



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS.

Diferenciación de cepas de Pseudomonas
aeruginosa aisladas de pacientes y de
medio ambiente extrahospitalario.

T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a:

Isidro Oropeza Martinez.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE GENERAL

	Pág.
Introducción	1
Características generales de género <i>Pseudomonas</i>	2
Características generales de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
Pilis	8
Cápsula	10
Pared Celular	12
Peptido glican	12
Espacio periplásmico	15
Membrana externa de pared celular	16
Lipopolisacárido	18
Membrana citoplásmica	19
Pigmentos	21
Aeruginocinas	22
Toxinas y Exoenzimas	23
Toxina letal A	24
Exoenzima S	26
Leucocidina	27
Lecitinasa	27
Enzimas Proteolíticas	28
Toxinas Hemolíticas	32
Enterotoxinas	33
Justificación del trabajo	35
Objetivos	36
Material	37
Método	42
Resultados	50
Discusión	54

	Pág.
Conclusiones	61
Tablas	62
Bibliografía	78

INTRODUCCION

Algunas enfermedades como la diabetes, las infecciones renales, la cirrosis hepática, la fibrosis quística, las neoplasias y daños térmicos, facilitan la colonización de los pacientes por microorganismos oportunistas, que aprovechan la --
menhua potencial de los mecanismos específicos e inespecíficos de inmunidad. Otros factores, que contribuyen a la coloniza-
ción y posterior infección, son: la interrelación del pacien-
te con el medio hospitalario a través del contacto con otros
enfermos, con el personal médico y paramédico, así como la ---
existencia de un factor endógeno que puede ser el punto de par-
tida de un proceso infeccioso (1, 2, 3).

En el caso de traumatismo térmico, los microorganismos oportunistas son causa de infecciones nosocomiales, que condu-
cen en un porcentaje variable a la muerte del paciente (2).

Este tipo de infecciones presentan variación en su pa-
trón etiológico conforme se han venido desarrollando diferen-
tes medidas terapéuticas, basadas en la administración de agen-
tes antimicrobianos, que al generar presiones selectivas en la
ecología microbiana favorecen a los organismos mejor capacita-
dos para subsistir (3).

En los años treinta *Streptococcus pyogenes*, fue el patógeno más frecuentemente aislado, causante de infecciones fulmi-

antes que al producir toxicidad general, conducían a la muerte temprana del paciente, sin embargo su frecuencia disminuyó con la utilización de penicilina. Esto trajo consigo un predominio de otros microorganismos como *Staphylococcus aureus*, aislado en el 75% de los pacientes que fallecieron por septicemia en la década de los 50. En la actualidad, otros microorganismos como *Klebsiella*, *Proteus*, *Escherichia*, *Providencia*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, presentan un aumento en su frecuencia, cada vez mayor (3).

Otros microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, se han visto favorecidos por los fármacos utilizados en el tratamiento de los pacientes con traumatismo térmico, alcanzando una frecuencia mayor que *S. aureus* (3), pertenece a la familia Pseudomonadaceae, que fue descrita por Winslow, Broadhurst, Buchanan, Kruwiede, Roger y Smith en 1917; agrupa a bacilos Gram negativos rectos, aunque es posible encontrarlos curvos, de 1.5 a 3 micras de longitud, y hasta 4 micras en el caso de cepas fluorescentes y en algunas cepas de *Pseudomonas putida* (4)

Bajo la observación con microscopio óptico no es posible visualizar estructuras citoplasmáticas adicionales, a no ser el acúmulo de polímeros de beta hidroxibutirato que se observa cuando algunas especies crecen en medios de cultivo pobres en nitrógeno y se examinan con microscopio de contraste de fase (5). Con el uso de microscopía electrónica, Kamamoto en 1967, observó estructuras tubulares conocidas como raptosomas en *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chloronaphis*, *P. putida*,

P. boreopolis y *P. fragi*, las evidencias actuales hacen pensar en la presencia de bacteriocinas (6). Las células de la familia Pseudomonadaceae, se mueven activamente por la presencia de flagelos polares, con excepción de *P. mallei* (4, 6).

Estos microorganismos son quimiorganotróficos, con metabolismo respiratorio y nunca fermentativo, por lo cual se les considera aerobios estrictos, tienen al oxígeno molecular como aceptor final de electrones, excepto aquellas especies que son capaces de usar los nitratos y arginina como aceptor alterno lo que les permite una respiración anaerobia (4).

El género *Pseudomonas* fue descrito por Migula en 1896, y presenta las mismas características de la familia. Desde 1966 se ha discutido la problemática de la clasificación por Stainer y sus colaboradores, debido a que los parámetros fisiológicos para diferenciar una especie de otra dentro del género, es complicada, ya que en ocasiones difieren por una sola característica fenotípica, como es el caso de *P. putida* y *P. fluorescens*, que se distinguen por la licuefacción de la gelatina. Las especies que son patógenas de plantas también presentan problemas similares a las especies saprófitas, debido a que cada organismo no tiene especificidad para un hospedero, ni para el tipo de lesión que producen. Hasta el momento se consideran 26 especies bien caracterizadas y más de 200 cepas adicionales de posición incierta (4)

Las especies pertenecientes a este género están ampliamente distribuidos en la naturaleza, existiendo como

saprófitos en aguas de ríos, lagos, lagunas, mar, suelos y plantas, donde sus actividades son importantes, en la mineralización de la materia orgánica (7). La mayoría no requieren factores de crecimiento y pueden desarrollarse en medios minerales con un compuesto orgánico como única fuente de carbono y energía. Debido a ésta gran diversidad nutricional, hay cepas que pueden utilizar más de 100 sustratos diferentes, como es el caso de *P. cepacia*, la cual es capaz de aprovechar más de 105 compuestos orgánicos (4). En la naturaleza se ha encontrado que son capaces de desintegrar una amplia variedad de compuestos orgánicos, como algodón, celulosa, agar, naftaleno, fenoles hidrocarburos y resinas (8). Requieren aminoácidos o vitaminas adicionales para su desarrollo. El acetato puede ser utilizado como nutriente principal por todas las especies, así como el lactato, el succinato y la glucosa (4).

En las especies como: *P. putida*, *P. chichorli*, *P. fluorescens*, *P. aerofaciens*, *P. chlororaphis*, *P. syringae*, *P. aeruginosa*, se ha observado la producción de pigmentos fluorescentes de color verde-amarillo, particularmente en medios deficientes de fierro; también hay cepas productoras de pigmentos no fluorescentes de fenazina, difusibles e insolubles, de color azul, rojo, amarillo o verde, como en *P. cepacia*. Otras especies como *P. mendocina*, posee carotenoides intracelulares. En algunas cepas, en ciertos medios, se pueden acumular subproductos coloreados, resultantes del metabolismo, especialmente en los que contienen compuestos orgánicos, aromáticos y heterocíclicos, que al oxidarse van a producir productos fluorescentes (4).

La temperatura óptima de crecimiento es de cerca de los 30°C, pero se pueden desarrollar en un intervalo de 4 a 43°C crecen bien a pH neutro o alcalino (7.0-8.5), en medios con pH de 6.0, ó menor a este las cepas no se desarrollan (4).

Exhiben grados variables de especificidad al parasitar a los diferentes hospederos. Los podemos encontrar como patógenas de plantas, como es el caso de *P. syringae*, la que se aisló originalmente de la flor de lila, ataca al frijol, tomate, etc.; *P. caryophylli* ataca al clavel; *P. cepacia* se describió primeramente como un fitopatógeno que causa putrefacción del bulbo de la cebolla llamada "piel amarga" (9); *P. septica* ocasiona enfermedades en las orugas; *P. neptilovora* produce enfermedades en ciertos reptiles y peces; *P. solanacearum* se encuentra involucrada en daño sobre vegetales comestibles (9 y 10).

Entre los patógenos oportunistas pertenecientes a este género tenemos a: *P. stutzeri*, comensal del tracto respiratorio y órganos genitales de los humanos, en ocasiones se asocia a procesos infecciosos como septicemias, artritis, infecciones postoperatorias y post-traumáticas de las extremidades; *P. alcaligenes* se ha relacionado con empiema e infecciones del ojo; *P. fluorescens* y *P. putida*, son parte de la flora orofaríngea normal y de heridas. Se han asociado también con infecciones del tracto urinario con infecciones de heridas y con artritis séptica, puede formar abscesos; *P. cepacia*, es un patógeno oportunista que provoca infecciones de tipo nosocomial (9).

P. pseudomallei se conoce como el bacilo de Witmore, - causa la enfermedad conocida como melioidosis, un mal endémico de humanos y animales en el sureste de Asia, Birmania, -- Tailandia, Indonesia y Australia. Esta enfermedad se transmite cuando el agua o el suelo contaminados penetran en las - ceraciones y raspaduras de la piel y raramente se transmite de persona a persona (10). *P. mallei* es un patógeno especia - lizado de mamíferos, produce la enfermedad del muermo, que - por lo regular únicamente se encuentra en los solípedos (ca - ballos, asnos, mulas); es transmitida al hombre por contac - to directo debido a raspaduras de piel o inhalación, pueden transmitirse de persona a persona (9, 10). *P. maltophilia* - es un organismo con una amplia distribución geográfica, se ha obtenido de casi todos los sitios sobre o dentro del cuerpo, se ha asociado con infecciones oportunistas en seres humanos incluyendo endocarditis, septicemia, neumonía lobar, conjun - tivitis, meningitis, infecciones de heridas y absesos (9).

P. aeruginosa, es un microorganismo con una baja viru - lencia para humanos. Sin embargo puede causar infecciones severas en pacientes debilitados por quemaduras, tumores ma - lignos o enfermedades crónicas (11).

P. aeruginosa, fue caracterizada completamente por Mí - gula en 1900. Ha recibido varios nombres; en 1872 Schroe - ter le donominó *Bacterium aeruginosum*; Cohn en 1872 *Bacterium aerugineum*; Zopf en 1884 *Micrococcus placyaneus*; Trevisan en -- 1885 *Bacillus aeruginosus*; Flugge en 1886 la clasificó como

Bacillus pyocyaneus (4).

P. aeruginosa es un bacilo parecido a los coliformes, al microscopio se presenta como bastones delgados con un tamaño de 0.5-0.6 micras de ancho y de 1.5-3.0 micras de largo. Presenta movimientos muy activos por la presencia de un flagelo polar. Se tiñen fácilmente con los colorantes de anilina, y es negativo a la coloración de Gram (9).

No requieren factores de crecimiento orgánicos, ya que nutricionalmente son muy versátiles. Las cepas de esta especie pueden utilizar de 76 a 82 ó más compuestos orgánicos diferentes para desarrollarse (Stannier y col., 1966) (4). Su metabolismo es respiratorio, nunca fotosintético, ni fermentador. Debido a esto se ha distinguido como un organismo no fermentador de lactosa, glucosa, sacarosa, fructosa, arabinosa, maltosa, manitol y dulcitol. En cambio, es capaz de realizar la oxidación de la glucosa en compuestos intermedios o en forma ácido glucónico ó 2-cetoglucónico. Se pueden desarrollar en temperaturas de 5°C a 42°C, pero su temperatura óptima se encuentra en el rango de 30-37°C (9).

La mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* pueden sintetizar diferentes pigmentos, tales como: pioverdina el cual es soluble en agua e insoluble en cloroformo, produce fluorescencia, la que es observada en el medio de infusión cerebro corazón dializada y agar leche descremada (DBHI-SMA), como una coloración verde-amarilla y café-amarillo. Píomelanina es un

pigmento café o negro soluble en agua, en cual ha sido reportado por Liu en cepas no móviles (12). Piorrubina es un pigmento rojo, soluble en agua; existen dos tipos: el A y el B. Piocianina este pigmento sólo es producido por esta especie; fue aislado en 1860 por Fordos y es pigmento de fenizana no fluorescente, azul, soluble en agua y en cloroformo (9).

Frecuentemente, en los medios de cultivo de *P. aeruginosa*, es característico un olor a uvas, el cual es importante en el diagnóstico de esta especie. El componente responsable del olor ha sido identificado como el 2 aminoacetofenona con la ayuda de un espectrómetro de masas (13).

CARACTERISTICAS GENERALES DE *Pseudomonas aeruginosa*.

PILI.

Los pili o pelos de las bacterias son apéndices filamentosos, más delgados que los flagelos y de una longitud variable; están constituidos por proteínas denominadas pilina. Los más conocidos son los pili F de *Escherichia coli*, especializados en procesos de conjugación de plásmidos F/1 y tienen un peso molecular de 12 000 (14).

En estudios realizados por Fuerts y Hayward en 1969, en el género *Pseudomonas*, observaron que los pili están localizados polarmente en ocho especies: *P. aeruginosa*, *P. acidovarans*, *P. testoteroni*, *P. maltophilia*, *P. alcaligenes* y en *P. solanacearum*; por otro lado *P. cepacia* y *P. fragi* presentan pilis periféricos (6).

Cuatro diferentes tipos de pili han encontrado asociados a cepas de *P. aeruginosa*. El pili RP4 está compuesto por filamentos rígidos de 8 nm de grosor y una longitud promedio de 300 nm. Actúan como receptores para fagos específicos P de ARN. Estos fagos RP 4 tienen una cola fácilmente separable con una vaina pequeña, la cola y la vaina son capaces de fijarse sobre la bacteria y son portadores de plásmidos: P, N y W. Los plásmidos P confieren resistencia a agentes antimicrobianos. El segundo tipo de pili es el R 130 cuyas dimensiones no han sido determinadas, son similares a los pili PSA, pero no están insertados polarmente. Se les ha encontrado en *P. aeruginosa*, portadores de plásmidos R-130 del grupo P-2. El tercer tipo de pili es el W que tiene un grosor de 12 nm, con una longitud promedio de 450 nm es flexible, se encuentra en números pequeños en *P. aeruginosa*, transporta plásmidos W los cuales son sensibles a los fagos PR 4 (15, 16).

Muchas cepas de *P. aeruginosa* tienen pilis polares y se les ha designado como PSA, se encuentran en número variable. Están constituidos por filamentos flexibles de un grosor de 6 nm, y una longitud variable de 100 a 5 000 nm, con un promedio aproximado de 2 500 nm, tienen un peso molecular de 17 500 daltones. Estos pili son producidos a temperaturas de 10°C a 44°C. No se encuentran determinados por plásmidos, por lo que su origen permanece desconocido. Tienen la propiedad de actuar como receptores de varios bacteriófagos, como por ejemplo el fago de ARN PP7, el número de virus depende del pH, generalmente a pH 8.4 del medio, sólo se observa un fago, pero

a un pH de 6.8 se han encontrado hasta 10 fagos por bacteria. Los fagos filamentosos que contienen ADN solamente se han aislado en cepas filamentosas de *P. aeruginosa*. Los pili PSA también son capaces de absorber colas no contráctiles de bacteriófagos mediante un mecanismo de retracción del pili (14,17).

