



Proteínas de membrana externa de *Serratia marcescens*

Estrella Cervantes-García,* Rafael García-González,* Paz María Salazar-Schettino*

Palabras clave:
Serratia marcescens,
 infección,
 electroforesis,
 inmunotransferencia.

Key words:
Serratia marcescens,
 infection,
 electrophoresis,
 immunoblotting.

* Departamento
 de Microbiología
 y Parasitología.
 Facultad de Medicina,
 Universidad Nacional
 Autónoma de México
 (UNAM).

Correspondencia:
 Estrella
 Cervantes-García
 Facultad de
 Medicina, edificio A,
 primer piso.
 Universidad 3000,
 Circuito Interior,
 04510, México, D.F.
 Teléfono: 5623 2390
 E-mail:
 estrellacervantes@
 yahoo.com

Recibido:
 23/01/2014.
 Aceptado:
 06/03/2014.

RESUMEN

Serratia marcescens es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, considerado un patógeno oportunista en pacientes immunosuprimidos. Es causa importante de infecciones de vías urinarias, de neumonías, septicemias, meningitis, bacteriemias, endocarditis, peritonitis y osteomielitis, así como productora de brotes intrahospitalarios. En las últimas décadas, se ha incrementado la frecuencia en brotes en unidades de terapia intensiva por este microorganismo. La mayoría de los estudios sobre esta bacteria se han enfocado en su caracterización fenotípica. Sin embargo, los antígenos de la membrana externa de *S. marcescens* han sido poco caracterizados, así como su relación con la patogenicidad.

ABSTRACT

Serratia marcescens is a Gram negative bacterium belonging to the Enterobacteriaceae family, that has become an important opportunistic pathogen associated with a number of life-threatening diseases and nosocomial infections, particularly of urinary and respiratory tracts infections in patients with debilitating illness and outbreaks of sepsis in special care units, in addition, is an important cause of many different illness like meningitis, sepsis, endocarditis and osteomyelitis. Most efforts have been directed at identifying the phenotype of *S. marcescens*. However little is known about the outer membrane antigens of this bacterium, and how they relate to its pathogenicity. Studies examining this question have looked mostly at the antigenic basis serum resistance.

INTRODUCCIÓN

Serratia marcescens es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* y que crece con facilidad en medios húmedos y comestibles, sobre todo en aquéllos que contienen almidón y carbohidratos, donde las colonias pigmentadas que aparecen en los alimentos son fácilmente confundidas con sangre. Los medicamentos en solución, instrumental médico, nebulizadores, catéteres, agujas, monitores y las cerdas de los cepillos de aseo también resultan ser una fuente de contaminación y causa de epidemias ocurridas en unidades de terapia intensiva. Otros factores de adquisición de infección por *S. marcescens* incluyen pacientes inmunodeprimidos que han sido sometidos a cirugía o que han tenido una terapia con corticoides. Por tanto, *S. marcescens* es un patógeno oportunista, asociado con un gran número de enfermedades que pueden conducir a la muerte del paciente, entre las que se incluyen infecciones nosocomiales.¹⁻⁴

S. marcescens puede ser miembro de la microbiota intestinal, tracto respiratorio, vías urinarias y aparato cardiovascular; se le encuentra en ambientes y reservorios pobres en nutrientes como el agua potable, cañerías e insumos hospitalarios (jabones, antisépticos, entre otros).⁴

Su adquisición es mayoritariamente hospitalaria, especialmente en la unidad de terapia intensiva,³ siendo las secreciones respiratorias, heridas y orina, los productos más frecuentes que provienen de sitios colonizados por esta bacteria.⁴ Clínicamente, las bacteriemias por *S. marcescens* se presentan con mayor frecuencia en pacientes con enfermedad de base como diabetes, neoplasias e insuficiencia renal crónica.⁵⁻⁸

Los brotes en adultos se relacionan con infecciones del tracto respiratorio o urinario, mientras que en la Unidad de Neonatos se localiza más en infecciones gastrointestinales, lo cual facilita la combinación cruzada y el desarrollo de brotes, debido a la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal, la piel y los

objetos inanimados empleados en las terapias, pudiendo incluso sobrevivir en desinfectantes.

La mayoría de los estudios sobre *S. marcescens* se han enfocado en su tipificación por pruebas bioquímicas, fagotipia, producción de bacteriocinas, antibiograma y serotipificación.^{9,10} Sin embargo, se conoce poco acerca de los componentes proteicos de esta bacteria y del papel que juega durante la infección.

