95.- HEIDEIBERGER, M; pág. 288g a 288j y las pág. 276 y 281 a 285.
- 96.- DUMAS, J; pág. 389.
- 97.- Ibidem.

- 98.- HAMON, Y; PERON, Y (1.963), pág. 309-310.
- 99.- MARESZ-BABCZYSZYN, J y cols. (1.967 a), todo el trabajo.
- 100.- MARESZ-BABCZYSZYN, J y cols. (1.967 b), todo el trabajo.
- 101.- MARESZ- BABCZYSZYN, J (1.967), todo el trabajo.
- 102.- SLOPEK, S; MARESZ-BABCZYSZYN, J (1.967), todo el trabajo.
- 103.- LIEBANA, J y cols. (1.978), todo el trabajo.
- 104.- BUFFENMYER, C; PYCHECK, R.R; YEE, R.B (1.976) , todo el -
trabajo.
- 105.- HALL, F.A (1.971), todo el trabajo.
- 106.- HEDDELL, G.W; MITCHELL, A.A.B (1.978), pág. 18.
- 107.- Ibidem, pág. 17.
- 108.- LIEBANA , J y cols. (1.977 a), todo el trabajo.
- 109.- CASTILLO, A (1.979), pág. 115.
- 110.- LIEBANA, J y cols. (1.979), todo el trabajo.
- 111.- LIEBANA, J; comunicación personal.
- 112.- CARRION, J.A (1.980), Tesis doctoral, pág. 296-288.
- 113.- EDMONDSON, A.S; COOKE, E.M (1.978), pág. 210.
- 114.- FARMER III, J.J (1.970), todo el trabajo.
- 115.- LIEBANA, J (1.977), Tesis doctoral, pág. 330-335.

CAPITULO TERCERO
APORTACION PERSONAL

3-1. PARTE PRIMERA. MATERIAL Y METODOS

3-1-1. Identificación de cepas ensayadas y sistemática seguida

Aunque no es objeto de este trabajo, hemos creído oportuno incluir aquí la marcha sistemática empleada para el diagnóstico de las 160 cepas de Klebsiella que han sido utilizadas en nuestro estudio.

Cuando los microorganismos habían sido aislados previamente en nuestro Departamento y por tanto llegaban a nuestras manos en un medio de conservación, la identificación bioquímica-morfológica llevada a cabo por nosotros fue la siguiente: siembra a partir del medio de conservación en caldo B.N.I. e incubación 4 horas a 37° C en baño con agitación continua; aislante en agar Mac Conkey e incubación 24 horas a 37° C; una de las colonias se suspendió en 2 cc de solución salina isotónica al 0.9% estéril y a partir de esta suspensión se inoculó abundantemente una placa de Petri con agar nutritivo que se incubó 24 horas a 37° C; de la masa microbiana obtenida se realizaron un conjunto de pruebas como: Tinción de Gram, calatasa, O/F para glucosa, nitratos, oxidasa, movilidad, K.I.A., I.M.V.i.C., malonato, ureasa, gelatinasa, L.D.C., A. D.H., O.D.C., O.N.P.G., F.A.D., DNasa y sacarosa.

La confirmación de los resultados obtenidos se hizo siguiendo el cuadro que hemos dividido en cuatro apartados: pruebas específicas de Enterobacterias, de género, de tribu, diferenciables entre especies de Klebsiella y diferenciales con otras enterobacterias inmóviles (cuadro 26).

A continuación pasamos a la enumeración de las técnicas, medios utilizados y criterios de interpretación.

1.- GELATINA NUTRITIVA

Se empleó el medio comercializado por BBL (11.481) cuya composición es la siguiente:

| | |
|----------------------------|--------|
| Peptona Gelysate..... | 5 g. |
| Extracto de carne de res.. | 3 g. |
| Gelatina..... | 120 g. |

Para rehidratar el medio se suspenden - 120 gramos en 1000 ml. de agua destilada, calentándose hasta 50° C para disolver el producto por completo y ajustando el pH a 6'8. Se distribuyen 3 cc en tubos de 10 X 100 esterilizándose en el autoclave 15 minutos a 120°C.

Se utilizó este medio para conservación de muestra colección. Una vez identificados los géneros se inoculaban en gelatina nutritiva, en serie de tres, de una forma abundante a partir del agar nutritivo y realizando una incubación a 37° C durante 24 horas. Trás ese tiempo se sustituyeron los tapones de algodón por otros de caucho, colocándose los tubos a 4° C.

2.- INFUSION DE CEREBRO CORAZON (B.H.I.)

Se empleó el medio comercializado por BBL (110.591) con la siguiente fórmula:

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Infusión de cerebro de ternera..... | 200 g. |
| Infusión de corazón de buey..... | 250 g. |
| Peptona (Gelitate - BBL)..... | 10 g. |
| Cloruro sódico..... | 5 g. |
| Fosfato disódico..... | 2'5 g. |
| Glucosa..... | 2 g. |

Para rehidratar el medio se disuelven 37 gramos en 1000 ml. de agua destilada mediante calentamiento. Se distribuyen 4 cc en tubos de 14 X 100 esterilizandose 15 minutos a 120° C. La reacción final del medio será de un pH alrededor de 7'4.

3.- AGAR MAC CONKEY

Se utilizò medio comercializado, BBL - 11.387, cuya composición es la siguiente:

| | | |
|--------------------------|-------|----|
| Peptona Gelysate..... | 17 | g. |
| Peptona Polypeptona | 3 | g. |
| Lactosa | 10 | g. |
| Sales biliares | 1'5 | g. |
| Cloruro sódico | 5 | g. |
| Rojo neutro | 0'03 | g. |
| Cristal violeta..... | 0'001 | g. |
| Agar..... | 13'5 | g. |

Se disuelve 50 gramos del medio deshidra

tado en un litro de agua destilada, se mezcla bien hasta obtener una suspensión uniforme, calentándose suavemente y dejando hervir durante un minuto. Se ajusta el pH a 7'1 aproximadamente y repartiéndose 20 ml. por tubos de 20 X 100. La esterilización se efectúa a 120° C, 15 minutos y la conservación a 4° C; al utilizarlo se funden los tubos al baño-maria colocándose en placas de Petri de 100 mm y dejándose solidificar.

Las colonias de Klebsiella aparecen de color rojo ladrillo, rosas e incluso incoloras, grandes, prominentes lisas, a veces mucosas y filantes y con un olor "sui generis".

4.- AGAR NUTRITIVO

| | |
|------------------------|----------|
| Extracto de carne..... | 3 g. |
| Peptona..... | 5 g. |
| Agar..... | 15 g. |
| Agua destilada..... | 1000 ml. |

Se disuelve por calor, pH 6'8, esterilizándose a 120° C durante 15 minutos. Los tubos conteniendo 20 ml. se conservan a 4° C y al emplearlos se licúan al baño-maria colocándose en placas Petri de 100 mm.

5.- TINCION DE GRAM por la técnica usual.

6.- PRUEBA DE LA CATALASA

Se hizo una suspensión en agua oxigenada

al 30% en un portaobjeto. La presencia de una catalasa se revela por la aparición de burbujas, expresión del desdoblamiento de H_2O_2 en agua y oxígeno libre en forma de gas.

7.- OXIDACION - FERMENTACION (O/F) PARA GLUCOSA.

Se utilizó el medio base de Hugh-Leifson comercializado por bio-Merieux (5- 175 2) cuya fórmula es la siguiente:

| | |
|-------------------------|---------|
| bio - Trypcase | 2 g. |
| Cloruro sódico..... | 5 g. |
| Fosfato dipotásico..... | 0'3 g. |
| Agar..... | 2'5 g. |
| Azul de bromotimo..... | 0'03 g. |

Se suspenden 9'8 gramos de medio seco en un litro de agua destilada, calentándose hasta la disolución completa. Se añade glucosa a la concentración de 1%, se disuelve y se ajusta el pH a 7'2 (color verdoso). La esterilización se hace en el autoclave a 110° C durante 10 minutos. Nosotros hemos utilizado tubos de 14 X 130 con 3 cc de medio y que antes de la inoculación regenerábamos a 43° C - 50° C durante 10 minutos.

Se utilizan dos tubos y tras la siembra, uno se cubre con 1 cm aproximadamente de parafina estéril. En nuestro trabajo la incubación se hizo a 37° C durante 24 horas y tras este tiempo efectuamos la lectura que interpretamos de acuerdo a

con las normas habituales:

A.- Bacterias fermentativas: acidificación rápida e igual en ambos tubos que aparecen totalmente amarillos o alrededor de la picadura.

B.- Bacterias oxidativas: acidificación moderada en el tubo sin parafina, iniciándose en la superficie.

C.- Bacterias inactivas: no modificación del pH o una alcalinización más o menos marcada en la superficie (viraje al azul).

8.- NITRATOS

Se utilizó un caldo con nitratos comercializados por Difco (0268) con la siguiente composición:

Extracto de carne..... 3 g.

Peptona..... 5 g.

Nitrato potásico..... 1 g.

Se disuelven por calor 9 gramos en 1000 ml. de agua destilada. Se ajusta el pH a 7, distribuyéndose 2 cc en tubos de 10 X 100 y esterilizando en autoclave 15 minutos a 120° C.

Se inoculan los microorganismos desde el agar nutritivo, incubándose 24 horas a 37° C. La lectura se efectuó según las normas habituales de nuestro Departamento, adicionando primero 4 ó 5 gotas de clorhidrato de ottotolidina y seguidamente otras tantas de amoniaco o potasa.

La reacción positiva viene indicada por la aparición de un color marrón oscuro, expresión de la existencia en el microorganismo problema de una nitrato-reductasa capaz de reducir los nitratos a nitritos. Una reacción negativa (color original) necesita de la adición de una pizca de zinc en polvo, agitar energicamente y añadir de nuevo los reactivos. Si tras es to aparece positividad la prueba se considerará negativa ya que aquella indica los microorganismos no redujeron los nitratos a nitritos y que esto último es debido al zinc que actúa como reduc tor. Por el contrario si persiste la negatividad se deduce que el medio carece de nitratos para ser reducidos por el zinc que se encuentran en estado de amoníaco con lo que la prueba se consi - dera como positiva.

9.- OXIDASA

Se utilizaron discos impregnados con - N-dimetil-parafenilendiamina (bio Mèricux 5-592 1) y conservados a 4° C. A partir de la masa microbiana del agar nutritivo se to mò, con una pipeta Pasteur cerrada, un grupo de colonias colocan dose sobre el disco levemente mojado con solución salina isotòni ca estéril. La prueba positiva viene indicada por el color rojo oscuro que luego pasa a negro. La negatividad no implica cambio de color.

El fundamento de la reacción es el siguien te: la citocromo oxidasa (último enzima de la fosforilización oxi dativa) al actuar sobre un sustrato incoloro (el reactivo emplea

do) determina la formación de una semi-quinona roja, la cual al ser muy inestable se oxida rápidamente dando un compuesto negrozco.

10.- MOVILIDAD

Se decretó por examen directo en fresco y por picadura en agar nutritivo al 0'3% e incubación a 22 y 37° C.

11.- K.I.A. (KLIGLER IRON AGAR)

Se empleó el medio comercializado (Difco 0086) con la siguiente fórmula:

| | | |
|----------------------------|-------|----|
| Extracto de carne | 3 | g. |
| Extracto de levadura | 3 | g. |
| Peptona | 15 | g. |
| Proteosa peptona | 5 | g. |
| Glucosa | 1 | g. |
| Lactosa | 10 | g. |
| Sulfato ferroso | 0'2 | g. |
| Cloruro sódico | 5 | g. |
| Tiosulfato sódico | 0'3 | g. |
| Rojo fenol | 0'024 | g. |
| Agar | 12 | g. |

Para rehidratar el medio se suspenden -

a justándose al pH 7'4-7'6, 55 gramos en 1000 ml. de agua destilada, se disuelve por calor. Se colocan 5 cc en tubos de 14 X 130 autoclavándose a 120° C durante 15 minutos. Estando aún el medio líquido los tubos se inclinan dejándose así solidificar para que quede una lengüeta apropiada.

La siembra se realiza por picadura central e incubándose a 37° C, 24 horas, tras cuyo tiempo se realiza la lectura de la glucosa en el fondo (positividad, amarillo con o sin gas y negatividad, color original), de la lactosa en la lengüeta (positiva, amarilla; negativa, roja) y la producción de SH_2 (ennegrecimiento, generalmente de la parte media-inferior).

La utilización de la glucosa con gas -- (CO_2 ó H_2) o sin él, entraña siempre, en un primer tiempo, una acidificación de todo el medio. La glucosa en pequeña proporción, es consumida rápidamente y en el caso de que los microorganismos no ataquen la lactosa, ésta acidez es neutralizada en aerobiosis por la formación de amoníaco proveniente de la degradación de los ácidos aminados. Si la lactosa es utilizada volverá a aparecer un pH bajo, que se detectará visualmente sólo en la lengüeta, capaz de neutralizar la alcalinización anterior. La acción de ciertas desulfhidrasas determinan en algunos casos la formación de SH_2 , el sulfato ferroso actuaría como un indicador que al reducirse se transforma en sulfuro negro.

12.- INDOL (I)

La producción de indol se detectò en el siguiente medio

| | |
|---------------------|----------|
| Triptona..... | 10 g. |
| Cloruro sòdico..... | 5 g. |
| Agua destilada..... | 1000 ml. |

Se disuelve por calor, ajustàndose a pH 7'2. Se reparten 3 cc por tãbos de 14 X 13 0, autoclavandose 20 minutos a 120° C.

Tras la siembra e incubaciòn a 37° C durante 24 horas, se añaden unas gotas de reactivo de Ehrlich-Ko - vacs:

| | |
|--------------------------------------|--------|
| Paradimetil amino-benzaldehido | 5 g. |
| Alcohol amilico | 75 ml. |
| Acido clorhidrico puro | 25 ml. |

Se disuelve el aldehido en el alcohol al baño-maria a 60° C, se enfria y se añade gota a gota el àcido, conservandose en la oscuridad.

El fundamento de la prueba se basa en el hecho de que algunas bacterias desaminan e hidrolizan el triptofano hasta el estado de indol, este en presencia del reactivo citado dà un color rojo que se pone de manifiesto en forma de anillo en la superficie del medio. Si esto no ocurre, prueba negativa,

el anillo que se observa es del color propio del reactivo.

13.- ROJO DE METILO (M)

Se utilizò el medio de Clark y Lubs con la siguiente composiciòn:

| | |
|--------------------------|----------|
| Peptona tripsica | 5 g. |
| Fosfato bipotàsico | 5 g. |
| Glucosa | 5 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Se disuelve por calor, ajustandose el pH a 6'9 y repartiendose 1y 2 cc por tubo. Esterilizaciòn en autoclave a 120° C, 15 minutos.

Para la prueba que nos ocupa, se emplearon los 2 cc y tras la siembra e incubaciòn a 37° C, 24 horas se añaden una o dos gotas de una soluciòn al 0'5% de rojo de metilo en alcohol de 60°.