La composición del pili PSA, ha sido establecida por procesos de purificación, cada subunidad de polipéptidos, contienen 43% de residuos de aminoácidos hidrofóbicos, llegando a tener un bajo nivel de hélice, con un punto isoeléctrico de 3.9, no presentan residuos de fosfato, hidrocarburos, lípidos, ni histidina (17).

FLAGELOS.

Los flagelos son apéndices filamentosos, largos (3-12 micras) finos y ondulados, con grosor de 120 a 250 Å; se presentan en forma de cadenas enrolladas de triple hélice, compuestas por una proteína denominada flagelina, con un peso molecular de 40 000. El flagelo se encuentra unido a la membrana plasmática por el cuerpo basal, los filamentos pasan a través de cuatro anillos delgados y paralelos, que constituyen puntos de contacto con las diversas capas de la envoltura celular. En *P. aeruginosa* este flagelo es polar (6, 18).

FALSA CAPSULA O GLICOCALIX.

El glicocálix como estructura característica de algunas bacterias patógenas se encuentra formado por una masa de largas fibras de polisacáridos, sintetizados por polimerasas

del tipo de la glucosiltransferasa y fructosil-transferasa -- asociadas al lipopolisacáridos de la pared celular (19).

En *P. aeruginosa* este polisacárido ha sido caracterizado y se ha encontrado que es un polímero de 90 000 daltones de peso molecular, compuesto únicamente por ácido glucónico. Como consecuencia de los métodos empleados en la extracción y caracterización del glicocálix, su composición es contradictoria (20). Químicamente los polisacáridos del glicocálix contiene hexosas, aminoazúcares, ácido urónico, pequeñas cantidades de heptosa, material reactivo thioarbitúrico y lípidos (21), utilizando cromatografía de gases se han identificado varios ácidos grasos que son el ácido miristóleico, el laúrico, el mirístico, el palmítico, el estearico, el oleico, el linoleico y otros tres no identificados. Entre los carbohidratos se encuentra; ramnosa, glucosa, manosa y galactosa -- (21).

El glicocálix tiene como función permitir a las bacterias adherirse a células animales o vegetales e incluso a otras bacterias por yuxtaposición de su estructura. Esta unión puede establecerse a través de la atracción ejercida por proteínas del tipo de las lectinas, así como de cationes divalentes que existen en el medio ambiente que faciliten la adherencia entre las bacterias y las células eucarióticas -- (19). Algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir un grueso glicocálix entre la unión bacteria-bacteria para formar microcolonias y entre la unión bacteria-epitelio; estos agregados de bacterias resisten la fagocitosis por má-

crófagos y leucocitos polimorfonucleares (22), la acción de anticuerpos y del complemento activado, a los antibióticos, a bacterias depredadoras y a bacteriófagos (19). El glicocálix posee las características de un factor de virulencia y actúa como un antígeno protector, su actividad letal no es afectada por el tratamiento al calor durante 15 minutos a 100°C (23).

Las cepas de *P. aeruginosa* difieren en sus respuestas a las diversas condiciones del medio ambiente, bajo limitaciones de nitrógeno, fósforo, sulfato, se incrementa la síntesis de polisacáridos que constituyen el glicocálix. También influyen en su desarrollo el pH, la ruta de carbón utilizada, el requerimiento de oxígeno, de minerales y la temperatura (24).

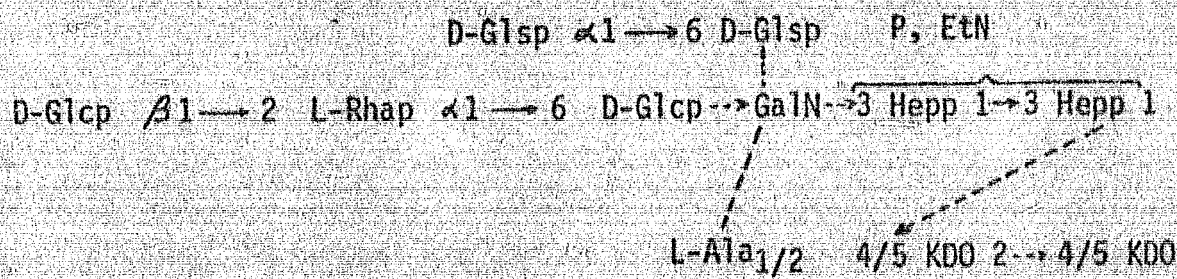
PARED CELULAR.

La pared celular está constituida por varias capas: observándose de adentro hacia fuera; tenemos, el peptidoglican (3nm), espacio periplásmico y la doble membrana externa de 7 nm (6).

PEPTIDOGLICAN.

El peptidoglican está compuesto por una pequeña cantidad de aminoácidos y dos azúcares. La N-acetilglucosamina (GlcNac) y el N-acetilmurámico (Mur-Nac), éstos se encuentran unidos por enlaces B-1-4, un tetrapéptido formado por residuos de aminoácidos D y L alternos y un enlace péptidico que

une al grupo carboxilo terminal de un tetrapéptido (posición 4) con un grupo NH_2 ó COOH libre en uno de los tetrapéptidos vecinos (Fig 1).



Sobre estas características básicas, aparecen numerosas variaciones en los aminoácidos 2 y 3 del tetrapéptido, así como en la estructura y frecuencia del puente cruzado. Estas estructuras cruzadas no sólo convierten el esqueleto formado por cadenas de polisacáridos en una estructura bidimensional, sino que además, forman puentes entre las distintas capas de la pared, lo que impide separarlas en preparaciones de membranas aisladas. La dureza y rigidez del peptidoglican se debe en parte a los enlaces B-1-4, los cuales hacen que la cadena de polisacáridos resulte compacta y resistente: este tipo de enlace los encontramos en la quitina (hongos e insectos) y en la celulosa (plantas). Además los polisacáridos formados por aminoácidos D y L dispuestos en forma alterna son más

resistentes que los constituídos por un único tipo de monómero (18).

En *P. aeruginosa* se han aislado sáculos intactos conteniendo los componentes del peptidoglican similares a muchas bacterias Gram negativas. La microscopía electrónica de los sáculos ha mostrado que difieren de los obtenidos de las enterobacterias, ya que presentan una estructura superficial mucho más lisa, con un diámetro de $4.7 \text{ nm} \pm 0.6 \text{ nm}$, su análisis químico confirmó la presencia de cantidades pequeñas de proteínas, de ácido murámico, de ácido glutámico y los componentes más abundantes fueron el ácido diaminopimélico y la D-alaina terminal. El grado de enlaces cruzados se ha estimado por denitrofenilación entre 24 y 30%, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Clarkson y Meadw, 1971, Heilman, 1972). Se ha sugerido que una molécula de proteína se puede pegar al ácido diaminopimélico mediante la lisina. Los otros componentes del peptidoglican aislado y purificado de *P. aeruginosa* son fósforo (0.01%), iones de metales (2.55%). De éstos, el sodio constituye aproximadamente el 1.87% del peso seco, con cantidades más pequeñas de potasio, magnesio, calcio y zinc, desconociéndose el papel que juegan estos iones en la construcción del peptidoglican (6,25).

La función del peptidoglican consiste en dar forma y resistencia mecánica a la bacteria, ya que su pérdida causa formación de protoplastos e inestabilidad osmótica; sin embargo, la bacteria puede controlar en parte la permeabilidad de

las capas externas de la pared, directamente formando una barrera de permeabilidad o indirectamente manteniendo unidas -- las capas de la membrana externa (25, 26).

AREA PERIPLASMICA.

En la mayoría de las bacterias Gram negativas hay una área de secciones delgadas que se reconoce por microscopía -- electrónica como una región no contrastada, se localiza entre las estructuras de la membrana citoplásmica y las capas de la membrana externa, no hay evidencia de estructuras distintivas dentro de esta área conocida como espacio periplásmico. En esta región se han localizado una gran variedad de enzimas, -- algunas se han caracterizado en *P. aeruginosa* como la fosfatasa alcalina; cuando esta enzima es liberada por el magnesio, provoca que las capas externas de la pared sean permeables a la lisoenzima y se formen esferoplastos (6).

Muchas enzimas degradativas como la B-lactamasas, acetilasas, adenilasas y fosforilasas, son producidas en la membrana citoplásmica y se acumulan en el área periplásmica, su actividad se manifiesta en cepas resistentes de *P. aeruginosa*, ya que generan la degradación o modificación de los antibióticos. El área periplásmica contiene un número variable de -- proteínas de unión asociadas con el transporte de aminoácidos y otros nutrientes dentro de la bacteria (14).

CAPAS DE LA MEMBRANA EXTERNA.

La membrana externa posee las características típicas de una unidad de membrana, consiste en una estructura trilaminar de 80°A (6).

La capa externa de la pared celular es responsable de muchas de las propiedades de la bacteria *in vivo*, desempeña funciones en el transporte de metabólicos hacia el interior de la célula, en la adsorción de bacteriófagos y de aeruginosina y, debe ser responsable, al menos en parte, de las respuestas inmunogénicas del organismo (14, 25).

En las bacterias Gram negativas la membrana externa contiene fosfolípidos, proteínas (lipoproteínas y glicoproteínas) y un lipopolisacárido de mayor densidad que el resto de los componentes de dicha membrana. Las proteínas tienen forma de subunidades globulares de aproximadamente 7 nm de diámetro, tienen funciones estructurales o enzimáticas. La membrana externa está unida a el peptiglican por lipoproteínas que se extienden en paquetes (6) (Fig. 2).

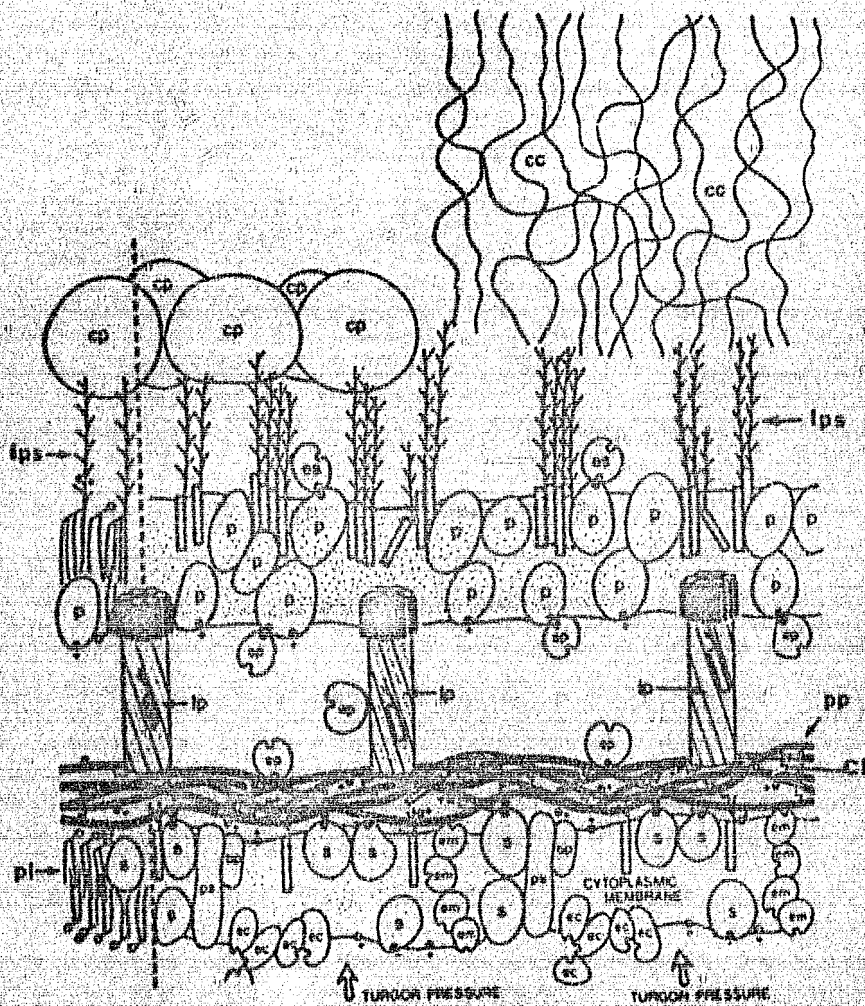


Figura 2. Estructura de pared celular de bacterias Gram negativas

Tomada de Microbiology-1977, pag. 145 - 157.

- + Cation libre
- Anion libre
- Cation unido
- Anion unido
- ⊕ - Punto de adhesión producido por unión iónica
- ⊖ - Zona Hidrofóbica
- - Unión del polipéptido en el peptidoglican
- - Parte del Polisacárido en el peptidoglican
- ~ Proteína enzimáticamente activa.
- FO Fosfolípido
- LE Lipopolisacárido (esquema)
- cc Carbohidrato capsular
- cp Proteína capsular
- ec Enzimas asociadas con la membrana citoplásmica, cuya función está en citoplasma.
- em Enzimas asociadas a membrana citoplásmica la cual sintetiza macromoléculas de pared celular.
- ep Enzimas localizadas en espacio periplásmico.
- es Enzimas localizadas a la superficie celular.
- lp Lipoproteínas.
- p p proteínas estructurales y con actividad enzimática.
- ps permeasas.
- s Proteínas estructurales de membrana citoplasmática.

COMPONENTES DE LIPOPROTEINAS.

La lipoproteína en *P. aeruginosa* se presenta en pequeñas cantidades y es difícil de aislar. Sin embargo, se han extraído otras proteínas junto con lipopolisacáridos, lo que sugiere que pueden derivarse de las capas de la membrana externa. Homma y sus colaboradores han estudiado una proteína designada "proteína endotóxica original" (PEO), con un peso molecular de 42 000 daltones y con actividad tóxica, la cual es fisiológica y serológicamente distinta al lipopolisacárido. Un complejo similar, de proteína lipopolisacárido, se libera de las capas de la membrana de *P. aeruginosa* (Roberts, 1973), que contiene dos componentes proteínicos mayores, uno, designado como proteína A, tiene un peso molecular de 43 000 daltones y otro, proteína B, tiene un peso molecular de aproximadamente 16 000 daltones. Estos componentes funcionan como enzimas en la síntesis del lipopolisacárido y de lipoproteínas de la membrana externa (6).