Una característica de la familia *Enterobacteriaceae* es la presencia de una compleja envoltura compuesta por dos membranas distintas: una membrana externa y una membrana interna, las cuales contienen proteínas y fosfolípidos. La membrana externa posee lipopolisacáridos y es considerada una interfase entre la célula bacteriana y el medio ambiente. Su estructura es asimétrica, funciona como barrera semipermeable de moléculas hidrofílicas. Esto permite a la bacteria tomar los nutrientes y liberarlos como productos de desecho, permeable a macromoléculas, la cual selectivamente permite el flujo de pequeños solutos. La membrana externa contiene varias proteínas dentro de las cuales existen las llamadas porinas, que forman canales transmembranales a través de los cuales muchos solutos, antibióticos y otras sustancias pueden difundirse, además de estabilizar la envoltura celular. El tamaño y tipo de molécula capaz de difundirse a través de estos poros es fijado por el tamaño del canal de la porina y la especificidad iónica.

A pesar de que se han identificado clonas de *S. marcescens* que persisten por meses en unidades de cuidados intensivos, la mayoría de los brotes no son estudiados a fondo, por lo que no se ha podido establecer si se trata de la misma clona o de aislamientos de origen endógenos. En México, se ha reconocido la importancia de *S. marcescens* como una oportunista nosocomial y causante de epidemias, sin embargo, no se tienen suficientes datos de esta bacteria.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar las proteínas de membrana externa de *S. marcescens*, así como determinar la influencia de la temperatura en éstas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas. En este estudio se utilizaron dos cepas bacterianas: la 62-a88 y la 112-HV-88. La confirmación a nivel de especie se efectuó a través de pruebas bioquímicas y por la actividad de la DNAasa. Los biotipos de las cepas se determinaron de acuerdo con el método de Grimont & Grimont (1978), con pruebas bioquímicas basadas en la utilización de fuentes de carbono, reducción del tetracionato y producción del pigmento rojo.

Las cepas para los experimentos se conservaron en agar soya tripticasa (BBL), y para los cultivos y obtención de las proteínas de la membrana externa (PME) se utilizó

caldo soya tripticasa (BBL). La incubación de los cultivos se efectuó a temperaturas de 30 y 37 °C.

En la detección de hemólisis se empleó agar sangre (Oxoid) y se incubaron a dos temperaturas: 30 y 37 °C.

Obtención de las proteínas de membrana externa.

Las bacterias estudiadas se cultivaron en caldo soya tripticasa durante toda la noche en agitación constante a temperaturas de 30 y 37 °C. Las bacterias se cosecharon en fase logarítmica por centrifugación, después se rompieron utilizando una prensa francesa (método de Schnaitman) (1970) y por sonicación (método de Filip) (1973). Las bacterias intactas y fragmentos se removieron por centrifugación 100,000 xg 90 minutos a 21 °C. El precipitado se incubó con el detergente iónico TritonX-100 a 2% más MgCl₂, y el detergente Sarkosyl a 2%, se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las PME se obtuvieron por centrifugación a 60,000 xg 60 minutos, se resuspendieron en el amortiguador de la muestra y se guardaron a -20 °C hasta su uso.

Electroforesis de geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

de las PME. Se utilizaron dos métodos para una mejor resolución y visualización de las bandas. El primero fue el método de Laemmli (1970).¹³ La muestra se puso en el amortiguador tris-HCl 10 mM pH 8, conteniendo 2% de SDS y β-mercaptoetanol, calentándose a 100 °C por 5 minutos; después, se cargó el gel para su corrida utilizando 12% de acrilamida, 0.33% bisacrilamida y 0.1% de SDS. El segundo método fue muy similar, excepto que se añadió urea; 8% de acrilamida, 0.24% bisacrilamida, 0.1% SDS y 8M de urea Uemura & Mizushima (1975).¹⁴ En ambos sistemas la muestra del gel de carga consistió en 4.5% de acrilamida y 0.12% de bisacrilamida y 0.1% de SDS.

Las proteínas de la membrana externa se mezclaron con el amortiguador para la electroforesis (1% de SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 20% de glicerol y 0.01% de azul bromofenol), la mezcla se sometió a ebullición. Después se cargó el gel con 10 µg de proteínas en cada pozo y se realizó el corrimiento de la electroforesis a 100 V durante una hora. Las proteínas se visualizaron tiñéndolas azul de Coomassie y se utilizaron pesos moleculares para curvas estándar (Bio-rad).