Esta reacciòn pone de manifiesto la formaciòn de àcido acético (aerobiosis) o àcido acético y fòrmico (anaerobiosis) a partir del àcido pirùvico, lo que determina un descenso de pH que cuando es igual o inferior a 4'5 al añadir la soluciòn de rojo de metilo todo el medio se pone de color rojo franco (prueba positiva). Cualquier otra gama de coloraciòn expresa negatividad.

14.- VOGES-PROSKAUER. (V).

Se utilizò el medio de Clark y Lubs en tubos de 1 cc, empleando dos por microorganismo. Tras la siembra se incuban a 37° C durante 24 y 48 horas, añadiendose posteriormente 0'5 ml. de una solución de alfa-naftol (al 6% en alcohol de 90° conservado en oscuridad) y 0'5 ml. de potasa al 16% en agua destilada. Se agitan los tubos en presencia de aire y la llama para aumentar la rapidez de la reacción.

La prueba detecta la presencia de acetoina o acetil metilcarbinol, producto intermedio en la formación de 2-3 butilea-glicol. Si el microorganismo en la degradación de la glucosa sigue esta via, el alfa-naftol con la acetoina y en presencia de aire y potasa dà lugar a diacetilo que reaccionando con un derivado de la peptona conteniendo un resto guanídico origina un compuesto rojo (prueba positiva). La no aparición de esta coloración indica negatividad.

15.- CITRATO DE SIMMONS (C).

Se utilizò el producto comercializado - BBL 11620 con la siguiente composición:

| | |
|---------------------------|------|
| Fosfato monoamónico | 1 g. |
| Fosfato bipotásico | 1 g. |
| Cloruro sódico | 2 g. |
| Citrato sódico | 2 g. |

| | |
|--------------------------|---------|
| Sulfato magnésico | 0'2 g. |
| Azul de bromotimol | 0'08 g. |
| Agar | 15 g. |

Se suspenden 24'2 gramos en 1000 ml de agua destilada, disolviéndose por calor. Se ajusta el pH a 6'9-7'1 (color verde), repartiéndose 4 cc por tubos de 14 X 130 y - esterilizándose al autoclave a 120° C, durante 15 minutos. Se conservan a 4° C cuando van a emplearse se licuan al baño-maria, de jándose solidificar inclinados.

La siembra se efectúa en superficie y tras incubación a 37° C, 24 horas, se procede a efectuar la lectura. La prueba se considera positiva cuando hay viraje al azul, lo que indica que el microorganismo en cuestión utiliza el citrato sódico como única fuente de carbono. El consumo de la sal amónica, - fuente de nitrógeno, al desarrollarse el microorganismo determina la formación de amoníaco y alcalinización consecutiva, apareciendo el citado color azul.

16.- MALONATO DE SODIO

Se empleó el medio comercializado por - Difco (0569) cuya composición es la siguiente:

| | |
|----------------------------|--------|
| Extracto de levadura | 1 g. |
| Sulfato amónico | 2 g. |
| Fosfato dipotásico | 0'6 g. |

| | |
|----------------------------|-----------|
| Fosfato monopotásico | 0'4 g. |
| Cloruro sódico | 2 g. |
| Malonato sódico | 3 g. |
| Glucosa | 0'25 g. |
| Azul de bromotimol | 0'0 25 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Se disuelve por calor, ajustandose el pH a 6'7 (color verdoso). Se reparten 3 cc en tubos de 14 X 130, es terilizandose 15 minutos a 120° C.

Tras la siembra, se incuban a 37° C durante 48 horas, con lectura cada 24 horas. En esta prueba la princi pal fuente de carbono está constituida por el malonato sódico y la de nitrógeno por el sulfato amónico. El fundamento de la reac ción es similar a lo que ocurría con el citrato de Simmons, la alcalinidad proviene en este caso del hidróxido sódico.

17.- UREASA.

Se empleó el preparado comercializado por Difco denominado "Bacto-Urea Broth Concentrate 10X". Se tomaron 10 ml. disolviendose en 90 ml. de agua destilada fría y estéril, repartiendose 3 cc por tubos de 14 X 130.

Se realizó una siembra intensa, incubando se a 37° C, con revisiones cada 12 horas durante tres días. Los microorganismos dotados de ureasa hidrolizan la urea en CO₂ y

2NH₃, estos compuestos en presencia de agua determinan la formación de carbonato amónico, alcalinización del medio y aparición de un color rojo púrpura por viraje del indicador rojo fenol (prueba positiva).

18.- GELATINASA

Se han seguido dos técnicas simultáneas:

a). Procedimiento de la película de Le Minor y Piéchaud. Se inculó abundantemente 1 cc de solución salina isotónica en tubos de 10 X 100 donde se introduce un trozo de película velada y esterilizada por un pase rápido sobre la llama de un Dunsen. La incubación se hizo a 22° C, no dándose como negativa hasta 21 días. Si el microorganismo posee una gelatinasa la película se decolora apareciendo un sedimento negro.

b). Método de la gelatina nutritiva. Se realizó haciendo una siembra abundante en la gelatina nutritiva e incubando a 22° C. durante varios días, hasta un máximo de 5. La positividad viene indicada por una licuación del medio y la negatividad por la persistencia de la solidez del mismo.

19-21.- LISINA-DECARBOXILASA (L.D.C.), ARGININA-DESHIDROLASA (A.D.) y ORNITINA-DECARBOXILASA (O.D.C.)

Se ha utilizado el medio Møller comercializado por bio-Mérieux (5-109 2) cuya composición es como sigue:

bio-Thione 5 g.

Extracto de carne de buey 5 g.
Púrpura de bromocresol 0'01 g.
Rojo cresol 0'005 g.
Glucosa 0'5 g.
Pirodoxal 0'005 g.

Disolver 10'5 gramos en un litro de agua destilada, ajustando el pH a 6 y dividiendo en cuatro lotes:

- 1) Adicionando L-lisina al 1%
- 2) Adicionando L-arginina al 1%
- 3) Adicionando L-ornitina al 1%
- 4) Testigo sin aminoácidos.

Se vuelve a ajustar el pH a 6 y cada uno de los lotes se reparte a razón de 3 ml. por tubo de 14X 130, esterilizandose al autoclave a 120° C durante 10 minutos, procediendo a marcarlos con L-A-0 y T (testigo).

Tras la siembra, los tubos se cubren con una película de parafina estéril y se incuban a 37° C, efectuandose lecturas cada 24 horas durante 4 días. La positividad de las pruebas viene indicada por la aparición de una coloración violeta o rojo-violeta (pH superior a 8'3) y la negatividad por un color amarillo o ligeramente violáceo (pH inferior a 8'3). El tubo utilizado como testigo deberá observarse igual que en el caso de una prueba negativa.

El principio de estas lecturas es el siguiente: En un primer tiempo los microorganismos fermentan la glucosa y el medio se acidifica. En un segundo tiempo los enzimas activos sobre los aminoácidos mencionados, enzimas cuya acción se vé favorecida por ese pH ácido, forman sustancias de índole alcalina como putrescina de la ornitina y cadaverina de la lisina, - mientras que de la arginina no está clara la forma de su degradación, pues no siempre tiene que responder al sistema arginina-dehidrolasa sino otras vías que rinden catabolitos alcalinos.

22.- O.N.P.G.

Se utilizaron discos con ortonitrofenil-beta D-galactopiranosido (bio-Mérieux 5-5601) que se colocaron en tubos de 14 X 130 con 2 cc de solución salina isotónica estèril inoculados abundantemente con los microorganismos problemas. La incubación se hizo a 37° C durante 24 horas y la positividad se detectó por la aparición de una coloración amarilla en el medio.

La O.N.P.G. se hidroliza como la lactosa por la beta-galactosidasa que libera, a partir de esta sustancia incolora, ortonitrofenol de color amarillento. La molécula O.N.P.G. más pequeña que la lactosa penetra más fácilmente que ésta en la bacteria, de esta forma microorganismos que carecen de permeasa podran incorporar esta sustancia y metabolizarla, poniendo de

manifiesto aquellos microorganismos que en un principio se consi
deran como lactosa negativos o tardíos por falta precisamente de
permeasa y no de beta-galactosidasa.

23.- FENIL ALANINA DESAMINASA (F.A.D.)

El medio empleado fué el comercializado
por BBL (11536) cuya fórmula es la siguiente:

| | |
|----------------------------|-------|
| DL-fenilalanina | 2 g. |
| Extracto de levadura | 3 g. |
| Cloruro sódico | 5 g. |
| Fosfato sódico | 1 g. |
| Agar | 12 g. |

Se disuelven 23 gramos en un litro de
agua destilada, se ajusta el pH a 7'2 y repartiéndose en tubos de
14 X 130 a razón de 3 ml. La esterilización se efectua en autocla
ve a 120° C durante 20 minutos, dejándose solidificar en posición
inclinada.

Se efectua la siembra en superficie en
dos tubos, uno se incuba a 27° C (despistaje de Erwinia herbico-
la var. herbicola) y el otro a 37° C durante 48 horas. Se añaden
unas gotas de cloruro férrico al 10% en solución acuosa y se efec
tua la lectura. La aparición de una coloración verde oscura (prue
ba positiva) indica la formación de fenil pirúvico que con el clo
ruro férrico da el citado tinte.

24.- DNasa.

Se ha empleado el medio comercializado por bio-Mèrieux (5-174 1) cuya composición es como sigue:

| | |
|----------------------|-------|
| D.N.A. | 2 g. |
| bio-Trypcase | 15 g. |
| bio-soja | 5 g. |
| Cloruro sódico | 5 g. |
| Agar | 15 g. |

Se disuelven 42 gramos del producto en polvo en un litro de agua destilada, se ajusta el pH a 7'3 esterilizándose en el autoclave a 120° C. durante 15 minutos. El medio se coloca en placas Petri de 100 mm. se deja solidificar y se conserva a 4° C.

La siembra se efectua en estría y tras una incubación, en nuestro caso, a 37° C. durante 24 horas se efectua la lectura inundando la placa con una solución normal de ácido clorhídrico y colocandolas sobre un fondo oscuro. La presencia de una DNasa se traduce por una zona clara alrededor del cultivo, mientras que el resto aparece opaco ya que el DNA es precipitado por el ácido salvo en aquellas zonas donde es hidrolizado.

25-26.- SORBITOL y SACAROSA

Se estudiaron sobre caldo base con rojo

fenol (Difco 0992) con la siguiente composición:

| | | |
|-----------------------------|-------|----|
| Extracto de carne | 1 | g. |
| Proteosa peptona nº 3 | 10 | g. |
| Cloruro sódico | 5 | g. |
| Rojo fenol | 0'018 | g. |

16 gramos se suspenden en 1.000 ml. de agua, disolviéndose por calor y ajustando el pH a 7'6. El medio se coloca en tubos de 14 X 130 a razón de 3 ml. y se esterilizan a 120° C. durante 15 minutos.

Tanto el sorbitol y la sacarosa se prepararon al 50% en agua destilada, se disuelven y se esterilizan por filtración. Para conseguir la concentración final del 1% se añaden por tubo 0'06 cc del polialcohol y el disacárido.

La siembra se hace abundantemente y la incubación se realiza a 37° C, prolongándose hasta los 21 días para considerar las pruebas como negativas. La positividad viene indicada por la aparición de una coloración amarilla, expresión de la acidificación consiguiente a la utilización del sustrato utilizado.

Hemos preferido no incluir en este apartado exhaustivas referencias bibliográficas, ya que lo que aquí hemos indicado puede encontrarse en cualquier libro de técnicas bacteriológicas. Señalemos, sin embargo, lo útil que nos han si-

do los Manuales de Difco (116), BBL (117) y bio-Mérieux (118) - así como las notas recogidas de los libros de COWAN y STEEL (119) LE MINOR (120), EDWARDS y EWING (121) y MAC FADDIN (122).

No siguiendo el orden general, propuesto para nuestro trabajo hemos incluido al final de este apartado los resultados del estudio bioquímico-morfológico (cuadro 27).

La marcha seguida en nuestra investigación ha sido la siguiente: Durante los meses de Diciembre de 1980; Enero y Febrero de 1981 hemos recogido 80 cepas de K. pneumoniae aisladas en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico San Cecilio. Estas cepas eran identificadas por nosotros para asegurar el diagnóstico mediante el empleo de pruebas de uso no rutinario. En los cuadros 28, 29 y 30 se recogen una serie de datos referidos a las citadas cepas tales como número de colección, especie, procedencia, clínicas de origen, etc. A estos microorganismos se les realizó, como luego veremos la antibioticotipia y la biotipia que sirvieron como prueba para comprobar la efectividad del esquema que proponemos.

En un segundo estudio se comprobó la eficacia epidemiológica de la antibioticotipia de K. pneumoniae según el esquema citado y su relación con la biotipia. Para ello cuando en un producto patológico durante los meses de Marzo, Abril y Mayo de 1981 se aislaba K. pneumoniae, tras una nueva --

identificación por nosotros según las pautas ya indicadas se pasaba a solicitar a las diversas clínicas muestras de faringe y heces de todos los enfermos investigando también la presencia de K. pneumoniae y para comprobar el origen endógeno o exógeno de estas infecciones tras la aplicación de los marcadores epidemiológicos. En total se hizo el estudio en 30 casos; el origen de estas cepas, así como los grupos a los que pertenecían puede observarse en el cuadro 31. En el mismo también se indica la clínica de procedencia, el caso, el número de la cepa y los productos donde se aislaba K. pneumoniae. En el cuadro siguiente se resume el origen de las cepas en los productos originales y los grupos de K. pneumoniae a que pertenecen dichas cepas.