COMPONENTES LIPIDOS.

Al igual que en la membrana citoplásmica, el 90% de éstos son fosfolípidos, y el compuesto más abundante es el fosfatidil-etanolamina. Los ácidos grasos de los fosfolípidos, son similares a los encontrados en la mayoría de las bacterias Gram negativas (Cho y Saltón, 1966); con una cantidad mayor de ácido palmítico y de ácido oleico (6).

LIPOPOLISACARIDO (LPS).

El LPS es una molécula compuesta de tres segmentos covalentemente unidos; el externo oligosacáridos, la región central y el lípido A. El segmento externo es responsable de la especificidad antigénica O; consiste de unidades repetidas de oligosacáridos (con frecuencia contiene azúcares raros) y en la que se encuentran los determinantes antigénicos específicos de especie, demostrando una estrecha correlación entre la clasificación serológica de serotipos y la clasificación química de quimiotipos.

La región central puede ser subdividida en una región externa de heteropolisacáridos y una región interna, unida al lípido A. La región central de *P. aeruginosa* difiere de las otras bacterias Gram negativas en la presencia de una gran cantidad de fosfato (6).

El lípido A es el responsable de las actividades endotóxicas de los LPS. Junto con la región central interna parecen ser esenciales para la viabilidad de la bacteria.

La estructura química del lípido A ha sido estudiada extensamente en miembros del género *Salmonella*; en años recientes, y se ha encontrado que está compuesta de glucosamina, fosfato y cadenas de ácidos grasos, (Hasse y Ritschel, 1976).

El ácido beta hidroxí mirístico presente en grandes

cantidades en otras bacterias, en *P. aeruginosa* no existe (25).

Aunque el LPS de *Pseudomonas* tiene rasgos en común con las Enterobacterias, presenta diferencias importantes tanto en organización como en composición química. En *P. aeruginosa* tiene un peso molecular de 10^7 daltones, al disociarse por calentamiento, usando deoxicolato, produce subunidades de 12 000 a 20 000 daltones (Ikeda y Egani, 1973) (27).

Los componentes lípidos del LPS responsables en parte de su actividad endotóxica, nos da un medio para distinguir algunas de las *Pseudomonas*. Sin embargo es el polisacárido él que tiene más efecto sobre el fenotipo. Este componente, además de participar en las reacciones serológicas, juega un papel en la sensibilidad a la aeruginocina, a bacteriófagos, así como en la sensibilidad a antibióticos. Todos los LPS de *P. aeruginosa* que se han analizado hasta ahora, contienen azúcares, como glucosa, ramnosa y heptosa, junto con galactosamina y ceto-3-desoxioctánico.

MEMBRANA CITOPLASMICA.

La membrana citoplásmica presenta una constitución similar a la membrana externa de la pared celular, está compuesta de una bicapa de fosfolípido y proteínas (6), su gran contenido proteico, presente en las membranas de las *Pseudomonas*, incluyendo a *P. aeruginosa*, refleja su gran versatilidad --

metabólica.

El contenido de proteínas es aproximadamente del 68%, de fosfolípidos el 30% y de carbohidratos 2.0%. Cerca del 90% de los lípidos extraídos de preparaciones de la membrana son fosfolípidos y es el fosfatidil etanolamina el mayor componente, con pequeñas cantidades de fosfatidil-glicerol y fosfatidil difosfato glicerol (6).

La membrana citoplásmica es la principal barrera de permeabilidad de la bacteria, está involucrada en el transporte activo; es también el sitio de la fosforilación oxidativa, de adhesión y replicación del cromosoma en la porción que contiene el mesosoma. Juega un papel importante en la formación del septum, en la biosíntesis de la pared celular, en la síntesis de pequeños polímeros de aminoácidos así como en la replicación del AND; participa en la tolerancia a la aeruginocina. En resumen, un gran número de funciones enzimáticas específicas han sido localizadas en la membrana de *P. aeruginosa* (6,14).

La cadena de transporte de electrones de las bacterias Gram negativas, como *P. aeruginosa*, que crecen aeróbicamente, contienen deshidrogenasas y componentes respiratorios localizados también en la membrana citoplásmica, como puede apreciarse:

COMPONENTE	CONCENTRACION mol/mg de proteínas
Flavina soluble	0.162 ± 0.007
Flavina unida	0.037 ± 0.003
Cobenzima Q	3.7 ± 0.36
Hemo b	0.33 ± 0.017
Hemo c	0.44 ± 0.021
Citocromo o	0.17 ± 0.027
Fierro no hemo	15.9 ± 3.7

En la cadena de transporte de electrones en *P. aeruginosa* el orden de las deshidrogenasas primarias es: b, cl, c, o y oxígeno. Cuando las bacterias crecen anaeróbicamente en medios que contienen nitratos, el citocromo cd actúa como oxidasa terminal (28).

PIGMENTOS.

La importancia de los pigmentos, particularmente los derivados de la fenazina (piocianina), en la patogénesis del organismo, probablemente está en la supresión de la flora bacteriana, en infecciones de larga duración; dando así, oportunidad a la colonización e invasión por *P. aeruginosa*. Este efecto fue bien conocido en la última mitad del siglo XIX, cuando se usó un extracto complejo, llamado piocianasa, en muchas infecciones bacterianas; particularmente en el anthrax (Vaerts, 1902). La fracción activa del extracto demostró ser un pigmento de fenazina, caracterizado como alfa oxifenazina (Schoental,

1941). Este pigmento puede considerarse como el antibiótico -- que precedió a la penicilina (28).

AERUGINOCINAS.

Las aeruginocinas son sustancias de naturaleza proteica producidas por algunas cepas de *P. aeruginosa* que tienen acción bactericida muy específica sobre bacterias de la misma especie o relacionados estrechamente (29). Brandley en 1967 propuso su clasificación en dos tipos: el tipo S que se caracteriza por ser sensibles a enzimas proteolíticas y sin estructura definida y el tipo R que son resistentes a enzimas proteolíticas y muestran una apariencia estructural semejante a la de los bacteriógrafos. Kageyama y colaboradores han estudiado aeruginocinas de la variedad R, mostrando que es una partícula semejante a la cola de un bacteriógrafo; compuestos por una sola clase de proteína de aproximadamente 1×10^7 daltones. Su morfología es la de un cilindro hueco, de 1 200 A de largo y 150 A diámetro, y una vaina contráctil. También se puede apreciar placas basales y fibras. El modo de acción de las aeruginocinas R es similar a la encontrada en las colicinas K de *E. coli* (Nomura, 1967) y megacina G en *Bacillus megaterium* (Holland, 1967), estas sustancias se unen a receptores específicos localizados en la membrana de las células sensibles; actuando, -- bien a este nivel o en el citoplasma, donde van a inhibir la síntesis de ADN, de ARN, de proteínas, y bloqueando la fosforilación oxidativa. También se ha observado en experimentos utilizando isótopos marcados que actúan sobre el ribosoma de la --

bacteria atacada, impidiendo la incorporación de poli U de C^{14} - fenilalanina. (6,29).

Otra aeruginocina tipo R estudiada, es la 28, que tiene forma de bacilo. Es capaz de producir cambios morfológicos en las bacterias infectadas. Takeya y colaboradores (1971), encontraron que el sitio de acción es la membrana bacteriana. La otra clase de aeruginocina es la llamada tipo S, ésta es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 75 000 daltones, su modo de acción aún no se conoce (6).

TOXINAS.

El resurgimiento de *P. aeruginosa* como un patógeno importante, en los últimos 20 años, se ha debido, primariamente, a su resistencia a los antibióticos. El fracaso de estas drogas para controlar la infección, llevó a intentar el uso de medidas inmunológicas, sin realizar un exhaustivo endentimiento del modo de acción del organismo. La patogenicidad de esta bacteria en animales de laboratorio, se estableció por Charin en 1890, quien demostró la toxicidad de filtrados, libres de células, de este organismo. La importancia de la toxina soluble en la patogenésis de *P. aeruginosa*, también fue reconocida por Bouchard (1889), quien demostró la eficacia de sueros antitóxicos en el tratamiento de la infección de este bacilo. Wassermann en 1896 encontró que los componentes celulares de *P. aeruginosa* eran debilmente tóxicos y que la toxicidad de los cultivos, existía a nivel extracelular, diferenciando las

toxinas producidas por esta bacteria en lábiles al calor y termoresistentes (20).

En los años 50 se afirmaba que la patogénesis de las bacterias Gram negativas se debía principalmente a sus endotoxinas, como se observa en especies de *Salmonella* y *Shigella*. En *P. aeruginosa* apoyándose en un gran número de experimentos realizados por diversos investigadores, se concluyó que sus efectos patogénicos eran causados por sus productores extracelulares, como son: hemolisina, lecitinasa, toxina letal A, exoenzimas S, proteinasa, elastasa, gelatinasa, lipasa, ADNasa, hialurini-dasa, coagulasa, fibrinolisisina y muy poco por la endotoxina (30,31).

TOXINA LETAL A.

Pseudomonas aeruginosa es causa significativa de infecciones nosocomiales. Su capacidad para producir enfermedades en los humanos es limitada, ya que sólo puede infectar a sujetos cuyas defensas inmunológicas están disminuidas por otros procesos patológicos o por la aplicación de una terapia inmuno depresiva intensiva. Los casos fetales de bacteremia y neumonía, causada por *P. aeruginosa*, excede del 70% y entre los factores involucrados en el daño, se encuentra la toxina A, que es el producto extracelular más potente, producido en el 90% de las cepas aisladas de pacientes clínicos. Ninguna otra bacteria es capaz de producir esta toxina (32).

La toxina A está formada por una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de aproximadamente 71 500 daltones; es secretada como una proenzima tóxica, que carece de actividad enzimática. Cuando se desnaturaliza, se reduce o se degrada por las proteasas de *P. aeruginosa*, genera dos fragmentos, uno enzimáticamente activo de 27 000 daltones, (Adenosin 5-Difosfato Ribosil Transferasa) y una proteína de 45 000 daltones, identificado como fragmento b, enzimáticamente inactivo; que funciona como acarreador, responsable de la unión de la toxina a los receptores sobre la superficie celular (33,34).

La toxina A tiene actividades de ADN glicohidrolasa y ADP-ribosiltransferasa; se ha demostrado que inhibe la síntesis proteica en células de mamíferos a nivel ribosomal, por el mismo mecanismo que emplea la toxina de la difteria, ambas catalizan la transferencia de la Adenosin 5'Difosfato Ribosiltransferasa del ADN, sobre el mismo factor 2 de elongación, de manera esteoquímicamente idéntica. Estas enzimas tienen diferencias estructurales y no reaccionan entre sí inmunológicamente. La exotoxina A se sintetiza en el citoplasma en el lado interno de la membrana citoplásmica (35).

Gager recientemente reportó que la toxina es resistente a las proteasas de *P. aeruginosa*, que no alteran sus propiedades biológicas o enzimáticas. Esto contradice la información de Lin y Etall de que es muy sensible a las proteasas (34).

La toxina A juega un papel importante en la destrucción de tejidos y muerte de ratones quemados en infecciones -- por *P. aeruginosa* (36). Parece ser un buen antígeno como se ha demostrado en estudios realizados empleando la inmunización - activa con el toxoide de la exotoxina A formalinizada y un - - adyuvante, se indujo inmunidad protectora en grado variable en ratones; lo cual puede ser potencialmente útil, en la profila- xis de infecciones por este bacilo, y por otro lado, la inmuni- zación pasiva también confiere un alto grado de protección. En infecciones humanas, los altos niveles de antitoxina en el sue- ro se ha correlacionado con una mayor oportunidad de sobrevi- vencia, (36, 37, 38).

EXOENZIMA S.

Una segunda proteína extracelular designada como co- enzima S es producida por algunas cepas de *P. aeruginosa*, ha mos- trado tener actividad Adenosil Difosfato 5'Ribosil-transferasa (ADPR-transferasa), la que difiere de la toxina A, en que no - tiene acción sobre el factor de elongación 2, ADP-ribosilado, sino que más bien modifica una o más proteínas diferentes, ca- talizando la transferencia de ADPribosa del NAD a varias pro- teínas en extractos de células eucarióticas. La actividad en- zimática de la proteína S se destruye parcialmente por trata- miento con urea y ditiotreitól, provocando una mayor actividad enzimática de la toxina A; por otro lado, la exoenzima S no se precipita ni es neutralizada por la antitoxina A. Se ha obser- vado que la exoenzima S puede ser factor de virulencia cuando

no existen niveles detectables de la toxina A (39, 40).

LEUCOCIDINA.

La leucocidina de *P. aeruginosa* es una protefina que -- ejerce un efecto citopatogénico sobre los leucocitos y varias células de tejidos, es inefectiva sobre eritrocitos o plaquet-- tas sanguíneas. La acción citotóxica de esta toxina sobre leu-- cocitos de bovinos, se caracteriza por producir mayor permea-- bilidad de su membrana plasmática para sustancias de bajo peso molecular, lo cual provoca hinchazón de las células, sin que -- se rompa la membrana celular. Esto sugiere que el sitio de -- patogenicidad es la membrana plasmática, ya que existe en és-- ta un receptor de la leucocidina de naturaleza protefina (41).

LECITINASA.

El tipo más común de infecciones humanas producidas por *P. aeruginosa* involucran la piel y está caracterizada por -- una área de edema, coloreada, no dura. Esta lesión, con fre-- cuencia ulcerada, se cubre de una costra para formar el clási-- co "Ethyma gangrenosum" (Histschann y Kreibich, 1897) (20,42).

En experimentos realizados se administró lecitinasa purificada por vía intracutánea en conejos, provocó en una -- hora enrojecimiento, con agrandamiento de la lesión a las 48 -- horas y finalmente se formó un absceso en el centro de la le-- sión, rodeado por una área de edema, enrojecimiento e indura-- ración. Ratones inyectados por vía intravenosa o intraperito--

neal con lecitinasa, provocó una rápida necrosis en el hígado de 4-5 horas antes de la muerte del animal. Microscópicamente este órgano mostró necrosis focal con infiltración celular, no difiriendo significativamente de la lesión producida por la hemolisina (42).

ENZIMAS PROTEOLITICAS.

Una de las características mejor conocidas de *P. aeruginosa* es su actividad proteolítica, reconocida poco después de su descubrimiento en el siglo XIX. La licuefacción de la gelatina, el aclaramiento de leche descremada agar, la digestión de la caseína y de la hemoglobina, la licuefacción del suero coagulado y la disolución de la fibrina y de la elastina, se pueden emplear para demostrar esta propiedad. Un aspecto de la proteasa de *P. aeruginosa* que atrajo la atención de muchos investigadores, fue su modo de hidrólisis de la colágena que liberan ciertos péptidos. (Schoellman y Fisher, 1966, Diener y col., 1973). (20).