Concentración de proteínas. La cuantificación de las proteínas se realizó utilizando el método de Lowry (1951).¹⁵ Se utilizó albúmina sérica para obtener la curva de calibración y el reactivo de Folin- Ciocalteu.

Preparación de los antisueros. La obtención de los antisueros fue a través de la administración de diferentes concentraciones de PME de ambas temperaturas, en conejos blancos de Nueva Zelanda de 3.5 kg. Éstos se inyectaron en intervalos de tres días vía subcutánea, durante un mes. Finalmente se sangraron a blanco, y se obtuvo el suero para los experimentos.

Inmunoelectrotransferencia de las PME. Las PME separadas en SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad), siguiendo el método de Towbin et al. (1979);¹⁶ se utilizaron sueros obtenidos en los conejos y sueros de humanos a una dilución de 1:100 y 1:200, respectivamente. Con el fin de verificar que se realizó la transferencia, se cortaron dos tiras de papel de nitrocelulosa que contenía los pesos moleculares y otra con las proteínas se tiñeron con negro de amido al 0.1% con ligera agitación.

ELISA. Para comprobar la presencia de anticuerpos contra las PME en los sueros de conejos inmunizados, se empleó la técnica de ELISA, utilizando plazas de microtitulación de 96 pozos (Immulon y Dynatech, Labs Inc.). Se empleó antiinmunoglobulina de conejo conjugada a peroxidasa (Sigma, Co). Las placas se leyeron a 490 nm, en un microelector de Elisa (Behering, Germ).

RESULTADOS

Al comparar los diferentes procedimientos para la obtención de las PME, observamos que la sonicación y el Sarkosyl dieron los mejores resultados.

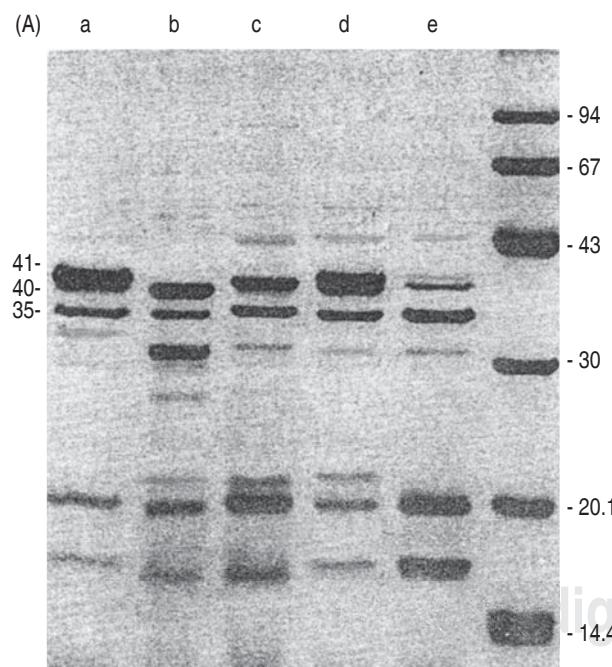


Figura 1. Muestra los geles de electroforesis (A) estándar de acuerdo al método de Laemli (1970). Línea a) cepa 62-HV-88 cultivada a 37 °C; b) la misma cepa cultivada a 30 °C; c) cepa 112-HV-88 cultivada a temperatura de 37 °C; d) misma cepa cultivada a 30 °C, y e) cepa control, última línea marcadores de pesos moleculares.

La electroforesis de las PME detectaron aproximadamente 12 bandas de proteínas en ambas cepas incubadas a diferentes temperaturas, aparentemente no se observaron diferencias. En la figura 1, con el método estándar de SDS-PAGE 12% se pueden observar bandas más intensas a 37 °C que a 30 °C, con pesos de 39, a 41 kDa.

Con el sistema de SDS-PAGE con urea la separación de las bandas fue mejor. Se observan tres bandas de 45, 44, y 43 kDa, detectadas en la región de las porinas. Sin embargo, se observa que la banda de 45 kDa es más intensa que la de 44 kDa en ambas cepas (figura 2).

En la inmunotransferencia de los sueros de los enfermos a una dilución 1:100 se reconocieron tres bandas la de 45, 18 y 71 kDa. La banda de 45 kDa fue reconocida con mayor intensidad que las otras. Los sueros hiperinmunes de los conejos incubados con el extracto de las PME incubadas a ambas temperaturas reconocen las mismas cuatro bandas, pero en la de 45 kDa es más evidente su intensidad comparadas con las de 71, 28 y 18 kDa.