CUADRO 26

CRITERIOS DE IDENTIFICACION BIOQUIMICA-MORFOLOGICA DEL
GENERO KLEBSIELLA

1- PRUEBAS ESPECIFICAS DE FAMILIA

Bacilos Gram - Nitratos +

Catalasa + Oxidasa -

O/F +/+

2- PRUEBAS ESPECIFICAS DE TRIBU

F. A. D. -

SH₂ en K.I.A. -

3- PRUEBAS ESPECIFICAS DE GENERO

Movilidad - Sorbitol +

A. D. H. - DNasa -

O. D. C. -

4- PRUEBAS DIFERENCIALES ENTRE ESPECIES DEL GENERO

| | <u>K. pneumoniae</u> | | | | D | K. rhinoscl. | K. ozaenae |
|-----------------|----------------------|--------|---|---|----|--------------|------------|
| | A | B | C | | | | |
| | oxyt. | indol. | | | | | |
| Indol | - | + | + | - | V | - | - |
| R.M. | - | - | - | + | V | + | + |
| V.P. | + | + | + | - | V | - | - |
| Citrato Simmons | + | + | + | + | V | - | V |
| Malonato | + | + | + | + | V+ | + | - |
| Ureasa | + | + | + | + | + | - | V |

CUADRO 26 (continuación)

| | <u>K. pneumoniae</u> | | | | K. rhinoscl. | K. ozaenae |
|------------|----------------------|-------------|----|----|--------------|------------|
| | A oxyt. | B indol. | C | D | | |
| Gelatinasa | - | + | - | - | V | - |
| O.N.P.G. | + | + | + | + | + | - |
| L.D.C. | + | + | + | + | + | - |
| KLIGLER | | | | | | |
| V/V/- | Si | Si | Si | Si | Si | V |
| +/+/- | V | V | V | V | V | Si |

5- PRUEBAS DIFERENCIALES CON OTRAS ESPECIES INMOVILES DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE

| | ONPG | F.A.D. | L.A.O. | Sacarosa |
|--------------------------|------|--------|--------|----------|
| Shigella spp. | - | - | - V V | - |
| Shigella sonnei | + | - | - - + | + |
| Shigella dysenteriae 1 | + | - | - - - | - |
| Erwinia herb. var. herb. | V | + | - - - | V |
| Y. pesti | + | - | - - - | - |
| Y. enterocolitica | + | - | - - + | + |
| Y. pseudotuberculosis | + | - | - - - | - |
| K. pneumoniae | + | - | + - - | + |
| K. ozaenae | + | - | V - - | + |
| K. rhinoscleromatis | + | - | - - - | + |

+ : Prueba positiva

- : Prueba negativa

V : Prueba variable

V+ : Prueba variable generalmente positiva

Si : Kligler con esas características.

CUADRO 27

RESULTADOS DEL ESTUDIO BIOQUIMICO-MORFOLOGICO SOBRE 160 CEPAS
DE KLEBSIELLA

| | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Bacilos (Gram) | - | - | - | - | - | - | - |
| Catalasa | + | + | + | + | + | + | + |
| O/F | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ | + /+ |
| Nitratos | + | + | + | + | + | + | + |
| Oxidasa | - | - | - | - | - | - | - |
| F.A.D. | - | - | - | - | - | - | - |
| SH ₂ Kligler | - | - | - | - | - | - | - |
| Gas Kligler | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactosa Kligler | - | + | - | - | + | + | + |
| Movilidad | - | - | - | - | - | - | - |
| A.D.H. | - | - | - | - | - | - | - |
| O.D.C. | - | - | - | - | - | - | - |
| Sorbitol | + | + | + | + | + | + | + |
| D.Nasa | - | - | - | - | - | - | - |
| Indol | - | - | + | + | - | + | - |
| R.M. | - | - | - | - | + | + | + |
| V.P. | + | + | + | + | - | + | + |
| Citrato Simmons | + | + | + | + | + | + | + |
| Malonato | + | + | + | + | + | + | + |
| Ureasa | + | + | + | + | + | + | + |
| Gelatinasa | - | - | + | - | - | + | - |
| O.N.P.G. | + | + | + | + | + | + | + |
| L.D.C. | + | + | + | + | + | + | + |
| Sacarosa | + | + | + | + | + | + | + |
| CEPAS | 100 | 32 | 7 | 10 | 4 | 2 | 5 |

CUADRO 27 (continuación)

| | | |
|-------|-------|---|
| 1 y 2 | ----- | K. pneumonias A. Total de cepas 132 |
| 3 | ----- | K. pneumonias B oxytoca. Total de cepas 7 |
| 4 | ----- | K. pneumonias B indoligena. Total de cepas 10 |
| 5 | ----- | K. pneumonias C. Total de cepas 4 |
| 6 y 7 | ----- | K. pneumonias D. Total de cepas 7 |

CUADRO 28

ORIGEN DE LAS CEPAS ESTUDIADAS (mes de Diciembre)

| <u>Número</u> | <u>Especie</u> | <u>Procedencia</u> |
|---------------|-----------------|--------------------|
| 1 | K. pneumoniae C | esputo |
| 2 | K. pneumoniae A | orina |
| 3 | K. pneumoniae A | orina |
| 4 | K. pneumoniae A | orina |
| 5 | K. pneumoniae A | orina |
| 6 | K. pneumoniae B | orina |
| 7 | K. pneumoniae A | frotis faringeo |
| 8 | K. pneumoniae A | frotis faringeo |
| 9 | K. pneumoniae A | sonda |
| 10 | K. pneumoniae A | sangre |
| 11 | K. pneumoniae A | orina |
| 12 | K. pneumoniae A | orina |
| 13 | K. pneumoniae A | frotis faringeo |
| 14 | K. pneumoniae A | esputo |
| 15 | K. pneumoniae C | esputo |
| 16 | K. pneumoniae A | exudado umbilical |
| 17 | K. pneumoniae A | esputo |
| 18 | K. pneumoniae B | esputo |
| 19 | K. pneumoniae A | esputo |
| 20 | K. pneumoniae A | exudado herida |
| 21 | K. pneumoniae B | frotis faringeo |
| 22 | K. pneumoniae A | frotis faringeo |
| 23 | K. pneumoniae A | sangre |

CUADRO 28 (continuación)

ORIGEN DE LAS CEPAS ESTUDIADAS (mes de Enero)

| <u>Número</u> | <u>Especie</u> | <u>Procedencia</u> |
|---------------|-----------------|--------------------|
| 24 | K. pneumoniae A | loquios |
| 25 | K. pneumoniae B | sangre |
| 26 | K. pneumoniae A | esputo |
| 27 | K. pneumoniae A | orina |
| 28 | K. pneumoniae A | frotis faringeo |
| 29 | K. pneumoniae A | sonda |
| 30 | K. pneumoniae A | esputo |
| 31 | K. pneumoniae A | exudado herida |
| 32 | K. pneumoniae A | esputo |
| 33 | K. pneumoniae D | esputo |
| 34 | K. pneumoniae A | esputo |
| 35 | K. pneumoniae A | frotis prepucial |
| 36 | K. pneumoniae A | sonda |
| 37 | K. pneumoniae A | sonda |
| 38 | K. pneumoniae A | orina |
| 39 | K. pneumoniae A | orina |
| 40 | K. pneumoniae A | loquios |
| 41 | K. pneumoniae A | orina |
| 42 | K. pneumoniae D | sangre |
| 43 | K. pneumoniae A | esputo |
| 44 | K. pneumoniae A | sonda |
| 45 | K. pneumoniae A | sonda |
| 46 | K. pneumoniae A | orina |

CUADRO 28 (continuación)

| <u>Número</u> | <u>Especie</u> | <u>Procedencia</u> |
|---------------|-----------------|--------------------|
| 47 | K. pneumoniae A | frotis faringeo |
| 48 | K. pneumoniae A | exudado umbilical |
| 49 | K. pneumoniae A | orina |
| 50 | K. pneumoniae A | esputo |
| 51 | K. pneumoniae A | orina |
| 52 | K. pneumoniae A | loquios |
| 53 | K. pneumoniae B | sonda |
| 54 | K. pneumoniae A | esputo |
| 55 | K. pneumoniae A | orina |

CUADRO 28 (continuación)

ORIGEN DE LAS CEPAS ESTUDIADAS (mes de Febrero)

| <u>Número</u> | <u>Especie</u> | <u>Procedencia</u> |
|---------------|-----------------|--------------------|
| 56 | K. pneumoniae B | cánula |
| 57 | K. pneumoniae A | esputo |
| 58 | K. pneumoniae A | loquios |
| 59 | K. pneumoniae A | loquios |
| 60 | K. pneumoniae A | orina |
| 61 | K. pneumoniae A | esputo |
| 62 | K. pneumoniae A | esputo |
| 63 | K. pneumoniae A | esputo |
| 64 | K. pneumoniae A | orina |
| 65 | K. pneumoniae A | orina |
| 66 | K. pneumoniae A | esputo |
| 67 | K. pneumoniae A | exudados nasales |
| 68 | K. pneumoniae D | esputo |
| 69 | K. pneumoniae B | sonda |
| 70 | K. pneumoniae A | esputo |
| 71 | K. pneumoniae B | cánula |
| 72 | K. pneumoniae A | LCR |
| 73 | K. pneumoniae A | orina |
| 74 | K. pneumoniae A | orina |
| 75 | K. pneumoniae A | sonda |
| 76 | K. pneumoniae D | esputo |
| 77 | K. pneumoniae A | orina |
| 78 | K. pneumoniae B | esputo |
| 79 | K. pneumoniae A | orina |
| 80 | K. pneumoniae A | orina |

CUADRO 29

RESUMEN SEGUN PROCEDENCIA DE CEPAS ESTUDIADAS

| Muestra | <u>Especie</u> | | | |
|-------------------|----------------|----------|----------|----------|
| | K. pn. A | K. pn. B | K. pn. C | K. pn. D |
| Orina | 22 | 1 | - | - |
| Sonda | 7 | 2 | - | - |
| Espuito | 16 | 2 | 2 | 3 |
| Sangre | 2 | 1 | - | 1 |
| Frotis faringeo | 6 | 1 | - | - |
| Exudado umbilical | 2 | - | - | - |
| Exudado herida | 2 | - | - | - |
| Loquios | 5 | - | - | - |
| Frotis prepucial | 1 | - | - | - |
| Cánula | - | 2 | - | - |
| LCR | 1 | - | - | - |
| Exudados nasales | 1 | - | - | - |

CUADRO 30

DISTRIBUCION DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR CLINICAS

| Clinica | <u>Especie</u> | | | |
|-------------------|----------------|----------|----------|----------|
| | K. pn. A | K. pn. B | K. pn. C | K. pn. D |
| Patologia general | 1 | 2 | - | 1 |
| Médica II | 8 | - | - | - |
| Médica I | 6 | 2 | - | - |
| Obstetricia | 11 | - | - | - |
| Quirúrgica I | 1 | - | - | - |
| Quirúrgica II | 6 | 3 | - | - |
| Urologia | 4 | - | - | - |
| O.R.L. | 2 | - | - | - |
| Psiquiatria | 1 | - | - | - |
| Nefrologia | - | 1 | - | - |
| U.V.I. | 9 | 1 | 2 | 3 |
| Pediatria | 16 | - | - | - |

CUADRO 31

CEPAS ESTUDIADAS. KLEBSIELLA AISLADAS EN PRODUCTOS. PROCEDENCIA.
APLICACION EPIDEMIOLOGICA

| Caso nº | Cepa nº | Especie | Producto | Clinica |
|---------|---------|---------|---------------|-------------|
| 1 | 1 | B | Ex. ocular | Prematuros |
| | 2 | B | Ex. oido | Prematuros |
| | 3 | B | Ex. faringeo | Prematuros |
| | 4 | B | Ex. umbilical | Prematuros |
| 2 | 5 | A | Ex. faringeo | O.R.L. |
| 3 | 6 | A | Ex. traqueal | U.V.I. |
| | 7 | A | Heces | U.V.I. |
| 4 | 8 | A | Ex. ocular | Prematuros |
| | 9 | A | Ex. oido | Prematuros |
| | 10 | A | Heces | Prematuros |
| | 11 | A | Heces 1 | Prematuros |
| | 12 | A | Heces 2 | Prematuros |
| | 13 | A | Ex. umbilical | Prematuros |
| 5 | 14 | A | Orina | U.V.I. |
| | 15 | A | Heces | U.V.I. |
| 6 | 16 | A | Orina | R.N.P. |
| | 17 | A | Ex. faringeo | R.N.P. |
| | 18 | A | Heces | R.N.P. |
| 7 | 19 | C | Ex. faringeo | Lactantes |
| 8 | 20 | A | Orina | R.N.P. |
| 9 | 21 | A | Orina | Obstetricia |
| 10 | 22 | A | Ex. faringeo | O.R.L. |

CUADRO 31 (continuación)

| <u>Caso nº</u> | <u>Copa nº</u> | <u>Especie</u> | <u>Producto</u> | <u>Clínica</u> |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|
| 11 | 23 | A | Orina | P. general |
| | 24 | A | Heces | P. general |
| | 25 | A | Heces 1 | P. general |
| | 26 | A | Heces 2 | P. general |
| 12 | 27 | A | Orina | P. general |
| 13 | 28 | A | Ex. ocular | Prematuros |
| | 29 | A | Ex. faringeo | Prematuros |
| | 30 | A | Heces | Prematuros |
| | 31 | A | Heces 1 | Prematuros |
| 14 | 32 | C | Ex. faringeo | Lactantes |
| 15 | 33 | A | Catéter | R.N.P. |
| | 34 | A | Ex. faringeo | R.N.P. |
| | 35 | A | Heces | R.N.P. |
| | 36 | A | Heces 1 | R.N.P. |
| | 37 | A | Heces 2 | R.N.P. |
| 16 | 38 | A | Sonda | R.N.P. |
| | 39 | A | Heces | R.N.P. |
| 17 | 40 | A | Ex. quemadura | Escolares |
| 18 | 41 | A | Ex. vaginal | Obstetricia |
| | 42 | A | Heces | Obstetricia |
| 19 | 43 | B | Espujo | Médica I |
| | 44 | B | Espujo (bis) | Médica I |
| | 45 | B | Heces | Médica I |
| | 46 | B | Ex. faringeo | Médica I |

CUADRO 31 (continuación)

| Caso nº | Cepa nº | Especie | Producto | Clínica |
|---------|---------|---------|-----------------------|---------------|
| 20 | 47 | A | Orina | U.V.I. |
| | 48 | A | Heces | U.V.I. |
| | 49 | A | Ex. faringeo | U.V.I. |
| 21 | 50 | A | Catéter | Urología |
| | 51 | A | Sonda | Urología |
| | 52 | A | Heces | Urología |
| | 53 | A | Heces 1 | Urología |
| 22 | 54 | A | Espuito | Médica I |
| | 55 | A | Heces | Médica I |
| | 56 | A | Espuito (bis) | Médica I |
| | 57 | A | Ex. faringeo | Médica I |
| | 58 | A | Ex. faringeo (bis) | Médica I |
| 23 | 59 | A | Ex. herida | Quirúrgica II |
| | 60 | A | Heces | Quirúrgica II |
| | 61 | A | Ex. faringeo | Quirúrgica II |
| | 62 | A | Espuito | Quirúrgica II |
| 24 | 63 | A | Sonda | U.V.I. |
| | 64 | A | Ex. faringeo | U.V.I. |
| | 65 | A | Heces | U.V.I. |
| | 66 | A | Catéter | U.V.I. |
| 25 | 67 | A | Orina | Reumatología |
| | 68 | A | Heces | Reumatología |
| 26 | 69 | A | Sonda | Médica II |
| | 70 | A | Heces | Médica II |
| | 71 | A | Orina | Médica II |

CUADRO 31 (continuación)

| Caso nº | Cepa nº | Especie | Producto | Clínica |
|---------|---------|---------|--------------|--------------|
| 27 | 72 | A | Orina | U.V.I. |
| | 73 | A | Heces | U.V.I. |
| 28 | 74 | A | Espuito | Médica I |
| | 75 | A | Heces | Médica I |
| | 76 | A | Ex. faringeo | Médica I |
| 29 | 77 | A | Heces | Reumatología |
| 30 | 78 | D | Espuito | P. general |
| | 79 | D | Orina | P. general |
| | 80 | D | Heces | P. general |

Las cepas originales figuran en el primer lugar de cada caso

A = *Klebsiella pneumoniae* A

B = *Klebsiella pneumoniae* B

C = *Klebsiella pneumoniae* C

D = *Klebsiella pneumoniae* D

bis = Repetición de muestra

Heces = Primera muestra

Heces 1 = Segunda muestra

Heces 2 = Tercera muestra

CUADRO 32

ORIGEN DE LAS CEPAS DE LOS PRODUCTOS ORIGINALES. APLICACION
EPIDEMIOLOGICA

| Productos originales | <u>Especie</u> | | | |
|----------------------|----------------|---|---|---|
| | A | P | C | D |
| Ex. faringeo | 2 | - | 2 | - |
| Ex. traqueal | 1 | - | - | - |
| Ex. ocular | 2 | 1 | - | - |
| Orina | 9 | - | - | - |
| Cateter | 2 | - | - | - |
| Sonda | 3 | - | - | - |
| Ex. quemadura | 1 | - | - | - |
| Ex. vaginal | 1 | - | - | - |
| Heces | 1 | - | - | - |
| Espujo | 2 | 1 | - | 1 |
| Ex. herida | 1 | - | - | - |
| TOTAL | 25 | 2 | 2 | 1 |

3-1-2. BIOTIPIA

Hemos tipado las 160 cepas, anteriormente citadas, mediante el esquema de LIEBANA (123), para ello tomamos los microorganismos de la gelatina nutritiva líquida a 37° C, 4 horas, e inoculamos abundantemente una placa de Petri de 100 mm. de diámetro conteniendo 20 ml. de agar nutritivo, incubamos a 37° C durante 24 horas y a partir de la masa microbiana realizamos una siembra abundante de los cuatro medios diferenciales.