Se ha mostrado experimentalmente que las hemorragias de la piel, del pulmón y del intestino, y la necrosis producidas por las proteasas, se asocian con la hidrólisis de la elastina de los vasos sanguíneos, provocando hemorragias subcutáneas y necrosis del área alimentada por estos vasos (43).

Las enzimas proteolíticas despertaron interés, especialmente desde que Corney y sus colaboradores presentaron evidencias de su participación en la invasión de *Pseudomonas*.

(44). La producción de proteasa es estimulada por bajas concentraciones de glucosa y por la presencia de glutamato y de glutamina como únicas fuentes de nitrógeno in vitro (45).

Las infecciones fatales de *P. aeruginosa* ocurren, cuando están involucradas grandes áreas de la piel, como es el caso de los pacientes quemados. Los estudios realizados, han confirmado que los efectos letales de este tipo de infección se deben a la absorción de la toxina producida en la piel, y no a la producción de ésta, por organismos circulantes en la sangre (46).

Moriyama trabajando con proteasas de *P. aeruginosa*, menciona tres tipos, las cuales se conocen como fracciones I, II y III, llamadas proteasa neutra, semialcalina y alcalina, respectivamente. La fracción I se encontró en muy baja cantidad en los filtrados de la mayoría de las cepas, tiene un punto isoeléctrico de 8.5, la fracción II tiene actividad de elastasa con un punto isoeléctrico de 6.6 y la fracción III que no mostró actividad de elastasa presenta un punto isoeléctrico de 4.5 (11,47).

Se han encontrado cepas que son elastasa positiva que producen dos proteinasas: la fracción II y la fracción III y, cepas elastasa negativa que elaboran sólo una proteínasa, la fracción III. La fracción I se elabora por ambos tipos de cepas pero su actividad es muy pequeña. La fracción III es pro

ducida" sólo en un medio sintético conteniendo ión calcio. El pH para las diferentes fracciones I, II y III fue de 6.5, de 7.5 a 8.0 y de 10.0 respectivamente. La actividad proteolítica y elastolítica de la fracción II tiene un comportamiento similar para varios tratamientos, excepto para la prueba de inhibición por NaCl y del suero. Las proteinasas de la fracción III, de varias cepas, son similares en sus características enzimáticas. Los resultados de los estudios indican que la habilidad para producir actividad elastolítica II, puede ser un carácter dissociativo de la especie (47).

Se ha purificado y cristalizado la elastasa de la fracción II; con un peso molecular de 39,500. Esta enzima tiene amplia actividad contra varias sustancias, incluyendo elastina, caseína, hemoglobina, albúmina de huevo y fibrina. Se estableció por Mull y Callaman (1965) y Kawaharajo (1975) que esta elastasa era la que causaba lesiones hemorrágicas en la piel de los animales de experimentación. (20,48,49).

En estudios comparativos realizados de proteinasa alcalina no elastolítica, y la elastasa de *Pseudomonas aeruginosa* sobre los puntos de división de la insulina B-oxidasa, se encontró que las dos enzimas tienen especificidades diferentes. La proteinasa alcalina rompió la molécula principalmente en su lado carboxílico de los enlaces que contenían asparagina, ácido cisteico, lisina, ácido glutámico, tirosina, arginina y fenilalanina mientras que la elastasa la partió en el lado carboxílico de enlace de histidina, alanina, tirosina, leucina, glicina,

fenilalanina y lisina (50).

La elastasa pancreática se considera como una sola enzima que tiene una amplia especificidad proteolítica. Watford y Wichhofen han encontrado que la elastasa pancreática tiene más de un centro activo por molécula. Un centro puede dirigirse específicamente hacia la elastina, mientras que los otros pueden poseer amplia especificidad proteolítica. Se ha encontrado que la elastasa pancreática exhibe una selectividad por enlaces peptídicos adyacentes a los aminoácidos alifáticos. Como se sabe que la elastina contiene una alta proporción de este tipo de aminoácidos, puede proponerse que no se necesitan otras propiedades especiales de la enzima para expresar sus actividades elastolíticas (50).

En la fase inicial del trabajo de Morihara (1956) utilizó la licuefacción de la gelatina como un marcador de actividad proteolítica. La gelatinasa se cristalizó como una proteína con peso molecular de 77,000 daltones. El pH óptimo para su actividad resultó ser 7.0 a 8.5 a una temperatura de 45°C. La enzima rápidamente digirió la gelatina, pero su actividad sobre el gluteno, hemoglobina, caseína y albúmina de huevo es lenta. En base a esta observación, se sugirió que esta enzima podría ser una colagenasa, lo cual no se justifica debido a que la toxicidad de la gelatinasa en animales, es baja y la inyección dentro de la piel no produce lesiones significativas (20).

TOXINAS HEMOLITICAS.

La producción de una sustancia hemolítica por *P. aeruginosa* fue descrita primero por Bullock y Hunter (1900), su observación se confirmó por Landsteneir y Raubilschek (1908). Estos investigadores señalaron que esta sustancia hemolítica era soluble en solventes lípidos y por lo tanto diferente a otras hemolisinas bacterianas que son usualmente de naturaleza proteica. Jarvis y Johnson (1949) la describieron como un glicolípido cristalino que consiste de dos moles de L-ramnosa y de ácido 1-betahidroxidecanoico. La actividad hemolítica de esta sustancia no se apreció hasta que lo mencionó Sierra (1960) (20).

Liu en 1957 señaló que *P. aeruginosa* produce dos tipos de hemolisinas, una resistente al calor que funciona a 37°C. Esta observación llevó al descubrimiento de que la hemolisina resistente al calor era una sustancia soluble en alcohol, muy similar al glicolípido descrito por Jarvis, mientras que la hemolisina lábil al calor es la fosfolipasa C (Esselmann y Liu, 1961) (20,51).

La hemolisina activa se puede producir rápidamente sobre una placa cubierta con celofán; funciona como un detergente solubilizando los lípidos, después de la destrucción de la lecitina por la fosfolipasa C. Esta hemolisina activa no es por sí sola tóxica, ya que actúa junto con la fosfolipasa C. En un medio conteniendo una baja concentración de fosfatos y

una alta concentración de glucosa se produce hemolisina, fosfolipasa C y una fosfatasa alcalina que separa fosfato inorgánico de la fosforilcolina, estas sustancias producen la liberación de fosfato inorgánico de la lecitina (20).

La hemolisina y la fosfolipasa C, producen lesiones características en la piel para ejercer su efecto se fijan a las células del tejido, pero no se transportan al torrente sanguíneo para actuar como toxina letal (20,52).

La fosfolipasa C purificada y libre de la actividad de la proteasa, tiene un efecto histopatológico diferente al producido por ésta última (Liu, 1966, 1976). Cuando se inyecta en la piel de conejo, produce necrosis del área con un absceso central rodeado de una zona de eritema, esta lesión tarda de 24 a 48 horas para alcanzar un desarrollo máximo, en contraste a las lesiones hemorrágicas producidas por proteasas que aparecen en cuestión de minutos. Es posible que el papel que juega la fosfolipasa C en la patogénesis de *P. aeruginosa* dependa de la habilidad de cada cepa para crecer en líquidos corporales y alcanzar una densidad celular suficientemente alta para producir toxinas en el hospedero (20,52).

ENTEROTOXINAS.

Desde 1894 se sabe que *P. aeruginosa* es capaz de producir cuadros diarreicos (Williams y Camerun, 1894-1895), en ocasiones se ha descrito como fiebre de cinco días o de Shanghai

(Dold, 1918).

Aunque no se ha caracterizado como una toxina, se ha podido demostrar que se debe a una sustancia lábil al calor y por lo tanto es una proteína. Okada empleando la técnica de asa ligada de conejo, ha propuesto que la proteasa y la elastasa de *P. aeruginosa* se encuentran probablemente implicadas en el cuadro diarreico ocasionado por esta bacteria (20,53). La mayoría de estas infecciones terminan fatalmente, a pesar de que la pérdida de líquidos y electrolitos es relativamente menor, comparada con la causada por el cólera asiático, es posible que en infecciones intestinales, la letalidad de *P. aeruginosa* se deba a las proteasas y a una toxina letal, y no a la pérdida de electrolitos y fluidos. Es concebible que las toxinas entéricas puedan contribuir a la formación de edemas y del endurecimiento de lesiones de la piel. La significancia de tal toxina en la patogénesis de infecciones intestinales en el hombre; por otra bacteria, es difícil de evaluar hasta el momento, porque esta infección es rara (20).

JUSTIFICACION DEL TRABAJO.

Han transcurrido más de dos décadas desde que los bacilos Gram negativos ocupan el primer lugar como causa de procesos patológicos en sujetos comprometidos, desplazando a las bacterias Gram positivas como sucede con *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*. Las causas de éste fenómeno son variables y dependen de la complejidad de la medicina moderna; el uso de sustancias inmunosupresoras, agentes antimicrobianos, procedimientos quirúrgicos prolongados de instrumentación mecánica, todos ellos generadores de sujetos susceptibles a microorganismos oportunistas que en condiciones normales no producirían alteración alguna (2).

Entre los bacilos Gram negativos *P. aeruginosa* tiene gran importancia si se considera que en la actualidad es un patógeno que se diferencia de otros agentes infecciosos por el gran número de hospederos que puede infectar, además en los últimos años ha cobrado interés debido a la existencia de una alta variedad fenotípica representada por la presencia de diferentes marcadores de resistencia a antimicrobianos, metales pesados, aeruginosinas, etc., pero sobre todo por la capacidad de producir y liberar un conjunto de exoenzimas involucradas en la patogenicidad de la bacteria sobre el hospedador humano.

OBJETIVOS:

- 1.- Aislar e identificar bioquímicamente cepas de *P. aeruginosa* obtenidas de pacientes con quemaduras de segundo y tercer grado; de pacientes ambulatorios con cuadros infecciosos y de medio ambiente extrahospitalario (agua, vegetales silvestres y suelo) de la Ciudad de México.
- 2.- Determinar el perfil enzimático de las cepas de *P. aeruginosa* identificadas.
- 3.- Realizar pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de uso común en Hospitales.
- 4.- Analizar comparativamente las características fenotípicas de las bacterias estudiadas.

MATERIAL

PROCEDENCIA DE LAS CEPAS ESTUDIADAS:

- A. 47 cepas de *P. aeruginosa* de pacientes del pabellón de quemados de Urgencias "Dr. Rubén Leñero", del Departamento del Distrito Federal,
- B. 33 cepas proporcionadas por la Q.F.B. Edelmira Mejía García, provenientes de exudados diversos de pacientes del Hospital "Dr. Manuel Góa González",
- C. Presencia de *P. aeruginosa* en 150 muestras de agua obtenidas de fuentes ornamentales de diferentes áreas de la Ciudad de México y en 30 muestras de suelo y diversos vegetales silvestres del perímetro de la Ciudad Universitaria,
- D. Cepas control de *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, proporcionadas por Abbott Laboratories de México, S.A.

MEDIOS UTILIZADOS,

- A. Medios de transporte; (53),
Caldo nutritivo de Difco (655372)
- B. Medios de aislamiento; (9, 54, 55),
Agar MacConkey de Merck (5465).
Pseudomonas agar de Difco (676227).
Agar-agar de Merck (1614), complementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada.
Infusión cerebro corazón dializado-agar-leche descremada.

C. Medios utilizados para la identificación bioquímica.
(9, 54, 55).

Agar-Kligler (agar hierro con dos azúcares) de Merck
(3913).

Base de caldo rojo de fonol de Bioxon (218-1).

Base descarboxilasa de Moeller deshidratada de Difco
(686811).

Gelatina nutritiva de Merck (4069).

Caldo de infusión corazón deshidratado de Difco (590277).

Medio de agar citrato Simmons de Merck (2501).

Medio de cultivo SIM de Merck (5470).

Agar Nitrato de Difco (670142).

Caldo nutritivo de Difco (655372).

D. Medios para la determinación del perfil enzimático.

1. Medio para determinar la actividad de la desoxirribonucle_o
asa (DNAsa) (BBL) (58).

2. Medio para la determinación de Fibrinolasina (58).

Plasma citratado.

CaCl₂ al 0.25%

3. Medio para la observación de fluorescencia (59, 60)

Pseudomonas agar.

Infusión de cerebro corazón dializado-agar/agar leche des_u
cremada.

4. Medio para la determinación de gelatinasa (57, 58).

Gelatina nutritiva de Merck (4069).

5. Medio para observar la producción de hemolisina (58).

Agar base sangre de Difco, complementada con sangre de carnero al 5%, desfibrinada.

6. Medio para la observación de la lecitinasa (58).

7. Medio para determinar la actividad de la Lipasa (58).

8. Prueba de Oxidasa (57).

Tetrametil para fenileno diamina dehidrocarburo - - - 0.1 ml

Agua destilada - 10 ml

Mezclarlos 15 minutos antes de usarse.

9. Medios para la producción de pigmento.

a) Pseudomonas agar

b) Infusión de cerebro corazón dializado-agar-Agar leche descremada (DBHI-SMA). (59).

10. Medios para determinar la producción de proteasas (58,61).

Medio de DBHI-SMA (59, 60, 61).

E. Medios para determinar sensibilidad a los antimicrobianos (62).

Caldo de Moeller Hinton de BBL (11443).

Agar Moeller Hinton de BBL (11438).

F. Medio para la conservación de copas (comunicación personal del M. en C. Rafael García González).

Peptona al 2% de Merck (7214).

Agar-agar al 1.5% de Merck (1614).

G. Medios para visualización de flagelos (58).

Agar soya tripticasa

Caldo soya tripticasa

ADICIONES.

a) Carbohidratos (57). Se agregaron de forma individual - D(+) Glucosa (8342), Maltosa (5910) y D (+) Xilosa de - - Merck a una concentración del 10% para el medio OF base.

Trealosa (Nutricional Biochemicals Corporation) y D-Mani- - tol de Difco a una concentración de 0.5%, para la base de Caldo rojo de fenol.

b) L (+) aminoácidos (57). Se agregaron de forma indivi- - dual; Arginina de Difco (558221), Lisina de Merck (5700) y Ornitina de Difco (559233) a una concentración del 1% para la base de Moeiler.

ANTIMICROBIANOS (58).