La detección de anticuerpos por la técnica de ELISA para probar la especificidad del análisis inmunoenzimático se utilizaron sueros de conejos no infectados y sueros de los conejos inmunizados con las PME. Observamos que los sueros de los conejos inmunizados dieron valores

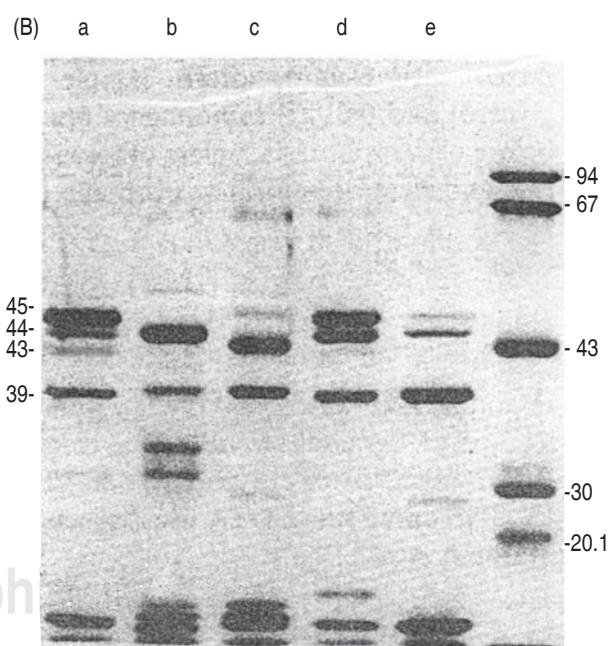


Figura 2. Muestra las bandas de los geles con urea por electroforesis. Línea a) cepa 62-HV-88 cultivada a 37 °C; b) la misma cepa cultivada a 30 °C; c) cepa 112-HV-88 cultivada a temperatura de 37 °C; d) misma cepa cultivada a 30 °C, y e) cepa control, última línea marcadores de pesos moleculares

promedios de 0.936, 0.986, 0.985 y 0.998 de absorben-
cia y los sueros de conejos no inmunizados sanos dieron
promedios bajos como 0.112, 0.110, 0.100.

Existen reportes de que algunas cepas de *S. marcescens* aisladas de pacientes hospitalizados producen hemólisis. Para comprobar si las cepas estudiadas en este trabajo tenían esa característica, las cepas fueron incubadas a las temperaturas de 30 y 37 °C en agar sangre. Observamos que a 30 °C se produjo una β-hemólisis que va aumentando a medida que disminuye la temperatura. Cuando se incubaron a 37 °C se observó alfa hemólisis o no hubo hemólisis.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los últimos años, las PME de bacterias Gram negativas han sido objeto de numerosos estudios encaminados a determinar el papel que desempeñan en la relación huésped-parásito. La mayoría de éstos se han realizado en *Escherichia coli*, de la que se han tomado como base las técnicas de extracción y los perfiles proteicos. Los estudios de la composición de la membrana externa fueron realizados por Miura y Mizushina, quienes lograron separar la membrana citoplasmática de la membrana externa de *Escherichia coli*. De estos estudios iniciales, siguieron otros encaminados a conocer la estructura y función de las proteínas de la membrana externa. Schnaitman (1970) estudió el patrón electroforético en PAGE-SDS de las PME de *E. coli*, donde observó una banda de 40 kDa, que constituía 70% de las proteínas totales de la membrana, y demostró que la misma banda proteica estaba constituida por cuatro proteínas diferentes a las que nombró 1a, 1b, 3a y 3b.

En nuestro estudio, comparamos dos detergentes con el fin de obtener mayor cantidad de PME como fueron TritonX-100 y una prensa francesa, y Sarkosyl y un sonificador; en ambos sistemas se necesita tener las células en baño de hielo y manejar intervalos de tiempo para el rompimiento de la célula, además con el detergente Triton X-100 se necesita añadir MgCl₂, porque destruye ambas membranas, no siendo así con el Sarkosyl, el cual es más efectivo para separar la membrana externa del resto de los componentes, tal como lo pudimos observar al medir la concentración de PME obtenidas por ambos métodos.