1.- Dulcitol

Se prepara una solución madre al 5% con agua destilada (124), se esteriliza por filtración, añadiendo 0'6 cc a 3 ml. de caldo base con fojo fenol. La positividad viene indicada por un viraje al color amarillo, no dándose la prueba como negativa hasta transcurrido 21 días a 37° C.

2.- Sorbosa

Se utiliza una solución madre al 40% en agua destilada (125) que se esteriliza por filtración. Se añaden 0'075 cc a 3 ml. de caldo base con rojo fenol y la lectura e interpretación se hacen como en el caso anterior.

3.- d-Tartrato

Hemos empleado el medio de KAUFFMANN y PETERSON, modificado por ELLIS y cols (126) y constituido por:

| | |
|----------------------------------|----------|
| Bactopeptona | 10 g. |
| Azul de bromotimol 1/500 * | 12 g. |
| Tartrato sódico potásico | 10 g. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

Ajustado el pH a 7'4 con sosa 5N, se reparten a razón de 3 ml. por tubos de 13 X 100 y esterilizando en el autoclave a 120° C durante 15 minutos.

| | |
|----------------------------|---------|
| * Azul de bromotimol | 1 g. |
| Na OH N/10 | 25 ml. |
| Agua destilada | 4/5 ml. |

Tras la siembra y una incubación de 24 horas a 37° C, se añade 0'5 ml. de una solución saturada de acetato de plomo. Igual debe hacerse con un testigo sin sembrar. La positividad viene indicada por una disminución (la mitad) del precipitado blanco en relación con lo observado en el tubo control, debido al consumo de la sustancia en cuestión con la que el acetato de plomo forma el citado precipitado.

4.- Citrato sódico

El medio base es el mismo que en la prueba del d-tartrato, sustituyendo tartrato sódico potásico por citrato sódico en la misma proporción, esto es 10 gramos por 1.000 ml de agua destilada. La siembra, lectura e interpretación se hace también de igual forma que en el caso del d-tartrato (127).

3-1-3. ANTIBIOTICOTIPIA

Tras los estudios de LIEBANA y citados hemos seleccionado 4 antimicrobianos que mostrasen una actividad variable sobre K. pneumoniae, estas sustancias han sido: carbenicilina, cloranfenicol, estreptomina y tetraciclina. A estos hemos añadido un quinto la paromomicina que nuestra experiencia personal nos revelaba una actividad similar a los anteriores.

Para realizar la antibioticotipia hemos utilizado la técnica disco-placa que comprende los siguientes apartados:

1- Preparación del medio de cultivo.

Se empleó Møller-Hinton a partir del producto deshidratado (Difco 0252).

| | |
|---------------------------------|---------|
| Infusión de carne de buey | 300 g. |
| Aminoácidos de caseína | 17'5 g. |
| Almidón | 1'5 g. |
| Agar | 17 g. |
| Agua destilada | 1000 g. |

Se ajusta el pH a 7'4, repartiéndose 28 cc por tubos de 20 X 200. Se esteriliza en autoclave a 116-120°C. durante 10 minutos, conservándose en nevera a 4°C. En el momento de su utilización se funde a baño-maría y una vez licuado el contenido se vierte en placas de Petri de 140 mm. de diámetro dejándose endurecer y no debiendo sobrepasar la capa de agar los 5 mm de espesor.

2.- Preparación del inóculo

Se utilizaron concentraciones de 10^5 microorganismos/cc. Esta concentración se alcanzó a partir de cultivos de 18 horas en agar nutritivo, inocuados desde el medio de conservación licuado y realizándose una suspensión en solución salina isotónica al 0.9%, la cual se mide y controla con un fotocolorímetro (Eppendorf 1101 M) en el que se alcanzan 10^9 microorganismos cuando la longitud de onda es de 256 con un filtro rojo de 623 mm. A partir de esta concentración se diluyó al 1/10.000 para alcanzar 10^5 , se eligió este sistema, más complicado ya que en el apartado de que disponíamos cifras más bajas originaban importantes errores. En algunos momentos, se realizaron controles mediante siembra en agar-recuento con el fin de comprobar el sistema de medición y dilución.

3.- Técnica de la prueba.

Sobre la superficie del agar se inocularon 3 cc de la suspensión, repartiéndola homogéneamente. Se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur, secándose las placas a 37° C. durante 15 minutos. Tras esto se procedió a la colocación de los discos presionando ligeramente con pinzas estériles.

Una vez colocados los discos se incuban las placas a 37° C durante 24 horas. Es importante poner entre el medio y la tapa de cada placa un papel de filtro estéril que absor

be el vapor de condensación para evitar que se alteren los resultados.

4.- Lectura de los resultados.

Tras la incubación indicada se efectúa la lectura de los resultados calificando los microorganismos en el espectro de sensibilidad máxima (S ó 2), sensibilidad moderada (SM ó 1) y resistencia (R ó 0), según la tabla que puede observarse en el cuadro 33.

Las 160 cepas se enfrentaron a los 5 antimicrobianos ya indicados y se realizó un esquema de antibioticotipia tal como puede observarse en el cuadro 34. Un primer grupo comprendió a carbenicilina y cloranficol tras su enfrentamiento a la cepa problema se pueden obtener 4 formas diferentes de actuación que hemos denominado A, B, C y D. En un segundo grupo hemos incluido a paromomicina, estreptomomicina y tetraciclina con lo que pueden obtenerse 8 modelos de actuación denominados con números arábigos del 1 al 8.

El signo + indica que la cepa en ensayo es sensible al antimicrobiano de prueba bien con sensibilidad moderada o intermedia. El signo - indica resistencia.

Aplicando ambos grupos el antibioticotipo viene expresado por una letra y un número, así por ejemplo A/1,

indica una cepa sensible a carbenicila y cloranfenicol (A) y sensible a paromomicina, estreptomicina y tetraciclina (1).

CUADRO 33

TABLA PARA LA INTERPRETACION DE LAS MEDIDAS DE LAS ZONAS DE INHIBICION

| Antimicrobiano | Potencia del disco | Diámetro del halo de inhibicion en mm | | |
|----------------|--------------------|---------------------------------------|-------|------------|
| | | S | SM | R |
| Carbenicilina | 100 mcg. | 22 ó más | 16-21 | 15 ó menos |
| Cloranfenicol | 30 mcg. | 18 ó más | 13-17 | 12 ó menos |
| Paramomicina | 30 mcg. | 21 ó más | 11-20 | 10 ó menos |
| Estreptomcina | 30 mcg. | 22 ó más | 12-21 | 11 ó menos |
| Tetraciclina | 30 mcg. | 19 ó más | 15-18 | 14 ó menos |

CUADRO 34

ESQUEMA UTILIZADO DE ANTIBIOTICOTIPIA

| <u>Grupo 1</u> | <u>A</u> | <u>B</u> | <u>C</u> | <u>D</u> |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|
| Carbenicilina (Cb) | + | + | - | - |
| Cloranfenicol (C) | + | - | + | - |

| <u>Grupo 2</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> | <u>6</u> | <u>7</u> | <u>8</u> |
|--------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Paromomicina (PAR) | + | + | + | - | - | - | - | + |
| Estreptomicina (S) | + | + | - | + | - | - | + | - |
| Tetraciclina (Te) | + | - | + | + | + | - | - | - |

+ : Cepa sensible o medianamente sensible

- : Cepa resistente

3-2. PARTE SEGUNDA. RESULTADOS

En el cuadro 35 puede observarse los biotipos de cada una de las primeras 80 cepas estudiadas. En el cuadro 36 se indican los biotipos obtenidos por grupos o especies de K. pneumoniae en este grupo de microorganismos. En los cuadros siguientes 37, 38 y 39 se expresa la distribución de estos biotipos por clínicas, productos patológicos y meses en el periodo en estudio respectivamente. En el cuadro 40 se resume todo lo anterior indicando la distribución de los biotipos por meses, clínicas y productos patológicos.

Los resultados de la aplicación de la antibiotoxicotipia en estas primeras 80 cepas y siguiendo las mismas pautas que para la biotipia se observan en los cuadros siguientes. En el 41, los antibiotoxicotipos de cada microorganismo ensayado; en el 42, la distribución por especies; en el 43 la distribución por clínicas; en el 44 la distribución por productos patológicos; en el 45 la distribución por meses y en el 46 el resumen de la distribución por meses, clínicas y productos patológicos.

En los cuadros 47, 48 y 49 puede observarse la relación obtenida entre los biotipos y antibiotoxicotipos en estas primeras 80 cepas estudiadas.

Una vez indicados los resultados obtenidos en estas 80 cepas que como dijimos vienen a ser las de prueba para investigaciones posteriores pasamos a expresar los obtenidos en

el estudio epidemiológico realizado en 30 enfermos en los que en algún producto patológico se aisló K. pneumoniae. Así en los del cuadro 50 hacemos referencia a los biotipos obtenidos en los 30 casos no solo en los productos originales, sino también en otras localizaciones y en heces y/o faringe. En el cuadro 51 indicamos los biotipos obtenidos en los productos patológicos primitivos y que fueron objeto del envío de los mismos a nuestro laboratorio. En el cuadro 52 se observa la distribución de estos biotipos originales por las diversas clínicas en el periodo en estudio. En los cuadros 53 y 54, se indica la distribución de infecciones endógenas y/o exógenas, con la aplicación única de la biotipia.

En los cuadros siguientes se hace igual con los antibioticotipos, así en el 55 se indica caso a caso y cepa a cepa los antibioticotipos obtenidos en los 30 enfermos; en el 56 se observa la distribución de antibioticotipos por clínicas en los productos originales y en el 57 la distribución por productos primitivos. En los cuadros 58 y 59 hemos reflejado la tasa de infecciones endógenas y/o exógenas en estos 30 enfermos con la aplicación única de los antibioticotipos.

En los cuadros 60, 61 y 62 se observa la relación entre biotipia y antibioticotipia en los 30 casos estudiados en la investigación epidemiológica.

Por último en los cuadros 63 y 64 se reco

ge la distribución de infecciones endógenas y exógenas en los 30 enfermos mediante la aplicación conjunta de antibioticotipia y biotipia, lo que en definitiva reúne todo nuestro trabajo.

CUADRO 35

RESULTADO DE LA APLICACION DE LA BIOTIPIA

| <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> |
|-------------|----------------|-------------|----------------|
| 1 | Dd | 25 | Dd |
| 2 | Dc | 26 | c |
| 3 | Dh | 27 | Df |
| 4 | De | 28 | De |
| 5 | Da | 29 | d |
| 6 | Dc | 30 | c |
| 7 | h | 31 | e |
| 8 | Dc | 32 | f |
| 9 | Df | 33 | Dc |
| 10 | d | 34 | h |
| 11 | c | 35 | d |
| 12 | c | 36 | d |
| 13 | f | 37 | f |
| 14 | d | 38 | f |
| 15 | Da | 39 | f |
| 16 | f | 40 | d |
| 17 | g | 41 | c |
| 18 | Dc | 42 | Dc |
| 19 | c | 43 | f |
| 20 | b | 44 | c |
| 21 | c | 45 | a |
| 22 | b | 46 | f |
| 23 | b | 47 | e |
| 24 | Dd | 48 | c |

CUADRO 35 (continuación)

| <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> |
|-------------|----------------|-------------|----------------|
| 49 | d | 65 | d |
| 50 | c | 66 | d |
| 51 | f | 67 | d |
| 52 | d | 68 | d |
| 53 | c | 69 | d |
| 54 | h | 70 | h |
| 55 | Dc | 71 | d |
| 56 | c | 72 | h |
| 57 | d | 73 | Df |
| 58 | h | 74 | Da |
| 59 | h | 75 | Db |
| 60 | b | 76 | Da |
| 61 | d | 77 | Df |
| 62 | d | 78 | Da |
| 63 | d | 79 | Df |
| 64 | Dc | 80 | Dc |

CUADRO 36

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS POR ESPECIE DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE

| <u>Biotipo</u> | <u>Especie</u> | | | | | | | |
|----------------|----------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | <u>A</u> | | <u>B</u> | | <u>C</u> | | <u>D</u> | |
| | <u>Nº</u> | <u>%</u> | <u>Nº</u> | <u>%</u> | <u>Nº</u> | <u>%</u> | <u>Nº</u> | <u>%</u> |
| a | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| b | 4 | 6,1 | - | - | - | - | - | - |
| c | 9 | 13,8 | 3 | 33,3 | - | - | - | - |
| d | 15 | 23 | 2 | 22,2 | - | - | 1 | 25 |
| e | 2 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| f | 9 | 13,8 | - | - | - | - | - | - |
| g | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| h | 7 | 10,7 | - | - | - | - | - | - |
| Da | 2 | 3 | 1 | 11,1 | 1 | 50 | 1 | 25 |
| Db | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| Dc | 5 | 7,6 | 2 | 22,2 | - | - | 2 | 50 |
| Dd | 1 | 1,5 | 1 | 11,1 | 1 | 50 | - | - |
| De | 2 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| Df | 5 | 7,6 | - | - | - | - | - | - |
| Dh | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |

CUADRO 37

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS POR CLINICAS

| Biotipos | Clínicas | | | | | | | | | | | |
|------------|----------|-----|----|---|----|-----|---|--------|----|---|--------|---|
| | PG | MII | MI | O | QI | QII | U | O.R.L. | PS | N | U.V.I. | P |
| a (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| b (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | 1 |
| c (K.pn.A) | - | 3 | 2 | - | - | - | 2 | - | - | - | 1 | 1 |
| c (K.pn.B) | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | 1 | - |
| d (K.pn.A) | 1 | 1 | 3 | 2 | - | 2 | 2 | 1 | - | - | 2 | 1 |
| d (K.pn.B) | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - |
| d (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| e (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| f (K.pn.A) | - | 1 | - | 2 | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | 3 |
| g (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| h (K.pn.A) | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | 3 | 2 |
| Da(K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Da(K.pn.B) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Da(K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Da(K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Db(K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.A) | - | - | - | 2 | - | 1 | - | - | - | - | - | 2 |
| Dc(K.pn.B) | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.D) | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| Dd(K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dd(K.pn.B) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| Dd(K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |

CUADRO 37 (continuación)

| Biotipos | PG | MII | MI | O | QI | QII | U | O.R.L. | PS | N | U.V.I. | P |
|------------|----|-----|----|---|----|-----|---|--------|----|---|--------|---|
| De(K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 |
| Df(K.pn.A) | - | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 |
| Dh(K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |

PG = Patología General

MII = Médica II

MI = Médica I

O = Obstetricia

QI = Quirúrgica I

QII = Quirúrgica II

O.R.L. = Otorrinolaringología

U = Urología

PS= Psiquiatría

N = Nefrología

P = Pediatría

U.V.I. = Unidad de Vigilancia Intensiva

CUADRO 38

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS POR PRODUCTOS PATOLOGICOS

| Biotipo | O | Sd | E | S | F | EF | EU | EH | L | P | C | LCR |
|------------|---|----|---|---|---|----|----|----|---|---|---|-----|
| a (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| b (K.pn.A) | 1 | - | - | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - |
| c (K.pn.A) | 3 | 1 | 4 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| c (K.pn.B) | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| d (K.pn.A) | 2 | 2 | 6 | 1 | - | 1 | - | - | 2 | 1 | - | - |
| d (K.pn.B) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| d (K.pn.D) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| e (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - |
| f (K.pn.A) | 4 | 1 | 2 | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - |
| g (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| h (K.pn.A) | - | - | 3 | - | 1 | - | - | - | 2 | - | - | 1 |
| Da(K.pn.A) | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Da(K.pn.B) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Da(K.pn.C) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Da(K.pn.D) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Db(K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.A) | 4 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.B) | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.D) | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dd(K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| Dd(K.pn.B) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dd(K.pn.C) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

CUADRO 38 (continuación)

| Biotipo | O | Sd | E | S | F | EF | EU | EH | L | P | C | LCR |
|------------|---|----|---|---|---|----|----|----|---|---|---|-----|
| De(K.pn.A) | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Df(K.pn.A) | 4 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dh(K.pn.A) | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

O = Orina

Sd = Sonda

E = Esputo

S = Sangre

F = Frotis faringeo

EF = Exudados nasales

EU = Exudado umbilical

EH = Exudado herida

L = Loquios

P = Frotis prepucial

C = Cánula

LCR= Líquido cefalorraquideo

CUADRO 39

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS DURANTE EL PERIODO DE ESTUDIO

| Biotipo | Diciembre | Enero | Febrero | TOTAL | % |
|------------|-----------|-------|---------|-------|------|
| a (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| b (K.pn.A) | 3 | - | 1 | 4 | 5 |
| c (K.pn.A) | 3 | 6 | - | 9 | 11,2 |
| c (K.pn.B) | 1 | 1 | 1 | 3 | 3,7 |
| d (K.pn.A) | 2 | 6 | 7 | 15 | 18,7 |
| d (K.pn.B) | - | - | 2 | 2 | 2,5 |
| d (K.pn.D) | - | - | 1 | 1 | 1,2 |
| e (K.pn.A) | - | 2 | - | 2 | 2,5 |
| f (K.pn.A) | 2 | 7 | - | 9 | 11,2 |
| g (K.pn.A) | 1 | - | - | 1 | 1,2 |
| h (K.pn.A) | 1 | 2 | 4 | 7 | 8,7 |
| Da(K.pn.A) | 1 | - | 1 | 2 | 2,5 |
| Da(K.pn.B) | - | - | 1 | 1 | 1,2 |
| Da(K.pn.C) | 1 | - | - | 1 | 1,2 |
| Da(K.pn.D) | - | - | 1 | 1 | 1,2 |
| Db(K.pn.A) | - | - | 1 | 1 | 1,2 |
| Dc(K.pn.A) | 2 | 1 | 2 | 5 | 6,2 |
| Dc(K.pn.B) | 2 | - | - | 2 | 2,5 |
| Dc(K.pn.D) | - | 2 | - | 2 | 2,5 |
| Dd(K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| Dd(K.pn.B) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| Dd(K.pn.C) | 1 | - | - | 1 | 1,2 |
| De(K.pn.A) | 1 | 1 | - | 2 | 2,5 |
| Df(K.pn.A) | 1 | 1 | 3 | 5 | 6,2 |
| Dh(K.pn.A) | 1 | - | - | 1 | 1,2 |

CUADRO 40

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS POR MESES, CLINICAS Y PRODUCTOS PATOLOGICOS

| | <u>Diciembre</u> | <u>Enero</u> | <u>Febrero</u> |
|-------------------|------------------|--------------|----------------|
| PATOLOGIA GENERAL | | | |
| Orina | Dc | d | |
| Frotis faringeo | c | | |
| Espuito | | Dc | |
| MEDICA II | | | |
| Espuito | d, c | c | |
| Exudado herida | | e | |
| Orina | | f | b, Df |
| MEDICA I | | | |
| Orina | | c | |
| Sonda | Df | d | |
| Espuito | Dc | c | d, Da |
| OBSTETRICIA | | | |
| Loquios | | Dd, d | h |
| Orina | | f, Dc | Da, Df, Dc |
| QUIRURGICA I | | | |
| Orina | | f | |
| QUIRURGICA II | | | |
| Exudado herida | b | | |
| Sonda | | f, c | d, Db |
| Espuito | | | d |
| Orina | | | Dc |
| Cánula | | | d |

CUADRO 40 (continuacion)

| | <u>Diciembre</u> | <u>Enero</u> | <u>Febrero</u> |
|--------------------|------------------|--------------|----------------|
| UROLOGIA | | | |
| Orina | c | | d |
| Frotis prepucial | | d | |
| O.R.L. | | | |
| Exudados nasales | | | d |
| Orina | | Df | |
| PSIQUIATRIA | | | |
| Espuito | | f | |
| NEFROLOGIA | | | |
| Sangre | | Dd | |
| U.V.I. | | | |
| Espuito | Dd, Da, g | h | d, h, Da |
| Orina | De | | |
| Sangre | b | Dc | |
| Sonda | | c | |
| Cánula | | | c |
| PEDIATRIA | | | |
| Orina | Dc, Dh, Da | | Df |
| Frotis faringeo | h, Dc, f, b | De, e | |
| Sangre | d | | |
| Exudado umbilical | f | c | |
| Espuito | | f | |
| Sonda | | a | |
| LCR | | | h |

CUADRO 41

RESULTADO DE LA APLICACION DE LA ANTIBIOTICOTIPIA

| <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> | <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| 1 | A/1 | 25 | D/6 |
| 2 | A/1 | 26 | A/1 |
| 3 | D/2 | 27 | C/3 |
| 4 | D/6 | 28 | A/1 |
| 5 | B/1 | 29 | D/4 |
| 6 | D/6 | 30 | A/1 |
| 7 | A/3 | 31 | D/6 |
| 8 | D/1 | 32 | A/1 |
| 9 | C/1 | 33 | A/1 |
| 10 | A/3 | 34 | D/8 |
| 11 | C/1 | 35 | C/1 |
| 12 | C/1 | 36 | C/4 |
| 13 | A/1 | 37 | C/1 |
| 14 | C/1 | 38 | C/1 |
| 15 | A/1 | 39 | A/1 |
| 16 | A/1 | 40 | A/1 |
| 17 | A/1 | 41 | D/1 |
| 18 | A/1 | 42 | C/6 |
| 19 | A/1 | 43 | A/1 |
| 20 | A/3 | 44 | D/6 |
| 21 | A/1 | 45 | D/8 |
| 22 | A/1 | 46 | C/3 |
| 23 | D/6 | 47 | D/8 |
| 24 | A/1 | 48 | B/5 |

CUADRO 41 (continuación)

| <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> | <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|------------------------|-------------|------------------------|
| 49 | C/1 | 65 | A/1 |
| 50 | B/3 | 66 | A/1 |
| 51 | A/1 | 67 | D/6 |
| 52 | C/1 | 68 | A/1 |
| 53 | C/1 | 69 | A/1 |
| 54 | D/6 | 70 | A/6 |
| 55 | A/1 | 71 | A/1 |
| 56 | D/6 | 72 | C/1 |
| 57 | D/6 | 73 | A/1 |
| 58 | D/8 | 74 | A/1 |
| 59 | A/1 | 75 | D/6 |
| 60 | D/8 | 76 | D/6 |
| 61 | A/1 | 77 | A/1 |
| 62 | A/1 | 78 | D/6 |
| 63 | A/1 | 79 | A/1 |
| 64 | D/6 | 80 | D/6 |

CUADRO 42

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS POR ESPECIE DE KLEBSIELLA
PNEUMONIAE

| <u>Antibioticotipo</u> | <u>Especie</u> | | | | | | | |
|------------------------|----------------|----------|-----------|----------|-----------|----------|-----------|----------|
| | <u>A</u> | | <u>B</u> | | <u>C</u> | | <u>D</u> | |
| | <u>Nº</u> | <u>%</u> | <u>Nº</u> | <u>%</u> | <u>Nº</u> | <u>%</u> | <u>Nº</u> | <u>%</u> |
| A/1 | 26 | 40 | 4 | 44,4 | 2 | 100 | 2 | 50 |
| A/3 | 3 | 4,6 | - | - | - | - | - | - |
| A/6 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| B/1 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| B/3 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| B/5 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| C/1 | 10 | 15,3 | 1 | 11,1 | - | - | - | - |
| C/3 | 2 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| C/4 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| C/6 | - | - | - | - | - | - | 1 | 25 |
| D/1 | 2 | 3 | - | - | - | - | - | - |
| D/2 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| D/4 | 1 | 1,5 | - | - | - | - | - | - |
| D/6 | 10 | 15,3 | 4 | 44,4 | - | - | 1 | 25 |
| D/8 | 5 | 7,7 | - | - | - | - | - | - |

CUADRO 43

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS POR CLINICAS

| Antibioticotipo | PG | MII | MI | O | Clinica | | | | | | | |
|-----------------|----|-----|----|---|---------|-----|---|-----|----|---|-----|---|
| | | | | | QI | QII | U | ORL | PS | N | UVI | P |
| A/1 (K.pn.A) | - | 4 | 1 | 7 | 1 | 2 | 1 | - | 1 | - | 2 | 7 |
| A/1 (K.pn.B) | 1 | - | 1 | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - |
| A/1 (K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | - |
| A/1 (K.pn.D) | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| A/3 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 2 |
| A/6 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| B/1 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| B/3 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B/5 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| C/1 (K.pn.A) | 1 | 2 | 1 | 1 | - | 1 | 3 | - | - | - | - | 1 |
| C/1 (K.pn.B) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| C/3 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| C/4 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/6 (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| D/1 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| D/2 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| D/4 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D/6 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | - | 2 | - | 1 | - | - | 5 | - |
| D/6 (K.pn.B) | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | 1 | - |
| D/6 (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| D/8 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | 2 |

CUADRO 44

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS POR PRODUCTOS PATOLOGICOS

| Antibioticotipo | O | Sd | E | S | F | EF | EU | EH | L | P | C | LCR |
|-----------------|---|----|----|---|---|----|----|----|---|---|---|-----|
| A/1 (K.pn.A) | 9 | - | 10 | - | 3 | - | 1 | - | 3 | - | - | - |
| A/1 (K.pn.B) | - | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| A/1 (K.pn.C) | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A/1 (K.pn.D) | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A/3 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - |
| A/6 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B/1 (K.pn.A) | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B/3 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B/5 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| C/1 (K.pn.A) | 4 | 2 | 1 | - | - | - | - | - | 1 | 1 | - | 1 |
| C/1 (K.pn.B) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/3 (K.pn.A) | 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/4 (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/6 (K.pn.D) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D/1 (K.pn.A) | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| D/2 (K.pn.A) | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D/4 (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D/6 (K.pn.A) | 3 | 2 | 2 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - |
| D/6 (K.pn.B) | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| D/6 (K.pn.D) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D/8 (K.pn.A) | 1 | 1 | 1 | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - |

CUADRO 45

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS DURANTE EL PERIODO EN ESTUDIO

| <u>Antibioticotipo</u> | <u>Diciembre</u> | <u>Enero</u> | <u>Febrero</u> | <u>TOTAL</u> | <u>%</u> |
|------------------------|------------------|--------------|----------------|--------------|----------|
| A/1 (K.pn.A) | 6 | 10 | 10 | 26 | 32,5 |
| A/1 (K.pn.B) | 2 | - | 2 | 4 | 5 |
| A/1 (K.pn.C) | 2 | - | - | 2 | 2,5 |
| A/1 (K.pn.D) | - | 1 | 1 | 2 | 2,5 |
| A/3 (K.pn.A) | 3 | - | - | 3 | 3,7 |
| A/6 (K.pn.A) | - | - | 1 | 1 | 1,2 |
| B/1 (K.pn.A) | 1 | - | - | 1 | 1,2 |
| B/3 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| B/5 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| C/1 (K.pn.A) | 4 | 5 | 1 | 10 | 12,5 |
| C/1 (K.pn.B) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| C/3 (K.pn.A) | - | 2 | - | 2 | 2,5 |
| C/4 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| C/6 (K.pn.D) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| D/1 (K.pn.A) | 1 | 1 | - | 2 | 2,5 |
| D/2 (K.pn.A) | 1 | - | - | 1 | 1,2 |
| D/4 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1,2 |
| D/6 (K.pn.A) | 2 | 3 | 5 | 10 | 12,5 |
| D/6 (K.pn.B) | 1 | 1 | 2 | 4 | 5 |
| D/6 (K.pn.D) | - | - | 1 | 1 | 1,2 |
| D/8 (K.pn.A) | - | 3 | 2 | 5 | 6,2 |