Acido Nalidíxico (Sigma Chem. Co.)	40 ug/ml
Amikacina (Difco)	8 ug/ml
Ampicilina (I Wyeth-Vales)	25 ug/ml
Cefalosporina (Cefsulodín sódico de ABBOTT)	1 ug/ml
Cloranfenicol (Merck)	25 ug/ml
Estreptomina (Lakaside)	100 ug/ml
Gentamicina (Sigma)	5 ug/ml
Kanamicina (Brystol Myers)	50 ug/ml
Nitrofurazona (Lab. Kriya, S.A.)	25 ug/ml
Polimixina (Laboratorios Zapata)	64 ug/ml
Rifampicina (Lepetit de México)	10 ug/ml
Tobramicina (Eli Lilly y Cia.)	4 ug/ml
Tetraciclina (Carlos Erba)	2,5 ug/ml

REACTIVOS.

Prueba de reducción de nitratos a nitritos.

- a) Acido sulfanilico
- b) Alfaftolamina
- c) Zinc para la reducción de las sales de diazonio.

Para la preparación de diluciones,

Solución salina isotónica al 0.85%

McFarland Standars a 10.5%

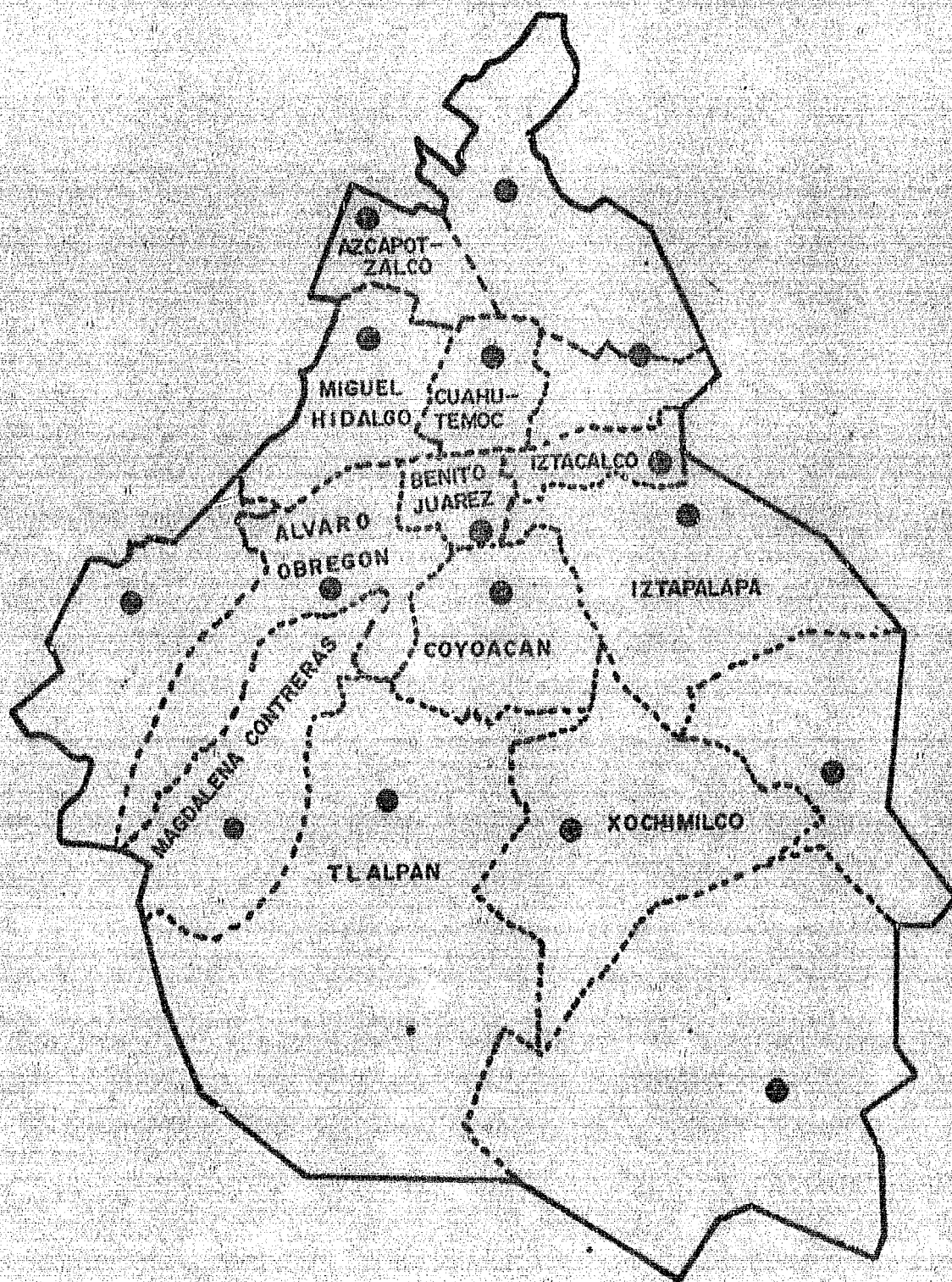
BaCl al 0.48 M (0.5 ml).

H₂SO₄ al 0.36 N (9.5 ml)

Para la prueba de lecitinasa; alcohol al 70% y HgCl

Para la prueba de Fibrinolisisina; Ca Cl₂ al 0.25%.

Figura 3: DELEGACIONES MUESTREADAS DEL DISTRITO FEDERAL



has agar, medios enriquecidos; agar sangre, se empleo la inoculación por estrías a fin de lograr un aislamiento adecuado y determinar la morfología colonial, la producción de pigmento y de 2 - amino aceto-fenona. Estos medios fueron incubados a 37°C, durante el período de 18-24 hrs. En el caso de las muestras inoculadas en caldo MacConkey, los tubos que presentaron la evidencia de producción de ácidos por medio de la degradación de la lactosa a las 24 hrs., se transfirieron a los medios antes referidos, y aquellos tubos en donde no se puso de manifiesto la producción de ácido, pero con crecimiento bacteriano, a las 48 horas se efectuó la inoculación en los medios adecuados para su aislamiento. Las cepas enviadas en medios de kligler fueron sembradas en cajas de Petri conteniendo agar MacConkey para descartar la posibilidad de contaminación.

DETERMINACION BIOQUIMICA.

En base a la morfología colonial y características tintoreales, proporcionada ésta última por medio de la tinción de Gram, se procedió a realizar la determinación bioquímica recomendada por la Sociedad Americana de Microbiología para diferenciar *Pseudomonas aeruginosa* de otras especies del género *Pseudomonas*, efectuándose las pruebas referidas en la Tabla II.

METODO PARA ESTANDARIZAR INOCULOS.

Se inoculó el microorganismo en 5 ml de BHI, se incubó a 37°C., durante un período de 18 horas y se diluyó al

1:10 empleando solución salina isotónica (0,85%) lo que proporcionó una concentración de $1,2 (+ 0,09) \times 10^8$ bacterias por ml. Dado que los cultivos de las cepas a estudiar deben tener una turbidez estandar, se requirió del empleo de Mac Farland de referencia al 0,5% de absorvencia, se realizaron diluciones seriadas empleando para ello solución salina estéril, hasta obtener aproximadamente una dilución de 1×10^6 bacterias por ml.

DETERMINACION DEL PERFIL ENZIMATICO, (Tabla III).

Empleando el método de estandarización del inóculo se tomó 0,3 ml de una dilución de 1:100 000 con lo cual se obtuvo de 35 a 70 colonias por caja de Petri aproximadamente. Las colonias obtenidas en medio de DBHI-SMA, se separaron de acuerdo a sus características morfológicas y se almacenaron en medio para la conservación de cepas, con el fin de poder estudiar su capacidad enzimática, así como la resistencia antimicrobiana.

El medio para la prueba de la DNasa se inóculó por estrias y se incubó a 37°C ., por 24. Después se le agregó al medio azul de toluidina al 0,1% , produciéndose un color rosa alrededor del crecimiento de las cepas productoras de DNasa.

FIBRINOLISINA.

Esta prueba se realizó para 77 cepas solamente. Se empleó 0,5 ml de plasma citratado al cual se le agregó 5 gotas

de cloruro de calcio al 0.25%. La mezcla se incubó durante 10 minutos a 37° C., permitiendo la formación de un coagulo. Posteriormente se le agregó 0.5 ml de un cultivo de toda la noche de las cepas estudiadas en BHI. Observándose la reacción después de un período de incubación de 18 horas, a una temperatura de 37° C.

HEMOLISINA.

El medio de agar sangre fue inoculado por estrías con las cepas a estudiar y se incubó por 24 horas a 37° C.

LECITINASA.

El medio para observar la producción de lecitinasa se inoculó por estrías y se incubó a 37° C por 24 horas.

LIPASA.

El medio de Tween 80 se inoculó con una asada de un cultivo de toda la noche en BHI. Se inoculó por 48 horas a una temperatura de 37° C.

PROTEASA.

Para estudiar la capacidad de las bacterias para degradar la caseína se utilizaron dos medios; el de leche según Baylot y el DBHI-SMA. Se empleó el método de estandarización del inóculo para observar la actividad proteolítica de las cepas, las cuales se sembraron, empleando 0.3 ml de una dilución de 1:100 000, por estrías cerradas incubados a 37° C por 24-48 horas.

PRODUCCIÓN DE PIGMENTO.

Las cepas a estudiar fueron sembradas en Medio de *Pseudomonas* agar por la técnica de aislamiento por estrías a partir de un cultivo de toda la noche. Se incubó a 37°C por 18 - 24 horas y se observó la fluorescencia, empleando una lámpara de luz ultravioleta Mod. R-51 W.H. Curtin y Compañía.

DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Para determinar la sensibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* se prepararon los medios de cultivo de agar Moeller Hinton. Una vez esterilizado, se le agregó el antibiótico a probar y se vertió aproximadamente 25 ml, a cada caja lo cual dio un grosor uniforme de 4 mm por caja de Petri.

Las cepas a probar fueron crecidas en caldo Moeller-Hinton siguiendo el método para estandarizar inoculos. Al final de las diluciones seriadas se introdujo un hisopo estéril en la suspensión ajustada y se rotó el aplicador varias veces, con presión firme, en la pared interna del tubo por encima del nivel del líquido para eliminar el exceso de inóculo del aplicador. Se sembró la placa de agar, pasando el aplicador sobre su superficie. Este procedimiento se repitió dos veces más, rotando la caja para asegurar una distribución uniforme del inóculo.

En el caso de la cefalosporina se colocaron los sensi

discos impregnados de este antimicrobiano, en la superficie de la placa de agar, distribuidos uniformemente, de manera que la distancia entre los discos no fuera menor de 24 mm de centro. Para colocar adecuadamente el sensible disco se utilizó un aparato dispensador.

Una vez que se realizó la inoculación se invirtieron las placas y se colocaron en incubación a 35°C., durante 18 horas. Después de este período se midieron los diámetros de las zonas de inhibición con la ayuda de una regla. Se consideró que una cepa fue resistente cuando el tamaño de la zona era de 14 mm o menor, las cepas sensibles se consideraron a partir de los 15 mm, en el caso de la cefalosporina ya que los otros antimicrobianos, fueron incluidos en el agar a una dosis preestablecida.

Para controlar la precisión y exactitud del procedimiento del ensayo se usaron cultivos de *S. aureus* (ATCC 25923) y de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), estos sirvieron para indicar que no hubo alteración de la actividad del antibiótico.

RESULTADOS.

De la unidad de quemados del Hospital Dr. Rubén Leñero, se obtuvieron 127 muestras, las cuales están agrupadas en tres familias; Pseudomonadaceae (29.6%), Micrococaceae (45.7%) y Enterobacteriaceae (24.7%), tabla IV. A nivel de género el primer lugar correspondió a *Staphylococcus* con 74 cepas (45.7%) en segundo lugar a *Pseudomonas*, con 48 cepas (29.6%) y el tercer lugar a *Enterobacter* con 19 cepas (11.7%), tabla V. La especie más frecuentemente aislada fue *P. aeruginosa* con 45 cepas (27.8%), siguiendo en orden decreciente *S. aureus* con 41 cepas (45.7%), *S. albus* con 33 cepas (20.4%), *Enterobacter agglomerans* con 13 cepas (8.0%), *Serratia liquefaciens* con 6 cepas (3.7%) y *Proteus mirabilis* con 5 cepas (3.1%). El número total de especies identificadas en las muestras obtenidas de los pacientes quemados fue de 162 (tabla VI).

De las muestras aisladas de medio ambiente se obtuvieron 80 cepas de *P. aeruginosa*; empleando una modificación de la técnica de tubos múltiples para determinar el número más probable de bacterias en 100 ml de agua recolectada (NMP), para su aislamiento (62). Tanto a estas cepas, como las aisladas de pacientes quemados y las enviadas del Hospital Manuel Gea González, se les sometió, para su identificación bioquímica, a las pruebas referidas en la tabla II.

En los medios de DBHI-SMA, BHI-agar leche descremada,

Moeller Hinton, Pseudomonas-agar, medio de Kligler y Plasma ci tratado se observó la producción de pigmentos. En los cuatro primeros medios se puso en evidencia la producción de pigmentos. Verde-amarillo, verde-azul y café. Todas las cepas obtenidas de los hospitales fueron capaces de producir pigmento, y las de origen extrahospitalario sólo en el 52.0% lo elaboraron. Al analizar este pigmento, por medio de la lámpara de rayos ultravioleta, se observó fluorescencia en el 100% de las cepas de hospital y, en el caso de las cepas de medio ambiente, sólo el 20% lo manifestaron.

La diversidad de la morfología colonial, se observó utilizando los medios de DBHI-SMA y BHI-agar leche descremada. Las colonias lisas fueron las que predominaron, tanto en cepas de hospital como en las de medio ambiente, siendo en su mayoría enanas de 2 mm de diámetro. Las colonias de tipo mucoides sólo se aislaron de muestras de medio ambiente (14 cepas). En total se identificaron cuatro tipos de colonias; lisas, semi-rugosas, rugosas y mucoides. (figs. 4-7).

El perfil enzimático de las cepas de pacientes quemados fue más rico. En la tabla VII se puede notar que la mayoría de las cepas fueron capaces de producir, proteasas en un 97.9%, hemolisina en el 80.9%, seguida de la gelatinasa (72.3%), Lipasa (63.8%), lecitinasa (61.7%) y ADNasa (51.1%). La enzima con capacidad para coagular el plasma se produjo con menor frecuencia (8.5%).