Por el método de Schnaitman,¹¹ observamos una banda proteica de aproximadamente 45 kDa parecida a la que describe este autor, el problema que se tiene con este método es que se pierde demasiado material y para evitar la solubilización de la membrana externa tenemos que agregar MgCl₂. Sin embargo, con el método descrito por Filip,¹² pudimos obtener mayor cantidad de PME, ya

que con el Sarkosyl la membrana externa (ME) permanece intacta, porque solubiliza la pared celular y la membrana interna. Estas mismas proteínas fueron estudiadas por otros investigadores (Intuye, 1973; Bragg, 1972; Henning, 1976; Mizushina, 1975; Lugtemberg, 1975) cada uno de ellos las denominó en forma diferente de acuerdo con su criterio. Posteriormente Osborn y Wu (1980) reclasificaron estas proteínas en tres grupos diferentes con base en su estructura y función en: proteínas matrices o porinas, proteínas modificables por el calor y la lipoproteína de Braun.²³ Nakae y Nikaido (1975) demostraron que la función de estas proteínas eran formar poros de difusión a las que denominaron porinas y a la proteína modificable por el calor la nombraron Tolú porque al separarla por PAGE-SDS y calentarla modificaba su peso. Esto lo pudimos observar en este trabajo con *S. marcescens*, donde se sometieron a calentamiento las muestras problema y observamos que una proteína podía dividirse en otras que se encontraban en el rango de 45 kDa. Junto a este grupo de proteínas principales se encuentran varias proteínas menores, llamadas así por estar en menor cantidad. En *S. marcescens*, podrían ser estas proteínas las cuales se ven más tenue en los geles de electroforesis que otras. En algunas investigaciones se han asociado estas proteínas con la adhesión e invasión bacteriana como ha sido observado con *S. marcescens*, que puede adherirse a diferentes sustratos, lo cual puede ocurrir en el humano y provocar infecciones severas, también se han relacionado con la resistencia que presentan ciertas bacterias al efecto bactericida del suero humano normal.¹⁸⁻²¹

Algunos autores como Buchanan y Arko, estudiaron la efectividad de estas proteínas como inmunógenos protectores. En *S. marcescens* también, podría tratarse de inmunógenos, las proteínas reconocidas tanto con los sueros de los pacientes, como con los conejos infectados por la bacteria, ya que en ambos reconocieron varias proteínas como la de peso molecular de 45 kDa, que podría ser un buen inmunógeno que protegiera contra la enfermedad.²²

De *S. marcescens* poco se conoce acerca de los componentes antigenicos de la membrana externa y la relación que tienen con su patogenicidad. Los trabajos realizados por Puig y cols. (1982), a semejanza de los que obtuvimos estudiando ambas temperaturas, no manifestaron diferencia alguna en el patrón proteico. Sin embargo, se observó que sí hay diferencia a temperaturas menores. Maoulin et al., (1990) mencionan la intensidad en la observación de la proteína 45 kDa tal como la encontramos. Sus trabajos se encaminaron a tratar de ubicarla como porina y la función de ésta. En este trabajo observamos 12 bandas unas con mayor intensidad que otras, con

un rango de pesos moleculares de 18 a 75 kDa, que al purificarlas y estudiarlas con mayor profundidad podrían utilizarse para el diagnóstico en futuros brotes. Las PME de bacterias cultivadas e incubadas a 30 y 37 °C, con los sueros de los conejos inmunizados reconocieron cuatro bandas de 45, 71, 18 y 28 kDa, estas últimas se visualizan con menor intensidad. Esto se verificó con los sueros de conejos sanos donde no hubo reconocimiento alguno. Con los sueros de pacientes se observaron resultados similares en el reconocimiento de las bandas. Con lo que podemos deducir que la banda de 45 kDa, podría servir para elaborar un inmunógeno en un futuro para un diagnóstico oportuno.²⁴⁻²⁶

Por ELISA observamos que los títulos de anticuerpos fueron muy altos, por lo que comprobamos que sí pudieron infectarse los animales de experimentación, como lo mencionamos anteriormente. Este método estandarizado con los extractos PME podrían servir para el diagnóstico oportuno de la enfermedad en cuanto se sospeche de algún enfermo infectado por *S. marcescens* y dar un tratamiento antimicrobiano adecuado para un recuperamiento rápido.¹⁷ También, pudimos comprobar que ambas cepas estudiadas poseen un factor hemolítico que estimula la liberación de mediadores de la inflamación, la histamina y leucotrienos in vitro, lo que sugiere que tiene un papel en la patogenicidad de la bacteria. En nuestro estudio pudimos observar al cultivar las cepas a ambas temperaturas en el medio de agar sangre, que a menor temperatura la hemólisis era mayor y disminuía a temperaturas altas. Para determinar bien el papel de esta hemolisina, requerimos de más estudios, y con ello evitar un mayor daño en los pacientes hospitalizados e infectados por esta bacteria.²⁷⁻²⁹