CUADRO 46

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS POR MESES, CLINICAS Y PRODUCTOS
PATOLOGICOS

| | <u>Diciembre</u> | <u>Enero</u> | <u>Febrero</u> |
|--------------------------|------------------|--------------|----------------|
| PATOLOGIA GENERAL | | | |
| Orina | D/6 | C/1 | |
| Frotis faringeo | A/1 | | |
| Espudo | | A/1 | |
| MEDICA II | | | |
| Espudo | C/1, A/1 | A/1 | |
| Exudado herida | | D/6 | |
| Orina | | C/1 | A/1, D/8 |
| MEDICA I | | | |
| Orina | | D/1 | |
| Sonda | C/1 | D/4, C/4 | |
| Espudo | A/1 | B/3 | A/1, D/6 |
| OBSTETRICIA | | | |
| Loquios | | A/1, C/1 | D/8, A/1 |
| Orina | | C/3, A/1 | A/1, D/6 |
| QUIRURGICA I | | | |
| Orina | | A/1 | |
| QUIRURGICA II | | | |
| Exudado herida | A/3 | | |
| Sonda | | C/1 | A/1, D/6 |
| Espudo | | | A/1 |
| Orina | | | D/6 |
| Cánula | | | A/1 |

CUADRO 46 (continuacion)

| | <u>Diciembre</u> | <u>Enero</u> | <u>Febrero</u> |
|--------------------|------------------|--------------|----------------|
| UROLOGIA | | | |
| Orina | C/1 | | A/1 |
| Frotis prepucial | | C/1 | |
| O.R.L. | | | |
| Exudados nasales | | | A/1 |
| Orina | | C/3 | |
| PSIQUIATRIA | | | |
| Espudo | | A/1 | |
| NEFROLOGIA | | | |
| Sangre | | D/6 | |
| U.V.I. | | | |
| Espudo | A/1 | D/6, D/8 | A/1, A/6, D/6 |
| Orina | D/6 | | |
| Sangre | D/6 | C/6 | |
| Sonda | | D/6 | |
| Cánula | | | D/6 |
| PEDIATRIA | | | |
| Orina | A/1, B/1, D/2 | | A/1 |
| Frotis faringeo | A/1, A/3, D/1 | A/1, D/8 | |
| Sangre | A/3 | B/5 | |
| Exudado umbilical | A/1 | | |
| Espudo | | A/1 | |
| Sonda | | D/8 | |
| LCR | | | C/1 |

CUADRO 47

RELACION ENTRE LA BIOTIPIA Y ANTIBIOTICOTIPIA

| <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|----------------|------------------------|
| 1 | Dd | A/1 |
| 2 | Dc | A/1 |
| 3 | Dh | D/2 |
| 4 | De | D/6 |
| 5 | Da | B/1 |
| 6 | Dc | D/6 |
| 7 | h | A/3 |
| 8 | Dc | D/1 |
| 9 | Df | C/1 |
| 10 | d | A/3 |
| 11 | c | C/1 |
| 12 | c | C/1 |
| 13 | f | A/1 |
| 14 | d | C/1 |
| 15 | Da | A/1 |
| 16 | f | A/1 |
| 17 | g | A/1 |
| 18 | Dc | A/1 |
| 19 | c | A/1 |
| 20 | b | A/3 |
| 21 | c | A/1 |
| 22 | d | A/1 |
| 23 | b | D/6 |
| 24 | Dd | A/1 |
| 25 | Dd | D/6 |

CUADRO 47 (continuación)

| <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|----------------|------------------------|
| 26 | c | A/1 |
| 27 | Df | C/3 |
| 28 | De | A/1 |
| 29 | d | D/4 |
| 30 | c | A/1 |
| 31 | c | D/6 |
| 32 | f | A/1 |
| 33 | Dc | A/1 |
| 34 | h | D/8 |
| 35 | d | C/1 |
| 36 | d | C/4 |
| 37 | f | C/1 |
| 38 | f | C/1 |
| 39 | f | A/1 |
| 40 | d | A/1 |
| 41 | c | D/1 |
| 42 | Dc | C/6 |
| 43 | f | A/1 |
| 44 | c | D/6 |
| 45 | a | D/8 |
| 46 | f | C/3 |
| 47 | e | D/8 |
| 48 | c | B/5 |
| 49 | d | C/1 |
| 50 | c | B/3 |

CUADRO 47 (continuación)

| <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|----------------|------------------------|
| 51 | f | A/1 |
| 52 | d | C/1 |
| 53 | c | C/1 |
| 54 | h | D/6 |
| 55 | Dc | A/1 |
| 56 | c | D/6 |
| 57 | d | D/6 |
| 58 | h | D/8 |
| 59 | h | A/1 |
| 60 | b | D/8 |
| 61 | d | A/1 |
| 62 | d | A/1 |
| 63 | d | A/1 |
| 64 | Dc | D/6 |
| 65 | d | A/1 |
| 66 | d | A/1 |
| 67 | d | D/6 |
| 68 | d | A/1 |
| 69 | d | A/1 |
| 70 | h | A/6 |
| 71 | d | A/1 |
| 72 | h | C/1 |
| 73 | Df | A/1 |
| 74 | Da | A/1 |
| 75 | Db | D/6 |

CUADRO 47 (continuación)

| <u>Cepas</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|--------------|----------------|------------------------|
| 76 | Da | D/6 |
| 77 | Df | A/1 |
| 78 | Da | D/6 |
| 79 | Df | A/1 |
| 80 | Dc | D/6 |

CUADRO 48

CORRESPONDENCIA BIOTIPOS-ANTIBIOTICOTIPOS PARA KLEBSIELLA
PNEUMONIAE A

| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|----------------|---|
| a (1) | D/8 (1) |
| b (4) | A/1(1),D/6(1),D/8(1),A/3(1) |
| c (9) | C/1(2),A/1(3),D/1(1),D/6(1),B/5(1),B/3(1) |
| d (15) | A/3(1),C/1(4),D/4(1),C/4(1),A/1(6),D/6(2) |
| e (2) | D/6(1),D/8(1) |
| f (9) | A/1(6),C/1(2),C/3(1) |
| g (1) | A/1(1) |
| h (7) | A/3(1),D/8(2),D/6(1),A/1(1),A/6(1),C/1(1) |
| Da (2) | B/1(1),A/1(1) |
| Db (1) | D/6(1) |
| Dc (5) | A/1(2),D/1(1),D/6(2) |
| Dd (1) | A/1(1) |
| De (2) | D/6(1),A/1(1) |
| Df (5) | C/1(1),C/3(1),A/1(3) |
| Dh (1) | D/2(1) |

Entre paréntesis figuran las cepas pertenecientes al correspondiente marcador.

CUADRO 49

CORRESPONDENCIA BIOTIPOS-ANTIBIOTICOTIPOS PARA KLEBSIELLA
PNEUMONIAE B,C,D

1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE B

| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|----------------|------------------------|
| c (3) | A/1(1), C/1(1), D/6(1) |
| d (2) | A/1(2) |
| Da (1) | D/6(1) |
| Dc (2) | D/6(1), A/1(1) |
| Dd (1) | D/6(1) |

2. KLEBSIELLA PNEUMONIAE C

| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|----------------|------------------------|
| Da (1) | A/1(1) |
| Dd (1) | A/1(1) |

3. KLEBSIELLA PNEUMONIAE D

| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|----------------|------------------------|
| d (1) | A/1(1) |
| Da (1) | D/6(1) |
| Dc (2) | A/1(1), C/6(1) |

Entre paréntesis figuran las cepas pertenecientes al correspondiente
marcador

CUADRO 50

BIOTIPOS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> |
|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|----------------|
| 1 | 1 | Dc | | 26 | Dc |
| | 2 | Dc | 12 | 27 | Dd |
| | 3 | Dc | 13 | 28 | f |
| | 4 | Dc | | 29 | b |
| 2 | 5 | Da | | 30 | h |
| 3 | 6 | Dh | | 31 | h |
| | 7 | c | 14 | 32 | c |
| 4 | 8 | Da | 15 | 33 | b |
| | 9 | Dc | | 34 | b |
| | 10 | Da | | 35 | Dh |
| | 11 | Da | | 36 | Dc |
| | 12 | Da | | 37 | Dh |
| | 13 | Da | 16 | 38 | Dg |
| 5 | 14 | d | | 39 | De |
| | 15 | d | 17 | 40 | d |
| 6 | 16 | Dd | 18 | 41 | Da |
| | 17 | Dh | | 42 | Dc |
| | 18 | Dd | 19 | 43 | c |
| 7 | 19 | e | | 44 | c |
| 8 | 20 | Da | | 45 | h |
| 9 | 21 | Df | | 46 | d |
| 10 | 22 | De | 20 | 47 | Df |
| 11 | 23 | c | | 48 | Df |
| | 24 | c | | 49 | Df |
| | 25 | c | 21 | 50 | f |

CUADRO 50 (continuación)

| <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> |
|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|----------------|
| | 51 | f | | 66 | Da |
| | 52 | f | 25 | 67 | Dc |
| | 53 | f | | 68 | f |
| 22 | 54 | h | 26 | 69 | Db |
| | 55 | d | | 70 | Db |
| | 56 | Dc | | 71 | Db |
| | 57 | d | 27 | 72 | De |
| | 58 | d | | 73 | De |
| 23 | 59 | Dh | 28 | 74 | g |
| | 60 | d | | 75 | g |
| | 61 | d | | 76 | g |
| | 62 | a | 29 | 77 | Dd |
| 24 | 63 | a | 30 | 78 | d |
| | 64 | f | | 79 | f |
| | 65 | Dh | | 80 | a |

CUADRO 51

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS EN KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR PRODUCTOS
PATOLOGICOS ORIGINALES. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| Biotipo | He | F | T | O | Or | C | S | Q | V | H | E |
|------------|----|---|---|---|----|---|---|---|---|---|---|
| a (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| b (K.pn.B) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| c (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| c (K.pn.B) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| c (K.pn.C) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| d (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - |
| d (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| e (K.pn.C) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| f (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - |
| g (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| h (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Da(K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - | 1 | - | - |
| Db(K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.B) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dd(K.pn.A) | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | 1 | - |
| De(K.pn.A) | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| Df(K.pn.A) | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - |
| Dg(K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| Dh(K.pn.A) | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |

F = Exudado faringeo Or = Orina Q = Exudado quemadura
T = Exudado traqueal C = Catéter V = Exudado vaginal
O = Exudado ocular S = Sonda H = Heces
E = Esputo He = Exudado herida

CUADRO 52

DISTRIBUCION DE BIOTIPOS EN KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR CLINICAS.
PRODUCTOS ORIGINALES. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| Biotipo | Clinicas | | | | | | | | | | | | |
|------------|----------|---|---|-----|-----|-----|---|---|----|---|----|---|-----|
| | QII | P | R | ORL | UVI | RNP | L | O | PG | E | MI | U | MII |
| a (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| b (K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| c (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| c (K.pn.B) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| c (K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| d (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| d (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| e (K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| f (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| g (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| h (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| Da(K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Db(K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| Dc(K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dc(K.pn.B) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Dd(K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - |
| De(K.pn.A) | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Df(K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| Dg(K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| Dh(K.pn.A) | 1 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |

P= Prematuros

QII= Quirúrgica II

PG=Patología General

R= Reumatología

O = Obstetricia

U =Urología

L= Lactantes

MI = Médica I

ORL=Otorrinolaringología

E= Escolares

MII= Médica II

RNP=Recién Nacido Patológico

UVI = Unidad Vigilancia Intensiva

CUADRO 53

DISTRIBUCION DE INFECCIONES ENDOGENAS Y EXOGENAS POR CLINICAS
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE A. APLICACION DE LA BIOTIPIA

| Clínica | Nº casos | Coincidencia de biotipos | | |
|---------------|----------|--------------------------|--------|--------|
| | | en faringe y/o heces | % End. | % Exo. |
| UVI | 5 | 3 | 60 | 40 |
| ORL | 2 | - | - | 100 |
| Prematuros | 2 | 1 | 50 | 50 |
| RNP | 4 | 2 | 50 | 50 |
| Obstetricia | 2 | - | - | 100 |
| P. General | 2 | 1 | 50 | 50 |
| Escolares | 1 | - | - | 100 |
| Urología | 1 | 1 | 100 | - |
| Médica I | 2 | 1 | 50 | 50 |
| Quirúrgica II | 1 | - | - | 100 |
| Reumatología | 2 | - | - | 100 |
| Médica II | 1 | 1 | 100 | - |

End. = Endogenas

Exo. = Exogenas

CUADRO-54

DISTRIBUCION DE INFECCIONES ENDOGENAS Y EXOGENAS POR CLINICAS
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE B, C, D. DISTRIBUCION DE LA BIOTIPIA

| Clínica | Nºcasos | Coincidencia de biotipos | | |
|---------------|---------|--------------------------|--------|--------|
| | | en faringe y/o heces | % End. | % Exo. |
| Prematuros(B) | 1 | 1 | 100 | - |
| Médica I(B) | 1 | - | - | 100 |
| Lactantes(C) | 2 | - | - | 100 |
| P. General(D) | 1 | - | - | 100 |

End. = Endogenas

Exo. = Exogenas

B = Klebsiella pneumoniae B

C = Klebsiella pneumoniae C

D = Klebsiella pneumoniae D

CUADRO 55

ANTIBIOTICOTIPOS DE LAS CEPAS ESTUDIADAS. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> | <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| 1 | 1 | A/1 | | 26 | D/8 |
| | 2 | A/1 | 12 | 27 | C/8 |
| | 3 | A/1 | 13 | 28 | C/8 |
| | 4 | A/1 | | 29 | C/8 |
| 2 | 5 | D/8 | | 30 | C/8 |
| 3 | 6 | D/8 | | 31 | C/8 |
| | 7 | A/1 | 14 | 32 | C/1 |
| 4 | 8 | D/8 | 15 | 33 | A/1 |
| | 9 | D/8 | | 34 | A/1 |
| | 10 | D/8 | | 35 | A/1 |
| | 11 | D/8 | | 36 | A/1 |
| | 12 | D/8 | | 37 | A/1 |
| | 13 | D/8 | 16 | 38 | A/1 |
| 5 | 14 | A/3 | | 39 | A/1 |
| | 15 | D/6 | 17 | 40 | D/6 |
| 6 | 16 | B/1 | 18 | 41 | A/2 |
| | 17 | D/8 | | 42 | A/1 |
| | 18 | D/2 | 19 | 43 | A/1 |
| 7 | 19 | A/1 | | 44 | A/1 |
| 8 | 20 | C/6 | | 45 | A/1 |
| 9 | 21 | D/6 | | 46 | A/1 |
| 10 | 22 | A/1 | 20 | 47 | C/2 |
| 11 | 23 | C/1 | | 48 | C/2 |
| | 24 | C/1 | | 49 | C/2 |
| | 25 | C/1 | 21 | 50 | C/6 |