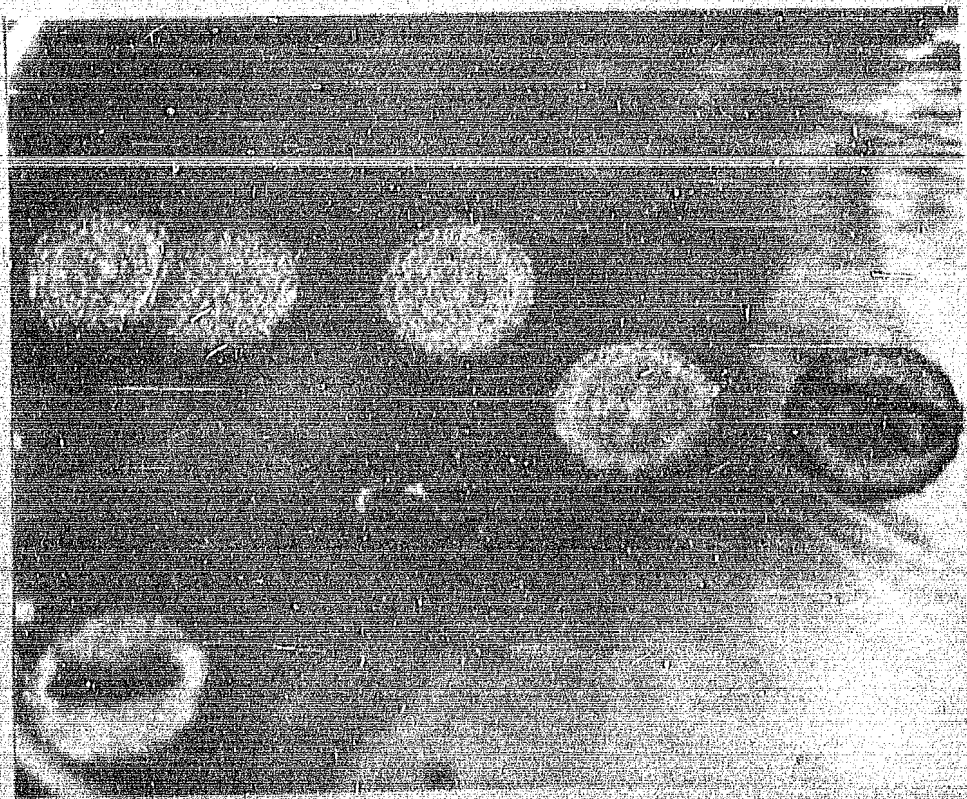


Fig. 4 - 5. Colonias rugosas de *P. aeruginosa* .

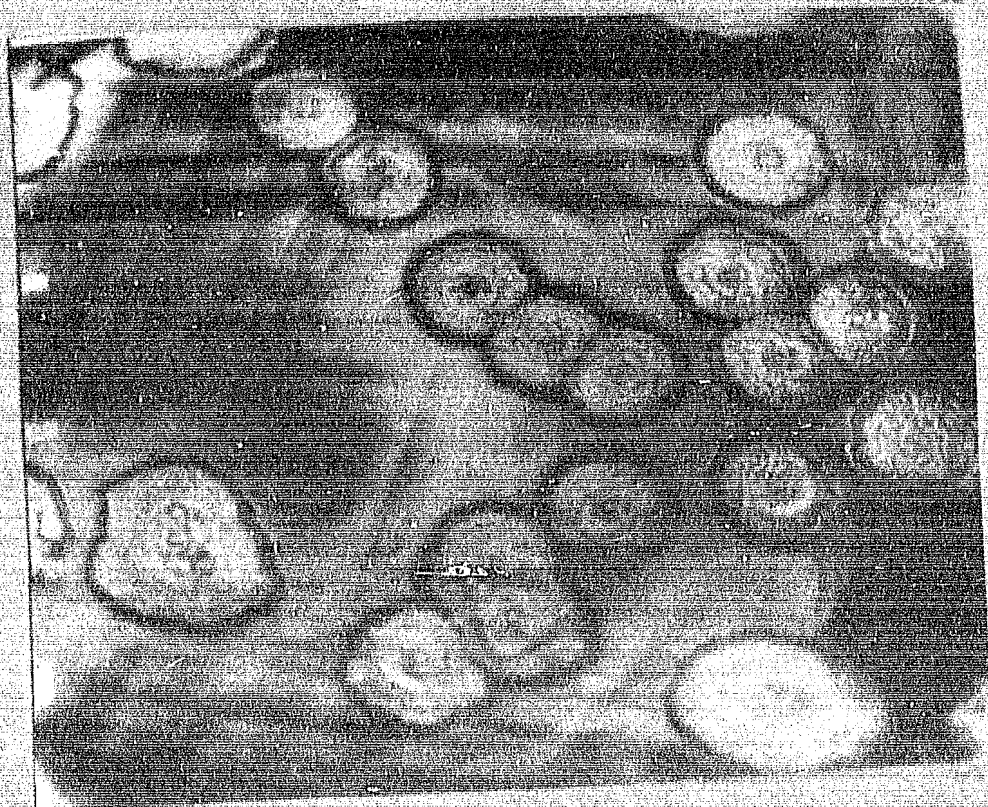


Fig. 6 Colonias lisas de P. aeruginosa.

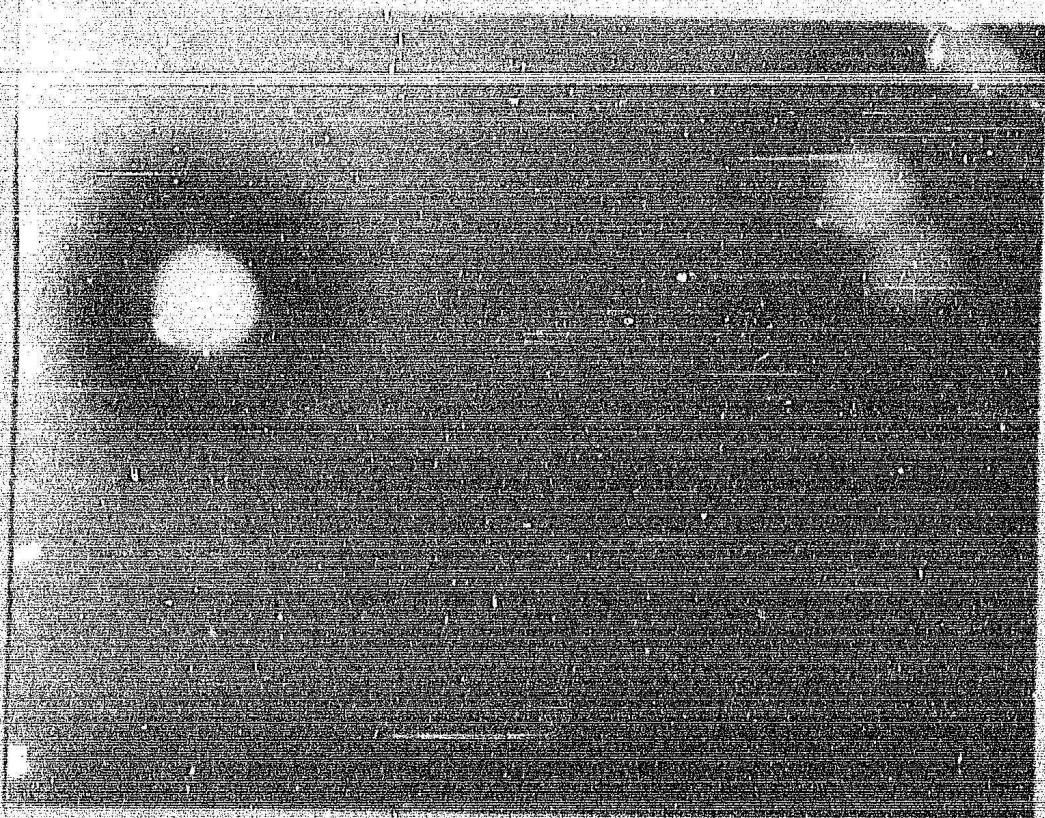
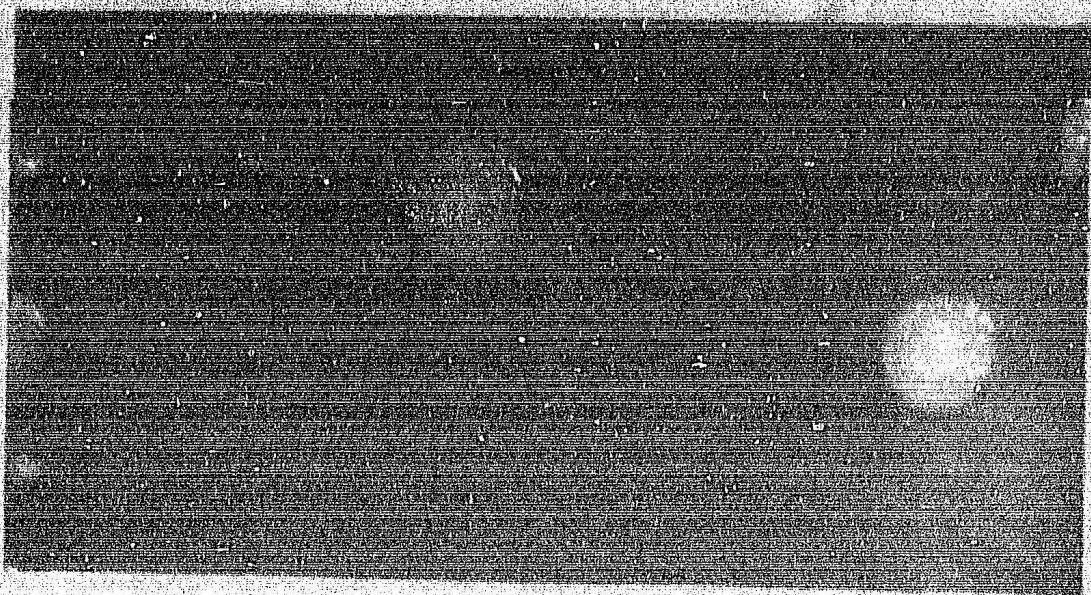


Fig. 7 Colonias semirrugosas de P. aeruginosa.



En las cepas obtenidas de pacientes del Hospital Manuel G6a Gonz6lez, se encontr6 tambi6n gran riqueza de enzimas. La proteasa se observ6 en el 90.9% de las cepas; pero en estas ocup6 la ADNasa el segundo lugar, con una frecuencia del 87.9% y la hemolisina 81.9%. La capacidad para digerir la gelatinasa se manifest6 en 18 cepas (54.5%); la lecitinasa en el 36.4% y la lipasa en el 24.2%. Ninguna de las cepas de este hospital produjo coagulasa (tabla VIII).

La producci6n de exoenzimas en cepas de medio ambiente, se manifest6 en menor proporci6n. La hemolisina se encontr6 en el 75% de las cepas aisladas; la gelatinasa y la lecitinasa se vieron en la misma proporci6n (47.5%); la lipasa en el 32.5%; la ADNasa en el 37.5% y la proteasa en el 30.0%; confirm6ndose la escasa capacidad de estas cepas para coagular el plasma (3.8%) (tabla IX).

Al realizar la prueba de disoluci6n del coagulo para determinar la existencia de fibrinolisisina (en 77 cepas probadas), se pudo apreciar que las cepas de origen hospitalario, presentan una mayor capacidad para producirla (69.3%), comparadas con las de medio ambiente en las que se expres6 en el 55.7% (tabla X).

El estudio de la resistencia a los antimicrobianos se realiz6, en el caso de las cepas aisladas del Hospital Dr. Rub6n Le6nero, utilizando la prueba de difusi6n, seg6n el m6to

do de Kirby Bauer; se observó resistencia a la carbenicilina en el 54,6%, a la gentamicina en el 42,9%, al sulfato de tobramicina en el 27,8%, cefsulodin sódico en el 18,2% y para el sulfato de amikacina la resistencia fue de solamente 5,0% (tabla XI).

En base a estos resultados se cambió la técnica de Kirby Bauer por la de dilución en placa. Se estudiaron 160 cepas de *P. aeruginosa*; en las de origen hospitalario se pudo observar sensibilidad a polimixina y rifampicina en el 100%, disminuyendo su frecuencia de sensibilidad a la tobramicina, se hallaron 2 cepas resistentes (2,5%); a la tobramicina 12 cepas (15,0%), a la estreptomomicina 14 cepas (17,5%), a la gentamicina 23 cepas (28,8%), a la kanamicina 32 cepas (40,0%), al ácido nalidixico 33 (41,3%), al cloranfenicol 62 (77,5%), a la tetraciclina 66 (82,5%) y a la nitrofurazona 86,3%; la mayor frecuencia de resistencia se presentó a la ampicilina, en 75 cepas, lo que representa un 93,8% (tabla XII).

De las 80 cepas de medio ambiente, se obtuvieron los resultados siguientes; Se presentó el 100% de sensibilidad a tres antibióticos; la polimixina, la rifampicina y amikacina. La frecuencia de resistencia a los demás antimicrobianos fue baja; gentamicina 2 cepas (2,5%), tobramicina 3 (3,8%), estreptomomicina 13 (16,3%), kanamicina 15 (18,8%), ácido nalidixico 21 (26,3%), tetraciclina 31 (38,8%) y cloranfenicol 43 (53,8%). Se observó un incremento considerable en la frecuencia de

resistencia para dos antimicrobianos; a la ampicilina 70 cepas (87.5%) y a la nitrofurazona 76 (95.0%) (tabla XIII).

En las tablas XIV-XVI, se señala la característica de la multiresistencia encontrada en las cepas de *P. aeruginosa* de origen hospitalario y de las de medio ambiente. Se presentaron hasta nueve marcadores de resistencia para las cepas de hospital. En el caso de las cepas del medio ambiente, se encontró que su frecuencia en número de marcadores fue menor, ya que el número más alto fue de 7 y solamente se presentó en el 3.8%. En el rango de 4 y 5 marcadores de resistencia se observó una mayor proporción. Una cifra mayor de cepas de origen extrahospitalario presentaron menor número de marcadores; obteniéndose una cepa carente de marcadores de resistencia a los antimicrobianos utilizados.

En el análisis comparativo de las diversas cepas de *P. aeruginosa*, se pudo constatar la variación fenotípica en la morfología colonial, producción de exoenzimas (hemolisina, proteasa, lecitinasa, lipasa y ADNasa, producción de pigmentos y algunos marcadores de resistencia, como son Tc, Gm y Nx, así como ApCmNiTc (figuras XX-XXVII).

D I S C U S I O N.