REFERENCIAS

- Grimont & Grimont. The genus *Serratia*. J Gen Microbiol. 1977; 72: 215-248.
- Grimont PA, Grimont F. Biotyping of *Serratia marcescens* and its use in epidemiological studies. J Clin Microbiol. 1978; 8: 73-78.
- Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. J Med Microbiol. 1997; 46: 903-912.
- Mahlen SD. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clin Microbiol Rev. 2011; 24: 755-791.
- Berthelot P, Grattard F, Amerger C et al. Investigation of a nosocomial outbreak due to *Serratia marcescens* in a maternity hospital. Infect Control Hosp Epidemiol. 1999; 20: 233.
- Fleisher F, Zimmerman-Baer U, Zbinden R et al. Three consecutive outbreaks of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. Clin Infect Dis. 2002; 34: 767.
- Haddy RI, Mann BL, Nadkami DD, Cruz RF, Elshoff DJ, Buendia FC et al. Nosocomial *Serratia marcescens* infections associated with extrinsic contamination of a liquid nonmedicated soap. Infect Control Hosp Epidemiol. 2000; 21 (3): 196-199.
- Yu WL, Lin CW, Wang DY. *Serratia marcescens* bacteremia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of the isolates. J Microbiol Inmunol Infect. 1998; 31 (3): 171-179.
- Hejazi A, Falkiner FR. *Serratia marcescens*. J Med Microbiol. 1997; 46: 903-912.
- Mahlen SD. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. 2011; 24: 755-791.
- Schnaitman C. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by TritonX-100. J Bacteriol. 1971; 108: 545-552.
- Filip C, Fletcher J. Solubilization of cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by ionic detergent sodium laurel sarcosinate (Sarkosyl). J Bacteriol. 1993; 115: 717-722.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680-685.
- Uemura J, Mizushima S. Isolation of outer membrane proteins of *Escherichia coli* and their characterization of polyacrylamide gel. Biochimica Biophysica Acta. 1975; 12: 368-372.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193: 265-275.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76: 43-50.
- Challacombe S. Application of ELISA to microbiology. ELISA and other solid phase immunoassays. New York: John Wiley & Sons; 1988: pp. 319-355.
- Miura T, Mizushima Y. Separation and properties of outer membrane cytoplasmic membranes in *Escherichia coli*. Biochimica Biophys Acta. 1969; 193: 268-272.
- Bragg P, Hot C. Organization of protein in the native and reformed outer membrane of *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta. 1972; 274: 478-488.
- Lutenberg B, Meijers J, Joeck P, Alphen L. Electrophoretic resolution of major outer membrane protein of *Escherichia coli* K12 into four bands. FEBS Lett. 1975; 58: 254-258.
- Osborn MJ. Proteins of outer membrane Gram negative bacteria. Ann Rev Microbiol. 1980; 26: 369-378.
- Buchanan TM, Arko RJ. Immunity to gonococcal infections induced by vaccination with isolated outer membrane of *Neisseria gonorrhoea* in Guinea pigs. J Infect Dis. 1977; 135: 879-887.
- Braun V, Rhen K. Chemical characterization spatial distribution and function of lipoprotein in membrane structure of *Escherichia coli*. Eur J Biochem. 1969; 10: 426-432.
- Puig M, Fusté C, Viñas M. Outer membrane proteins from *Serratia marcescens*. Can j Microbiol. 1993; 39: 108-111.
- Malouin F, Campbell GD, Halpenny M, Becker GW, Parr TR. Outer membrane porins characteristics of *Serratia marcescens* growth in vitro and in rat intraperitoneal diffusion chambers. Infection and Immunity. 1990; 58: 1247-1253.
- Hutsul J, Worobec E. Molecular characterization of a 40 kDa OmpC-like porin from *Serratia marcescens* porin protein. Can J Microbiol. 1994; 140: 379-387.
- Schonherz R, Higles M, Broer S, Bens R, Braun V. Interaction of *Serratia marcescens* hemolysin (ShIA) with artificial and erythrocyte membranes. Eur J Biochem. 1994; 223: 655-663.
- Ruan Y, Braun V. Hemolysin as a marker of *Serratia marcescens*. Arch Microbiol. 1990; 154: 221-225.
- Poole K, Schiebel E, Brau V. Molecular characterization of the hemolysin determinant of *Serratia marcescens*. J Bacteriol. 1988; 170: 3177-3188.