CUADRO 55 (continuación)

| <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> | <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|-------------|------------------------|-------------|-------------|------------------------|
| | 51 | C/6 | | 66 | D/6 |
| | 52 | C/6 | 25 | 67 | C/3 |
| | 53 | C/6 | | 68 | A/1 |
| 22 | 54 | A/1 | 26 | 69 | D/5 |
| | 55 | C/1 | | 70 | D/5 |
| | 56 | A/1 | | 71 | D/5 |
| | 57 | C/1 | 27 | 72 | A/1 |
| | 58 | C/1 | | 73 | A/1 |
| 23 | 59 | A/1 | 28 | 74 | A/1 |
| | 60 | C/1 | | 75 | A/1 |
| | 61 | A/1 | | 76 | A/1 |
| | 62 | D/2 | 29 | 77 | A/1 |
| 24 | 63 | D/6 | 30 | 78 | A/6 |
| | 64 | C/8 | | 79 | A/1 |
| | 65 | C/8 | | 80 | A/1 |

CUADRO 56

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS EN KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR CLINICAS. PRODUCTOS ORIGINALES. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| Antibioticotipo | QII | P | R | ORL | UVI | RNP | L | O | PG | E | MI | U | MI |
|-----------------|-----|---|---|-----|-----|-----|---|---|----|---|----|---|----|
| A/1 (K.pn.A) | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 2 | - | - | - | - | 2 | - | - |
| A/1 (K.pn.B) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - |
| A/1 (K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| A/2 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| A/3 (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A/6 (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| B/1 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| C/1 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| C/1 (K.pn.C) | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - |
| C/2 (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/3 (K.pn.A) | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/6 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - |
| C/8 (K.pn.A) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - |
| D/5 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 |
| D/6 (K.pn.A) | - | - | - | - | 1 | - | - | 1 | - | 1 | - | - | - |
| D/8 (K.pn.A) | - | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |

CUADRO 57

DISTRIBUCION DE ANTIBIOTICOTIPOS EN KLEBSIELLA PNEUMONIAE POR PRODUCTOS PATOLOGICOS ORIGINALES. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| <u>Antibioticotipo</u> | <u>Ha</u> | <u>F</u> | <u>T</u> | <u>Or</u> | <u>C</u> | <u>S</u> | <u>Q</u> | <u>V</u> | <u>H</u> | <u>E</u> | <u>O</u> |
|------------------------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| A/1 (K.pn.A) | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | - | - | 1 | 2 | - |
| A/1 (K.pn.B) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| A/1 (K.pn.C) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| A/2 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - |
| A/3 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| A/6 (K.pn.D) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - |
| B/1 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| C/1 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| C/1 (K.pn.C) | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| C/2 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| C/3 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| C/6 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| C/8 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | 1 |
| D/5 (K.pn.A) | - | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - |
| D/6 (K.pn.A) | - | - | - | 1 | - | 1 | 1 | - | - | - | - |
| D/8 (K.pn.A) | - | 1 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | 1 |

CUADRO 58

DISTRIBUCION DE INFECCIONES ENDOGENAS Y EXOGENAS POR CLINICAS
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE A. APLICACION DE LA ANTIBIOTICOTI-
PIA

| Clínica | Nº casos | Coincidencia de antibiоти | | |
|---------------|----------|------------------------------|-------|-------|
| | | cotipos en faringe y/o heces | | |
| | | | %End. | %Exo. |
| UVI | 5 | 2 | 40 | 60 |
| ORL | 2 | - | - | 100 |
| Prematuros | 2 | 2 | 100 | - |
| RNP | 4 | 2 | 50 | 50 |
| Obstetricia | 2 | - | - | 100 |
| P. General | 2 | 1 | 50 | 50 |
| Escolares | 1 | - | - | 100 |
| Urología | 1 | 1 | 100 | - |
| Médica I | 2 | 1 | 50 | 50 |
| Quirúrgica II | 1 | 1 | 100 | - |
| Reumatología | 2 | - | - | 100 |
| Médica II | 1 | 1 | 100 | - |

CUADRO 59

DISTRIBUCION DE INFECCIONES ENDOGENAS Y EXOGENAS POR CLINICAS
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE B,C,D. APLICACION DE LA ANTIBIOTI-
COTIPIA

| Clínica | Nº casos | Coincidencia de antibioti | |
|---------------|----------|------------------------------|-------------|
| | | cotipos en faringe y/o heces | %End. %Exo. |
| Prematuros(B) | 1 | 1 | 100 - |
| Médica I(9) | 1 | 1 | 100 - |
| Lactantes(C) | 2 | - | - 100 |
| P. General(D) | 1 | - | - 100 |

CUADRO 60

RELACION ENTRE LOS DOS MARCADORES EMPLEADOS. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| <u>Caso</u> | <u>Copa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|-------------|----------------|------------------------|
| 1 | 1 | Dc | A/1 |
| | 2 | Dc | A/1 |
| | 3 | Dc | A/1 |
| | 4 | Dc | A/1 |
| 2 | 5 | Da | D/8 |
| 3 | 6 | Dh | D/8 |
| | 7 | c | A/1 |
| 4 | 8 | Da | D/8 |
| | 9 | Dc | D/8 |
| | 10 | Da | D/8 |
| | 11 | Da | D/8 |
| | 12 | Da | D/8 |
| | 13 | Da | D/8 |
| 5 | 14 | d | A/3 |
| | 15 | d | A/6 |
| 6 | 16 | Dd | B/1 |
| | 17 | Dh | D/8 |
| | 18 | Dd | D/2 |
| 7 | 19 | e | A/1 |
| 8 | 20 | Da | C/6 |
| 9 | 21 | Df | D/6 |
| 10 | 22 | De | A/1 |
| 11 | 23 | c | C/1 |
| | 24 | c | C/1 |
| | 25 | c | C/1 |

CUADRO 60 (continuación)

| <u>Caso</u> | <u>Cepa</u> | <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|-------------|-------------|----------------|------------------------|
| | 26 | Dc | D/8 |
| 12 | 27 | Dd | C/8 |
| 13 | 28 | f | C/8 |
| | 29 | b | C/8 |
| | 30 | h | C/8 |
| | 31 | h | C/8 |
| 14 | 32 | c | C/1 |
| 15 | 33 | b | A/1 |
| | 34 | b | A/1 |
| | 35 | Dh | A/1 |
| | 36 | Dc | A/1 |
| | 37 | Dh | A/1 |
| 16 | 38 | Dg | A/1 |
| | 39 | De | A/1 |
| 17 | 40 | d | D/6 |
| 18 | 41 | Da | A/2 |
| | 42 | Dc | A/1 |
| 19 | 43 | c | A/1 |
| | 44 | c | A/1 |
| | 45 | h | A/1 |
| | 46 | d | A/1 |
| 20 | 47 | Df | C/2 |
| | 48 | Df | C/2 |
| | 49 | Df | C/2 |
| 21 | 50 | f | C/6 |
| | 51 | f | C/6 |
| | 52 | f | C/6 |

CUADRO 60 (continuación)

| Caso | Capa | Biotipo | Antibioticotipo |
|------|------|---------|-----------------|
| 22 | 53 | f | C/6 |
| | 54 | h | A/1 |
| | 55 | d | C/1 |
| | 56 | Dc | A/1 |
| | 57 | d | C/1 |
| | 58 | d | C/1 |
| 23 | 59 | Dh | A/1 |
| | 60 | d | C/1 |
| | 61 | d | A/1 |
| | 62 | a | D/2 |
| 24 | 63 | a | D/6 |
| | 64 | f | C/8 |
| | 65 | Dh | C/8 |
| | 66 | Da | D/6 |
| 25 | 67 | Dc | C/3 |
| | 68 | f | A/1 |
| 26 | 69 | Db | D/5 |
| | 70 | Db | D/5 |
| | 71 | Db | D/5 |
| | 72 | d | A/1 |
| 27 | 73 | De | A/1 |
| | 74 | g | A/1 |
| 28 | 75 | g | A/1 |
| | 76 | g | A/1 |
| | 77 | Dd | A/1 |
| 29 | 78 | d | A/6 |
| 30 | 79 | f | A/1 |
| | 80 | a | A/1 |

CUADRO 61

CORRESPONDENCIA BIOTIPOS/ANTIBIOTICOTIPOS PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE A SEGUN PRODUCTOS PATOLOGICOS ORIGINALES. ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
|----------------|------------------------|
| a (1) | D/6 (1) |
| b (1) | A/1 (1) |
| c (1) | C/1 (1) |
| d (2) | A/3(1), D/6 (1) |
| f (2) | C/8(1), C/6 (1) |
| g (1) | A/1 (1) |
| h (1) | A/1 (1) |
| Da(4) | D/8(2),C/6(1),A/2(1) |
| Db(1) | D/5(1) |
| Dc(1) | C/3 (1) |
| Dd(3) | B/1(1), C/8(1), A/1(1) |
| De(2) | A/1 (2) |
| Df(2) | D/6(1), C/2 (1) |
| Dg(1) | A/1(1) |
| Dh(2) | D/8(1), A/1 (1) |

Entre paréntesis las cepas pertenecientes al correspondiente marcador

CUADRO 62

CORRESPONDENCIA BIOTIPOS/ANTIBIOTICOTIPOS PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE B, C, D SEGUN PRODUCTOS PATOLOGICOS ORIGINALES. ESTUDIO EPI-DEMIOLOGICO

| 1. KLEBSIELLA PNEUMONIAE B | |
|----------------------------|------------------------|
| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
| c (1) | A/1 (1) |
| Dc(1) | A/1 (1) |

| 2. KLEBSIELLA PNEUMONIAE C | |
|----------------------------|------------------------|
| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
| c (1) | C/1 (1) |
| e (1) | A/1 (1) |

| 3. KLEBSIELLA PNEUMONIAE D | |
|----------------------------|------------------------|
| <u>Biotipo</u> | <u>Antibioticotipo</u> |
| d (1) | A/6 (1) |

Entre paréntesis las cepas pertenecientes al correspondiente marcador

CUADRO 63

DISTRIBUCION DE INFECCIONES ENDOGENAS Y EXOGENAS POR CLINICAS
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE A. APLICACION DE LA BIOTIPIA Y AN-
TIBIOTICOTIPIA

| Clínica | Coincidencia de biotipos y antibioticotipos en fa | | | |
|---------------|--|----------|-------|-------|
| | ringe y/o heces | Nº casos | %End. | %Exo. |
| UVI | 2 | 5 | 40 | 60 |
| ORL | - | 2 | - | 100 |
| Prematuros | 1 | 2 | 50 | 50 |
| RNP | 1 | 4 | 25 | 75 |
| Obstetricia | - | 2 | - | 100 |
| P. General | 1 | 2 | 50 | 50 |
| Escolares | - | 1 | - | 100 |
| Urologia | 1 | 1 | 100 | - |
| Médica I | 1 | 2 | 50 | 50 |
| Quirúrgica II | - | 1 | - | 100 |
| Reumatología | - | 2 | - | 100 |
| Médica II | 1 | 1 | 100 | - |

CUADRO 64

DISTRIBUCION DE INFECCIONES ENDOGENAS Y EXOGENAS POR CLINICAS
PARA KLEBSIELLA PNEUMONIAE B, C, D. APLICACION DE LA BIOTIPIA
Y ANTIBIOTICOTIPIA

| Clínica | Coincidencia de biotipos y antibioticotipos en fa | | Nº casos | %End. | %Exo. |
|---------------|--|--|----------|-------|-------|
| | ringe y/o heces | | | | |
| Prematuros(B) | 1 | | 1 | 100 | - |
| Médica I (B) | - | | 1 | | 100 |
| Lactantes(C) | - | | 2 | | 100 |
| P. General(D) | - | | 1 | | 100 |

3-3. PARTE TERCERA. JUICIO CRITICO

A la hora de plantearse un correcto control de las infecciones hospitalarias es necesario recurrir al empleo de marcadores epidemiológicos. Este sistema ofrece una serie de inconvenientes, el más importante de los cuales es el de los cambios de los tipos por mutaciones espontaneas, por influencias ambientales o por fenomenos de transferencia genética. Aún reconociendo "a priori" estos defectos es la única forma de establecer la cadena epidemiológica de estos procesos para en un momento determinado establecer los niveles de epidemia o saber si las infecciones tienen un origen exógeno o endógeno.

K. pneumoniae es un microorganismo frecuente en nuestro ambiente hospitalario y ello justificaría la amplia gama de trabajos realizados en nuestro Departamento sobre el mismo. Estudios que en la mayoría de los casos han pretendido encontrar marcadores eficaces para el control epidemiológico de las infecciones hospitalarias. Así se han aplicado la serotipia, bacteriocinotipia y biotipia, con resultados muy diversos como vimos en la revisión bibliográfica. No se había empleado hasta ahora la antibiotoxicotipia si bien se había trabajado sobre la susceptibilidad de K. pneumoniae a los diversos antimicrobianos. Basandonos en estos estudios nosotros hemos creado un esquema nuevo de antibiotoxicotipia mediante la detección de sensibilidad o resistencia de las cepas problemáticas a 5 sustancias que hemos dividido en dos grupos, el primero con carbenicilina y cloranfenicol y el segundo con paromomicina, estreptomomicina y tetraciclina (cuadro 34). Según los resul

tarjos obtenidos el antibioticotipo vendrá expresado por una letra y un número, por ejemplo: A/1, B/4, C/2 etc.

Una vez que en la primera parte de nuestro trabajo comprobamos que la antibioticotipia sola o con la biotipia podría tener vitalidad práctica, pasamos a efectuar la tipificación en 30 casos clínicos donde apareció K. pneumoniae con la finalidad de determinar si estos enfermos hospitalizados se contaminaban de forma exógena o endógena. Al mismo tiempo que utilizamos la antibioticotipia también aplicamos la biotipia que es el marcador más práctico en la tipificación de K. pneumoniae. La conclusión más fundamental de nuestro estudio como puede observarse en los cuadros 53, 54, 58, 59, 63 y 64 es la importante correspondencia entre biotipia y antibioticotipia. Este hecho que no ocurre con otros marcadores empleados simultáneamente abre una puerta esperanzadora en la tipia de K. pneumoniae pues hasta ahora cuando se utilizan varios marcadores se obtiene tal dispersión de tipos lo que imposibilita el control epidémico.

Otro dato importante es el hecho de poder clasificar K. pneumoniae en un número ciertamente más restringido por antibioticotipia que por bacteriocinotipia, lo que unido al hecho de su fácil aplicación hacen a este marcador el complemento ideal para la tipificación epidemiológica de K. pneumoniae.

Es un hecho claramente constatado que una cepa puede cambiar con cierta facilidad la sensibilidad a un anti

microbiano, esto que para algunos determinan que se desecha la antibioticotipia puede ser indirectamente rebatido al quedar claramente demostrado que con otros marcadores ocurre igual, ya que hoy por hoy no existe marcador que sea estable con el tiempo y todos cambian en mayor o menor amplitud.

Por todo lo expuesto consideramos que la antibioticotipia debe emplearse por su estabilidad equíparable a otros marcadores, por su coincidencia con la biotipia y por su facilidad técnica de realización. Nuevas experiencias deben confirmarlo hasta aquí comprobado por nosotros.