En este trabajo se observó que el empleo de diferentes medidas terapéuticas para controlar estas infecciones en el paciente quemado, ha dado lugar a una gran variación en la flora que lo coloniza, como consecuencia de la presión selectiva que se crea en el área infectada (63). El análisis de la flora bacteriana en 45 pacientes que sufrieron daño térmico, mostró que existe un predominio de la familia Micrococaceae representada por el género *Staphylococcus*, (tabla V) así como por las especies *S. aureus* y *S. albus* (tabla VI), sobre las familias Pseudomonadaceae y Enterobacteriaceae. Sin embargo, como es referido por otros autores (2,3), los bacilos Gram negativos, desde hace más de una década, han desplazado de manera importante a los cocos Gram positivos. Parte de este trabajo realizado en el Hospital Dr. Rubén Leñero, durante un período de 50 días, el 54,3% de las especies bacterianas aisladas correspondió a bacilos Gram negativos y de estos la especie más frecuente fue *P. aeruginosa* (tabla VI),

Esta se aisló desde el segundo día de estancia en el Hospital y se mantuvo presente durante el tiempo de muestreo realizado. Es importante hacer notar que estos pacientes desde el primer día de ingreso al hospital, se ven sometidos al tratamiento antimicrobiano a base de penicilina de acción rápida y de aminoglicósidos del tipo de la gentamicina, lo cual va a propiciar la selección de cepas resistentes de *P. aeruginosa* a -

éste tipo de medicamentos. Esto ha generado que *P. aeruginosa* represente un problema importante en el campo de la medicina, por lo cual es indispensable clarificar la naturaleza de su patogenicidad. En un principio se pensó que ésta dependía de las condiciones de defensas inmunológicas del hospedero, sin embargo en *P. aeruginosa* encontramos factores celulares como el glicocálix y los lipopolisacáridos que van a contribuir en su virulencia (64, 65).

Como se mencionó la importancia del glicocálix en la patogénesis radica en la capacidad de fijación sobre las células eucarióticas facilitando de éste modo la colonización del paciente. Esta estructura va a permitir a la bacteria interactuar con el medio ambiente que le rodea, multiplicarse y resistir las condiciones adversas, generando infecciones como la fibrosis quística y enfermedades crónicas de los pulmones, incrementa el efecto citotóxico sobre leucocitos y el epitelio pulmonar, limitando el acceso de fagocitosis, anticuerpos y antimicrobianos como se ha demostrado experimentalmente (22,66-70).

En este trabajo se aislaron colonias mucoides (evidencia de glicocálix) solamente de muestras obtenidas de medio ambiente extrahospitalario. Esto puede deberse a que la célula gasta energía para generar y sostener un glicocálix, por lo que las células que fabrican estas complejas envolturas suelen eliminarse de los cultivos puros, sustituyéndose por variantes carentes de glicocálix las cuales pueden destinar más energía

de sus reservas para su proliferación, razón por la cual es muy difícil obtener colonias mucoides en el laboratorio. En ambientes naturales competitivos poblados por varias especies bacterianas la selección favorece a las células que estén protejidas y capacitadas para adherirse a la superficie adecuada mediante un glicocálix (19).

Por otro lado en los últimos años se han obtenido progresos en estudios básicos sobre *P. aeruginosa* revelando que las enzimas extracelulares y exotoxinas están relacionadas con la virulencia de la bacteria, ya que algunos de los metabolitos secundarios de estas sustancias son altamente tóxicos (65).

Considerando que el papel de las proteasas en la patogénesis de *P. aeruginosa* y sus efectos sobre los tejidos localizados en los sitios de administración y de infección (20), Liu desde 1966 al realizar la evaluación de varios productos de *P. aeruginosa* en su patogénesis, notó la asociación entre lesiones hemorrágicas de la piel en 1-2 minutos y las lesiones necróticas del día siguiente de la administración (42). Se ha determinado que pequeñas cantidades de proteasa y elastasa causan hemorragias y ulceraciones, en la piel y tejidos subcutáneos de ratones, así como inflamación del intestino (65). Estas observaciones indican que la proteasa y la elastasa juegan un papel importante en la enteritis debida a *P. aeruginosa* (53).

En experimentos realizados por Holder, Handaris y corroborados por Paulouskis y Wretlind, se indican que la proteasa eleva la virulencia del organismo, al actuar agresivamente en ratones infectados con las cepas productoras de proteasa (49, 71, 72) otros efectos de estas exoenzimas, se encuentran en la angiitis, debida a *P. aeruginosa* caracterizada por la destrucción de la lámina elástica, hemorragia e invasión bacteriana a través de la pared de los vasos, con escasa reacción inflamatoria. De acuerdo con Schutz y Miller la elastasa tiene acción destructiva sobre dos de los nueve componentes del complemento (C_4 y C_7), inhibiendo el movimiento de los leucocitos polimorfonucleares, a el sitio de la inflamación y disminuyendo su actividad fagocítica. La respuesta inflamatoria es además entorpecida porque las enzimas lisosomales no son liberadas (65, 73).

En cornea de ratones, se provocó daño, posterior a la administración de proteasa y elastasa con opacificación de la misma, a una dosis de 0.8 - 2.0 microgramos; apareciendo úlceras a dosis de 4-5 microgramos (74).

De acuerdo a estos experimentos se ha demostrado que *P. aeruginosa* esta capacitada para producir proteasa involucrada en el daño al hospedero, sin embargo esta propiedad es variable en cuanto a su frecuencia, como quedó demostrado en este trabajo (tablas XX- XXVII). La producción de enzimas proteolíticas por parte de las cepas aisladas de los hospitales.

fue alta; no se encontró diferencias entre las cepas de los dos hospitales estudiados, ya que tanto las del Hospital Dr. Rubén Leñero, como las del Hospital Manuel Góa González, presentaron la capacidad de producir enzimas proteolíticas, en el 95% de las cepas. (tabla XVII). Esto no se encontró en las cepas de medio ambiente ya que sólo el 30% fueron productoras (tabla XVIII), lo que corrobora los reportes de otros investigadores que han realizado estudios demostrando que las cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de pacientes con septicemia producen mayores cantidades de proteasa que las aisladas de otras fuentes (44, 75). Debido a que las cepas aisladas de pacientes son altamente productoras de enzimas proteolíticas, van a contribuir a la invasión por parte de estos microorganismos como se ha demostrado por Corney y colaboradores (44); así como por Kawarajo y Homma (76).

Otra proteasa estudiada fue la gelatinasa, la cual produce enrojecimiento e induración de la piel. Su producción fue de 65.0% y 47.5% para las cepas de hospital y de medio ambiente extrahospitalario respectivamente (tabla XVIII). Comparada su producción con otras proteasas estudiadas, fue menor con respecto a las cepas obtenidas de pacientes y ligeramente superior con respecto a las cepas de medio ambiente extrahospitalario.

El segundo grupo de toxinas estudiadas, que contribuyen al daño de los tejidos incluyen a la fosfolipasa C y al

glicolípido hemolítico. En el presente trabajo se observó la capacidad hemolítica de cepas aisladas de *P. aeruginosa* (sin especificar el tipo de enzima producida). Se encontró que la producción de enzimas hemolíticas fue muy alta, tanto en las cepas de hospitales como en las de medio ambiente, obteniéndose una proporción de 81.3% y 75.0% respectivamente (tabla XVIII). Esto es importante debido a que cuando las cepas de *P. aeruginosa*, producen fosfolipasa C en mayor cantidad que los demás productos extracelulares (proteasa, exotoxina A), puede actuar como un factor importante en la producción de lesiones de la piel y en la patología pulmonar (20). Por otro lado la fosfolipasa C es probablemente un factor que va a contribuir a la letalidad en pacientes que se encuentran infectados por este microorganismo (Liu y Hsieh, 1973), ya que como se ha observado juega un papel significativo en la formación de lesiones locales, producidas en la piel de conejos, diferente a la generada por la proteasa o la exotoxina A (Liu, 1976). Estas lesiones producen un área necrótica con un absceso central rodeado por una zona de eritema, durando de 24-48 horas para alcanzar su máximo desarrollo. (46).

La habilidad de las cepas aisladas de *P. aeruginosa*, para producir enzimas que van a destruir diferentes sustancias presentes en los pacientes, como son lípidos, ADN, etc.; es muy variable, como se puede observar en la tabla XVIII, la lipasa se produce en cepas aisladas de pacientes en el 47.5%, la DNAasa en el 66.3%, la lecitinasa en el 51.3% en mayor propor-

ción que las cepas de medio ambiente extrahospitalario ya que para la lipasa, la proporción fue de 32.5%, la ADNasa 37.5%, la lecitinasa 47.5%. Por lo que podemos concluir por los resultados obtenidos sobre la producción enzimática es mayor en las cepas aisladas de fuentes clínicas.

El análisis de susceptibilidad a los antimicrobianos puso de manifiesto la ausencia de resistencia a la polimixina y a la rifampicina. (tabla XIX). En el caso de la polimixina los datos obtenidos en este trabajo están de acuerdo con los reportados en otros estudios realizados donde a pesar de utilizar este antimicrobiano en los pacientes por varios años no se han desarrollado resistencia en las cepas de origen clínico (27, 77, 78, 79), no siendo el mismo caso para rifampicina de la que existen evidencias de la inducción de la resistencia por mutación espontánea o por la presencia de material genético extracromosomal (80).

En el caso de los aminoglicósidos la más baja frecuencia de resistencia se encontró para el sulfato de amikacina (1.2%) en cepas de hospital, todas las cepas de medio ambiente resultaron sensibles a este antimicrobiano (tabla XIX). La baja frecuencia de resistencia puede ser explicada en base al poco uso de este antimicrobiano a nivel clínico, pues de otra manera su frecuencia sería más alta, Hallowey y colaboradores, han reportado la existencia de mutantes espontáneos a este antimicrobiano con una frecuencia de 43%. (20, 80, 81).

Otros aminoglicósidos del tipo de la tobramicina, gentamicina, kanamicina (tabla XIX), presentaron un alta frecuencia de resistencia en las cepas aisladas de hospital a excepción de la estreptomina (17.5% en cepas de hospital y 16.3% en cepas de medio ambientes extrahospitalario). Es de notar que el porcentaje de resistencia obtenido a gentamicina (28.8%) para las cepas de hospital es bajo, si tomamos en consideración que éste es el antibiótico de elección para todos los pacientes quemados de nuevo ingreso, además de la penicilina, por lo que se esperaba encontrar una mayor resistencia como sucede en el caso de la ampicilina (93.8%). La explicación a éste fenómeno se encuentra dado por el patrón de tratamiento aplicado a estos pacientes quemados, en los cuales la penicilina o derivados de ésta, así como cefalosporinas, dan lugar a que se seleccione cepas productoras de enzimas tales como B-lactamasas y cefalosporinasas, ya que estos antimicrobianos son proporcionados durante prácticamente toda la estancia de paciente en el hospital, en cambio la gentamicina se da por períodos interrumpidos, sustituyendo por otro aminoglicósido como es la kanamicina de la cual obtuvimos una frecuencia de 40.0% en cepas hospitalarias. La resistencia a la kanamicina de cepas de *P. aeruginosa* puede deberse a que contienen enzimas del tipo de la fosfotransferasa y enzimas de la 6'N-acetilantes, mediadas por un plásmido R tipo P-1 (20, 27, 81).

La resistencia a tetraciclina fue para las cepas de hospital 82.5% y para las de medio ambiente que de 38.8%, Esta

respuesta puede estar dada por marcadores de resistencia a nivel cromosomal aunque no debe excluirse la presencia de plásmidos que codifiquen para ésta característica, lo cual puede explicar tanto la resistencia en las cepas de hospital como las de medio ambiente. No debemos olvidar sobre todo en las cepas de medio ambiente que la resistencia también puede ser intrínseca generada por la barrera que representa la pared celular o estructuras relacionadas con ésta, como ha sido demostrado por la lesión que se genera en el peptidoglican con el empleo de carbenicilina (20, 79, 82, 83).

En el caso cloranfenicol encontramos un porcentaje casi similar a la tetraciclina, 77.5% para las cepas hospitalarias y de 53.8% para las de medio ambiente (tabla XIX), este gran porcentaje de resistencia puede ser a que las cepas poseen factores R que especifican resistencia para el cloranfenicol. También puede deberse a un descenso de la permeabilidad del antimicrobiano en la envoltura celular, no logrando unirse a la unidad 50 S del ribosoma (20, 79, 82).

Con respecto al ácido nalidixico se ha encontrado que las cepas de hospital presentan una resistencia de 40% y las de medio ambiente de 26.3% (tabla XIX). Esta resistencia es dada a nivel cromosomal, probablemente ocasionada por mutaciones espontáneas como sucede con otros bacilos Gram negativos (80).

CONCLUSIONES.

En este trabajo se identificaron cuatro tipos de morfología colonial lisas, semirugosas, rugosas y mucoides. La producción de pigmento fue del 100% en cepas de pacientes y del 52.0% en cepas de medio ambiente. Con respecto al poder enzimático, la proteasa fue la enzima más frecuentemente producida por cepas de hospital (95.0%), esta sólo se produjo en un 30% en cepas de medio ambiente extrahospitalario. La hemolisina fue la enzima más frecuentemente producida en cepas de medio ambiente (75.0%), encontrándose un porcentaje similar a la de pacientes (81.3%). Se encontró que la exoenzima que se produjo en menor proporción fue la coagulasa en cepas de ambos orígenes.

Al realizar el análisis de la resistencia a los antimicrobianos, las 160 cepas estudiadas fueron sensibles a polimixina y rifampicina, únicamente dos cepas aisladas de pacientes fueron resistentes al sulfato de amikacina. Más del 50% de las cepas obtenidas de pacientes fueron resistentes a tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y nitrofurazona, en tanto que más de la mitad de las cepas aisladas del medio ambiente fueron resistentes a cloranfenicol, ampicilina y nitrofurazona.

Por los resultados obtenidos, se puede concluir que las cepas aisladas de pacientes presentan un gran potencial enzimático, aunado a un gran número de marcadores de resistencia, comparado con las cepas aisladas de medio ambiente (agua, suelo y vegetales silvestres).

TABLA 1

AI SLAM I EN TO Y CA RAC TE RI ZAC I ON DE BA CTE RI AS DEL GE NE RO *Pseudomonas*.

MUESTRAS

PACIENTES

ORIGEN: SISTEMICO
ORINA
PIEL Y ANEXOS

MEDIO AMBIENTE

ORIGEN: AGUA
SUELO
VEGETALES

MEDIOS SELECTIVOS

CARACTERIZACION
MORFOLOGIA

CARACTERIZACION METABOLICA Y
DEL PERFIL ENZIMATICO.