Junto con esta justificación de nuestro trabajo debemos señalar que no existe un antibioticotipo claramente predominante en ningún grupo de K. pneumoniae, que ciertos antibioticotipos no se han presentado y que durante el periodo en estudio no hubo brotes epidémicos en ninguna clínica debida a K. pneumoniae.

3-4. NOTAS BIBLIOGRAFICAS AL CAPITULO TERCERO

- 116.- Difco. Manual de Bacteriología.
- 117.- BBL. Manual de procedimientos de laboratorios y productos.
- 118.- Bio MERIEUX. Bacteriología. Virología. Cultivos celulares.
- 119.- COWAN, S.T y STEEL, K.J., pág. 137-192.
- 120.- LE MINOR, L., pág. 160-223.
- 121.- EDWARDS, P.R y EWING, W.H., pág. 337-356.
- 122.- MAC FADDIN, J.F., fundamentos bioquímicos.
- 123.- LIEBANA UREÑA, J (1.977), pág. 241.
- 124.- COWAN, S.T y STEEL, K.J (1.974), pág. 139 tabla A-2.
- 125.- Ibidem.
- 126.- EDWARDS, P.R y EWING, W.H; pág. 350
- 127.- Ibidem.

CAPITULO CUARTO . CONCLUSIONES

- 1.- Se propone un nuevo esquema de tipificación de K. pneumoniae mediante la antibiotipia para ello se emplean cinco antimicrobianos divididos en dos grupos, el primero con carbenicilina y cloranfenicol y el segundo con paramomicina, estreptomycinina y tetraciclina.
- 2.- La calificación de los antibiotipos se hace con una letra mayúscula para el primer grupo y con números arábigos para el segundo atendiendo a la sensibilidad o resistencia a las sustancias ensayadas.
- 3.- Se aplica conjuntamente la biotipia y nuestro esquema de antibiotipia a 80 cepas de K. pneumoniae para comprobar su utilidad práctica, cosa que quedó tras las experiencias realizadas suficientemente demostrada.
- 4.- La aplicación conjunta de la antibiotipia y biotipia en 30 casos clínicos donde en algunos productos patológicos se aisló K. pneumoniae y comparandola con los tipos de faringe y/o heces mostró su utilidad para determinar los porcentajes de infecciones endógenas y exógenas a nivel hospitalario.
- 5.- No hay como ocurre con otros marcadores, un claro predominio de antibiotipos por productos patológicos en el tiempo en estudio se evidenció: ningún brote epidémico.
- 6.- Existe una alta correlación entre infecciones endógenas y exógenas aplicando individualmente la biotipia y la antibiotico-

tipia y cuando se utilizan conjuntamente.

7.- Ante la experiencia realizada creemos que el esquema propuesto de antibioticotipia puede suponer una gran ayuda en el control de infecciones hospitalarias por K. pneumoniae sobre todo por su facil realización técnica, lo que unido a la biotipia permitiría un control rutinario y asequible a cualquier laboratorio.

CAPITULO QUINTO. BIBLIOGRAFIA GENERAL

- CARRION PASTOR, J.A (1.980). Aplicación epidemiológica de la biotipia y bacteriocinotipia en las infecciones hospitalarias por K. pneumoniae. Tesis Doctoral. Medicina. Granada.
- CASEWELL, M.W y PHILLIPS, I (1.977). Hands as route of transmission for Klebsiella species. Br. Med. Journ., 2: 1.315-1.317.
- CASEWELL, M.W; WEBSTER, M; DALTON, M.T y PHILLIPS, I (1.977). Gentamicin-resistant Klebsiella aerogenes in a urological ward. Lancet II;444-446
- CASEWELL, M.W y PHILLIPS, I (1.978). Epidemiological patterns of Klebsiella colonization and infection in an intensive care ward. J. Hyg. Cambr., 80: 295-300.
- CASEWELL, M.W y PHILLIPS, I (1.978-a). Food as a source of Klebsiella species for colonization and infection of intensive care patients. J. Clin. Pathol., 31: 845-849.
- CASTILLO PEREZ, A. (1.979). Serotipia y su comparación con otras técnicas de tipificación del género Klebsiella. Tesina de Licenciatura. Medicina. Granada.
- COOKE, E.M; BRAYSON, J.C; EDMONDSON, A.S y HALL, D (1.979). An investigation into the incidence and sources of Klebsiella infections in hospital patients. J. Hyg. Cambr., 82: 473-480.
- COWAN, S.T y STELL, K.J. (1.974). Manual for the identification of medical bacteria. 2ª ed. Cambridge University Press. Londres.

- . DIFCO. Instrucciones de los antisueros comercializados.
- . DUMAS, J (1.958). Bactériologie médicale, 289c-289n, puesta al día 1.959. Flammarion. Paris.
- . DUNCAN, I.B.R (1975). Epidemiology and chemotherapy of opportunistic infections due to Pseudomonas and Klebsiella. J. Clin. - Pharmacol., 11: 277-282.
- . DURLAKOWA, I; LACHOWICZ, Z y SLOPEK, S (1.967). Biochemical properties of Klebsiella bacilli. Arch. Immunol. et Ther. exper., - 15: 490-496.
- . EDWARDS, P.R y EWING, W.H (1.972). Identification of Enterobacteriaceae. 3ª ed. Burgess Publishing Company. Minneapolis.
- . EICHKOFF, T.C; ETEINHAVER, W.B y FINLAND, M (1.966). Enterobacter- Serratia división: biochemical and serologie characteristics and susceptibility to antibiotics. Ann. Intern. Med., 65: 1.163-1.179.
- . EUSTATZIOU, S y cols. (1962). Systèmes phago-bacteriens et taxonomie des Klebsiella. Arch. roum. Pañ. exp. Microbiol., 21: 397-400.
- . GABRILOVICH, I.M (1.967). Phage diagnosis of scleroma and its-- epidemiological significance. Journal of Hygiene Epidemiology, - Microbiology and Immunology., 11: 426-432.

- . GABRILOVICH, I.M y cols. (1.968). Molecular structure of Klebsiella phages and their specificity. Arch. Immunol. et Ther. Exp., 16: 870-880.
- . GOLDMAN, J.M y KOWALEC, J.K (1.978). Hepatic abscess and osteomyelitis from Klebsiella pneumoniae. Jama, 240: 2.660.
- . HAMON, Y y PERON, Y (1.963). Individualisation de quelques nouvelles familles d'entérobactériocines. C.R. Acad. Sci. Paris 257: 309-311.
- . HAVERKORN, M.L y MICHEL, M.F (1.979). Nosocomial Klebsiella. I.- Colonization of hospitalized patients. J. Hyg. Cambr., 82: 177-193.
- . HEIDELBERGEN, M (1.972). Relations chimique et immunologiques - entre polysides bacteriens, 271-288. Immunologie Bordet. Flammarion. Paris.
- . KESSNER, D.M y LEPPER, N.H (1.967). Epidemiologie studies ou - Gram negativi bacilli in the hospital and community. Amer. Jour. Epidemiol., 85: 45-60.
- . KRZYWY, T (1.972a). Ultrastructure of Shigella and Klebsiella - bacteriophages. I. Bacteriophages with contractile tails. Arch. Immunol. et Ther. Exp., 20: 621-679.
- . KRZYWY, T (1.972b). Ultrastructure of Shigella and Klebsiella - bacteriophages. II. Bacteriophages with non contractile tails. - Arch. Immunol. et Ther. Exp., 20: 893-920.

- . LANCET (1.971). Epidemiology of Klebsiella infections. Lancet I: 416-417.
- . LE BOUAR, Y (1.972). Technique en Bacteriologie. 1. Aerobies G. L. Dagnet, pág. 299-313. Flammarion. Paris.
- . LE MINOR, L (1.972). Le diagnostic de laboratoire des bacilles a Gram negativif. I. Enterobacteries. 4^e ed. La Tourelle. Saint-Mandé.
- . LEVY, A y JOURDAN, R (1.975). Contaminations intrahospitalières par micro-organismes. Masson. Paris.
- . LIEBANA UREÑA, J (1.977). Bacteriocinotipia y biotipia del género Klebsiella. Tesis Doctoral. Medicina. Granada.
- . LIEBANA UREÑA, J y cols. (1.978). Bacteriocinotipia del género-Klebsiella. Esquema de Slopek y Maresz-Babczysyn. Laboratorio, 65: 47-58.
- . LIEBANA UREÑA, J y cols. (1.978a). Biotipia del género Klebsiella. Laboratorio, 66: 25-31.
- . LOVESID, C y MOLTENI, O (1.976). La infección en terapia intensiva. Experiencia de dos años en una Unidad Polivalente. Revista - Clínica Española, 143: 31-34.
- . MAC FADDIN, J.F (1.976). Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams y Wilkins. Baltimore.

- . Manual BBL (1.974). Manual de procedimientos de laboratorios y de productos. 5ª ed. Editores asociados S.A. Mexico.
- . Manual Bio-Marieux (1.977). Bacteriología. Virología. Cultivos celulares.
- . Manual Difco (1.976). Manual de Bacteriología. Gráficas Marisa. Madrid.
- . MARESZ-BABCZYSZYN, J y cols. (1.967). Sensitivity of Klebsiella to bacteriocins produced by bacilli of homologous group. Arch. Immunol. et Exp., 15: 521-529.
- . MARESZ-BABCZYSZYN, J; MRO-KURPIELA, E y SLOPEK, S (1.967a). Sensitivity of Klebsiella bacilli to Frederiq's set of colicins. - Arch. Immunol. et exper., 15: 512-516.
- . MARESZ-BABCZYSZYN, J; MRO-KURPIELA, E y SLOPEK, S (1.967b). Sensitivity of Klebsiella bacilli to Abbott-Shanon set of colicins. Arch. Immunol. et Ther. exper., 15: 517-520.
- . MAZZEI, E.E y MASNATTA, G (1.971). Neumonias e infecciones respiratorias agudas no tuberculosas, pag. 35-53. Enfermedades infecciosas y parasitarias. Veronesi. El Ateneo. Buenos Aires.
- . MILCH, H y DEAK, S (1.964). Studies on Klebsiella infections by phage detection and phage typing. Acta Microbiol. Acad. Sci. - Hungar. 11: 251-261.
- . MILCH, H y DEAK, S (1.966). Phage sensitivity and lisogenity of

- Klebsiella strains. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 16: 268-294.
- . MONTGOMERIE, J.Z; TAYLOR, D.F.M; DOAK, P.B y NORTH, J.D.K(1.970). Klebsiella in faecal flora of renal-transplant patients. Lancet - II: 786-791.
 - . NOBLE, C.J y cols. (1.979). Klebsiella cross-infection with capsular serotypes 68 and 21. Lancet I: 832.
 - . NORIEGA, E.R y cols. (1.975). Nosocomial infection caused by gentamicin-resistant, streptomycin-sensitive Klebsiella. J. Infect. Dis., 131: 45-50.
 - . ØRSKOV, I (1.957). Biochemical types in the Klebsiella group. Act. Path., 40: 155-162.
 - . ØRSKOV, I (1.974). Gram negative facultatively anaerobic rods. Family I. Enterobacteriaceae. Genus VI. Klebsiella. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. pág. 321-324. 8ª ed. Williams y - Wilkins. Baltimore.
 - . PEDRO PONS, A (1.968). Patología Clínica. Tomo IV. 3ª ed. Salvat. Barcelona.
 - . POPOVICI, M y cols. Différenciation par les phages á l'intérieur du groupe Klebsiella, dans conditions épidémiologiques. Arch. - roum Path. exp. Microbiol., 977-982.
 - . PRICE, D.J.E y SLEIGH, J.D (1.970). Control of infection due to Klebsiella aerogenes in a neurosurgical unit by withdrawal of all antibiotics. Lancet II: 1.213-1.215.

- . PRZONDO-HESSEK, A (1.967). Bacteriophages of Klebsiella bacilli isolation, properties and use in typing. Arch. Immunol. et Ther. Exper. 14: 413-435.
- . PRZONDO-HESSEK, A y cols. (1.967). Serologic characterization of the Klebsiella bacteriophages of the Przondo-Hessek collection. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 15: 557-562.
- . PRZONDO-HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967a). Morphology and thermal-sensitivity of Klebsiella bacteriophages of the collection of -Przondo-Hessek. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 15: 547-562.
- . PRZONDO-HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967b). Typing of Klebsiella bacilli by means of Klebsiella bacteriophages from the collection of Przondo-Hessek. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 15: 563-577.
- . PRZONDO-HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967c). Typing of Klebsiella bacilli by means of the collection of Milch and Deak. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 15: 578-582.
- . PRZONDO-HESSEK, A y SLOPEK, S (1.967d). Comparative studies on-Klebsiella bacteriophages from the collection of Milch-Deak of Przondo-Hessek. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 15: 583-589.
- . PRZONDO-HESSEK, A; SLOPEK, S y MIODONSKA, J (1.968). Phage typing of Klebsiella rhinoscleromatis. Arch. Immunol. et Ther. - Exper., 15: 405-589.
- . PUMAROLA BUSQUETS, A y cols. (1.978). Comunicación personal.

- . RENNIE , R.P y DUNCAN, I.B.R (1.974). Combined biochemical and serological typing of clinical isolates. Appl. Microbiol., 28: 534-539.
- . RICHARD, C (1.973). Etude antigénique et biochimique de 500 - souches de Klebsiella. Ann. Biol. Clin., 31: 295-303;
- . ROMAN UREÑA, J (1.978). Aplicación epidemiológica de la biotipia en las infecciones hospitalarias por Klebsiella pneumoniae. Tesis Doctoral. Medicina. Granada.
- . ROSE, A.H (1.969). Microbiología química. Alhambra. Madrid.
- . SANCHEZ BUENAVENTURA, J y GARCIA SABATER, J.F (1.974). Serotipos del género Klebsiella. A proposito de un estudio en la provincia de Valencia. Laboratorio, 57: 9-18.
- . SELDEN, R y cols. (1.971). Nosocomial Klebsiella infections: - Intestinal colonization as a reservoir. Ann. Intern. Med., 74: 657-664.
- . SHINEBAUM, R; COCKE, E.M y BRAYSON, J.C (1.979). Acquisition of Klebsiella aerogenes by neonates. J. Med. Microbiol., 12: 201-205.
- . SLOPEK, S y MARESZ-BABCZYSZYN, J (1.967). A working scheme for typing Klebsiella bacilli by means of pneumocins. Arch. Immunol. et Ther. Exper., 15: 525-529.

- . THIEMKE, W.A y NATHAN, D.M (1.978). Simultaneous nosocomial outbreaks caused by multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* types 2 and 30. J. Clin. Microbiol., 9: 769-771.
- . TURNER, A.G y GRADDOK, J.G (1.973). *Klebsiella* in a thoracic - ICU. Hospitals, 47: 79-82.
- . WATT, P.S y OKUBADEJO, O.A (1.967). Changes in incidence and aetiology of bacteraemiae arising in hospital practice. Br. Med. Jour., 1: 210-211.
- . ZINSSER (1.967). Microbiología. 13ª ed. Hispano Americana. Mexico.