DETERMINACION DE RESISTENCIA A
ANTIMICROBIANOS.

TABLA II. PRUEBAS BIOQUIMICAS Y FISIOLOGICAS PARA IDENTIFICAR
Pseudomonas aeruginosa.

<u>Característica</u>	<u>Porcentaje</u>
FLAGELO POLAR MONOTRICO (O MENOS DE TRES FLAGELOS)	(+) 93%
MOVILIDAD	(+) 93
GLUCOSA OF (AEROBIOSIS)	(+) 100
GLUCOSA OF (ANAEROBIOSIS)	(-) 0
MALTOSA OF (AEROBIOSIS)	(-) 0
MALTOSA OF (ANAEROBIOSIS)	(-) 0
XILOSA OF (AEROBIOSIS)	(+) 98
XILOSA OF (ANAEROBIOSIS)	(-) 0
CITRATO DE SIMMONS	(+) 100
INDOFENOL OXIDASA	(+) 100
REDUCCION DE NITRATOS	(+) 94
L-LISINA DESCARBOXILASA	(-) 0
L-ARGININA DESHIDROLASA	(+) 93
L-ORNITINA DESCARBOXILASA	(-) 0
PRODUCCION DE H ₂ S	(-) 0
CRECIMIENTO A 42°C EN BH1	(+) 100
CALDO NUTRITIVO MAS NaCl 6.5%	(-) 100
FERMENTACION: LACTOSA, GLUCOSA Y SACAROSA (TSI)	(-) 100
PRODUCCION DE PIGMENTO	VARIABLE.

TABLA III

EXOENZIMAS PRODUCIDAS POR *Pseudomonas*
aeruginosa A DETERMINAR:

ADNasa

Coagulasa

Fibrinolisisina

Hemolisina

Gelatinasa

Lecitinasa

Lipasa

Proteasa (Caseina)

TABLA IV. FAMILIAS BACTERIANAS AISLADAS EN
127 MUESTRAS DE PACIENTES QUEMA-
DOS DEL HOSPITAL RUBEN LEÑERO.

FAMILIA	NUMERO	%
Micrococaceae	74	45.7
Pseudomonadaceae	48	29.6
Enterobacteriaceae	40	24.7

TABLA V. GENEROS BACTERIANOS AISLADOS EN 127 MUESTRAS DE PACIENTES QUEMADOS DEL HOSPITAL RUBEN LE-
NERO.

GENERO	NUMERO	%
Staphylococcus	74	45.7
Pseudomonas	48	29.6
Enterobacter	19	11.7
Proteus	9	5.6
Serratia	7	4.3
Citrobacter	5	3.1
Total	162	

TABLA VI. ESPECIES BACTERIANAS AISLADAS MAS FRECUENTEMENTE EN 127 MUESTRAS DE PACIENTES QUEMADOS DEL HOSPITAL RUBEN LEÑERO.

GENERO Y ESPECIE	NUMERO	%
<i>Proteus mirabilis</i>	5	3.1
<i>Proteus vulgaris</i>	2	1.3
<i>Proteus morgani</i>	1	0.6
<i>Proteus rettgeri</i>	1	0.6
<i>Serratia marcescens</i>	1	0.6
<i>Serratia liquefaciens</i>	6	3.7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0.6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	13	8.0
<i>Enterobacter hafniae</i>	3	1.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0.6
<i>Enterobacter sp.</i>	1	0.6
<i>Citrobacter freundii</i>	2	1.2
<i>Citrobacter diversus</i>	3	1.9

TABLA VII. *Pseudomonas aeruginosa*.
 PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES*

ENZIMAS	No. TOTAL DE CEPAS PRODUCTORAS.	(%)
Proteasa**	46	(97.9)
Hemolisina	38	(80.9)
Gelatinasa	34	(72.3)
Lipasa	30	(63.8)
Lecitinasa	29	(61.7)
ADNasa	24	(51.1)
Coagulasa	4	(8.5)

* SE ESTUDIARON UN TOTAL DE 47 CEPAS DEL HOSPITAL
 RUBEN LEÑERO.

** CASEINASA.

TABLA VIII. *Pseudomonas aeruginosa*
 PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES*

ENZIMAS	No. TOTAL DE CEPAS PRODUCTORAS	(%)
Proteasa**	30	(90.9)
ADNasa	29	(87.9)
Hemolisina	27	(81.8)
Gelatinasa	18	(54.5)
Lecitinasas	12	(36.4)
Lipasa	8	(36.4)
Coagulasa	0	

* SE ESTUDIARON UN TOTAL DE 33 CEPAS DEL HOSPITAL
 DR. GEA GONZALEZ, OBTENIDOS DE EXUDADOS DIVERSOS.

** CASEINASA.

TABLA IX. *Pseudomonas aeruginosa*
 PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES
 POR CEPAS AISLADAS DEL MEDIO AMBIENTE.

ENZIMAS	No. TOTAL DE CEPAS PRODUC TORAS	%
Hemolisina	60	(75.0)
Gelatinasa	38	(47.5)
Lecitinasa	38	(47.5)
ADNase	30	(37.5)
Lipasa	26	(32.5)
Proteasa*	24	(30.0)
Coagulasa	3	(3.8)

TOTAL DE CEPAS ESTUDIADAS 80

* CASEINASA

TABLA X. *Pseudomonas aeruginosa*
PRUEBA DE DISOLUCION DE COAGULO

CEPAS DE HOSPITAL	CEPAS MEDIO AMBIENTE
27/39 (69.2%)	21/38 (55.3%)

SE ESTUDIO UN TOTAL DE 77 CEPAS
SE UTILIZO COMO CEPA CONTROL: *Streptococcus beta*
HEMOLITICO (+) DEL CEPARIO DEL LABORATORIO DE -
BACTERIOLOGIA, DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA HUMANA,
FACULTAD DE MEDICINA, U.N.A.M.

TABLA XI. PORCIENTO DE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa**, RESISTENTES A:

ANTIMICROBIANO	PORCENTAJE
Sulfato de amikacina	5.0 %
Cefsulodin sódico	18.2
Sulfato de tobramicina	27.8
Sulfato de gentamicina	42.9
Carbenicilina disódica	54.6

* OBTENIDAS DEL HOSPITAL DR. RUBEN LEÑERO
(47 CEPAS).

TABLA XII. *Pseudomonas aeruginosa*. ESTUDIO DE RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS EN 80 CEPAS AISLADAS DE HOSPITAL.

ANTIMICROBIANOS	No. DE CEPAS RESISTENTES	%
Polimixina	0	0
Rifampicina	0	0
Amikicina	2	2.5
Tobramicina	12	15.0
Estreptomina	14	17.5
Gentamicina	23	28.8
Kanamicina	32	40.0
Ac Nalidixico	33	41.3
Cloranfenicol	62	77.5
Tetraciclina	66	82.5
Nitrofurazona	69	86.3
Ampicilina	75	93.8
CEPAS CONTROL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 278553 y <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923).	

TABLA XIII. ESTUDIO DE RESISTENCIA A AGENTE ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE MEDIO AMBIENTE.

ANTIMICROBIANOS	No. DE CEPAS RESISTENTES	(%)
Polimixina	0	0
Rifampicina	0	0
Amikacina	0	0
Gentamicina	2	2.5
Tobramicina	3	3.8
Estreptomicina	13	16.3
Kanamicina	15	18.8
Ac. Nalidixico	21	26.3
Tetraciclina	31	38.8
Cloranfenicol	43	53.8
Ampicilina	70	87.5
Nitrofurazona	76	95.0

CEPAS CONTROL. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 278553 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

SE ESTUDIARON 80 CEPAS.

TABLA XIV.
MULTIRESISTENCIA EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*.

No. DE MARCADORES DE RESISTENCIA	No. DE CEPAS (%)		PATRON DE RESISTENCIA	No. DE CEPAS CON PATRONES DE RESISTENCIA MAS FRECUENTE	
	HOSPITAL	MEDIO AMBIENTE		HOSPITAL	MEDIO AMBIENTE
9	3 (3.8)	0	ApCmGmKmNiNxSmTcTo	2	0
			AmApCmGmKmNiSmTcTo	1	0
8	6 (7.5)	0	ApCmGmKmNiNxSmTo	4	0
			AmApCmGmKmNiSmTc	1	0
			ApCeGmKmNiSmTcTo	1	0
7	8 (10.0)	3 (3.8)	ApCmGmKmNiSmTc	3	0
			ApCmGmKmNiSmTo	3	0
			ApCmGmKmNiNxTc	1	0
			ApCeCmGmNiTcTo	1	0
			ApCeGmKmNiSmTo	0	2
			ApCeCmNiNxSmTc	0	1
6	14 (17.5)	7 (8.8)	ApCmGmKmNiTc	5	0
			ApCmKmNiNxTc	2	5
			ApCeCmNiNxSm	0	2
			ApGmKmNiSmTo	2	0
			ApCmKmNiSmTc	1	0
			ApCmGmNiNxTc	1	0
			ApCmGmNiSmTc	1	0
			ApCeCmNiSmTc	1	0
			ApCeCmNiTcTo	1	0

TABLA XV.
MULTIRESISTENCIA EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

No. DE MARCADORES DE RESISTENCIA	No. DE CEPAS (%)		PATRON DE RESISTENCIA	No. DE CEPAS CON PATRONES DE RESISTENCIA MAS FRE- CUENTE	
	HOSPITAL	MEDIO AMBIENTE		HOSPITAL	MEDIO AMBIENTE
5	22 (27.5)	18 (22.5)	ApCmNiNxTc	5	10
			ApCmKmNiTc	5	0
			ApGmKmNiTc	2	0
			CeKmNiSmTo	0	2
			ApCeCmNiNx	1	1
			ApCmNiSmTc	2	0
			ApCmCmNiTo	1	0
			ApCmKmNiTc	1	0
			ApCmCmNiNx	1	0
			ApGmNiNxTc	1	0
			ApGmNiSmTo	1	1
			CmGmKmNiNx	0	1
			ApCeCmKmNi	0	1
			ApCaCmNiSm	0	1
			ApCmKmNxTc	0	1
			4	13 (16.3)	24 (30.0)
ApCeNiNx	0	4			
ApCmCmNi	3	0			
ApCeKmNi	2	0			
ApCmNiNx	2	2			
ApCeNiSm	0	2			
ApCeCmNi	0	4			
ApNiNxTc	0	1			

TABLA XVI.

MULTIRESISTENCIA EN CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

No. DE MARCADORES DE RESISTENCIA	No. DE CEPAS (%)		PATRON DE RESISTENCIA	No. DE CEPAS CON PATRONES DE RESISTENCIA MAS FRECUENTE	
	HOSPITAL	MEDIO AMBIENTE		HOSPITAL	MEDIO AMBIENTE
3	4 (5.0)	14 (17.5)	ApCeNi	0	5
			ApCmNi	1	3
			ApGmNi	2	0
			CeKmNi	0	3
			ApNiTe	0	1
			ApNiTo	1	0
			ApKmNi	0	1
2	8 (10.0)	11 (13.8)	ApNi	5	10
			CeTc	3	0
			CmNi	0	1
1	1 (1.3)	2 (2.5)	Ap	1	1
			Ce	0	1

CEPAS DE REFERENCIA:

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853),

Staphylococcus aureus (ATCC 26923),

TOTAL DE CEPAS ESTUDIADAS: 160.

TABLA XVII. *Pseudomonas aeruginosa*
 PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES*

ENZIMAS	No. TOTAL DE CEPAS PRODUCTORAS (%)		No. TOTAL DE CEPAS PRODUCTORAS (%)	
			A*	B*
Proteasa ***	76	(95.0)	46 (97.9)	30 (90.9)
Hemolisina	65	(81.3)	38 (80.9)	27 (81.8)
ADNasa	53	(66.3)	24 (51.1)	29 (87.9)
Gelatinasa	52	(65.0)	34 (72.3)	18 (54.5)
Lecitinasa	41	(51.3)	29 (61.7)	12 (36.4)
Lipasa	38	(47.5)	30 (63.8)	8 (24.2)
Coagulasa	4	(5.0)	4 (8.5)	0 - - -

TOTAL DE CEPAS ESTUDIADAS : 80

*A: HOSPITAL DR. RUBEN LEÑERO

**B: HOSPITAL DR. MANUEL GEA GONZALEZ

***CASEINASA.

TABLA XVIII. *Pseudomonas aeruginosa*. PRODUCCION DE ENZIMAS EXTRACELULARES.

ENZIMAS	No. TOTAL DE CEPAS PRODUCTORAS: HOSPITAL	(%) MEDIO AMBIENTE
Proteasa*	76 (95.0)	24 (30.0)
Hemolisina	65 (81.3)	60 (75.0)
ADNasa	53 (66.3)	30 (37.5)
Gelatinasa	52 (65.0)	38 (47.5)
Lecitinasa	41 (51.3)	38 (47.5)
Lipasa	38 (47.5)	26 (32.5)
Coagulasa	4 (5.0)	3 (3.8)

SE ESTUDIARON 160 CEPAS; 80 DE HOSPITAL Y 80 DE MEDIO AMBIENTE.

*CASEINASA.

TABLA XIX. ESTUDIO COMPARATIVO DE RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS -
 ENTRE CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa*, AISLADAS DE HOSPITAL* Y --
 MEDIO AMBIENTE.

ANTIMICROBIANOS	No. TOTAL DE CEPAS RESISTENTES	No. DE CEPAS RESISTENTES	
		HOSPITAL (%)	MEDIO AMBIENTE
Polimixina	0	0	0
Rifampicina	0	0	0
Amikacina	2 (1.2)	2 (2.5)	0
Tobramicina	15 (9.4)	12 (15.0)	3 (3.8)
Gentamicina	25 (15.6)	23 (28.8)	2 (2.5)
Estreptomicina	27 (16.9)	14 (17.5)	13 (16.6)
Kanamicina	47 (29.4)	32 (40.0)	15 (18.8)
AC Nalidixico	54 (33.8)	33 (41.3)	21 (26.3)
Tetraciclina	97 (60.6)	66 (82.5)	31 (38.8)
Cloranfenicol	105 (65.6)	62 (77.5)	43 (53.8)
Ampicilina	145 (90.6)	75 (93.8)	70 (87.5)
Nitrofurazona	145 (90.6)	69 (86.3)	76 (95.0)

CEPAS CONTROL. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 278553) y *Staphylococcus aureus* (ATCC -
 25923)

SE ESTUDIO UN TOTAL DE 160 CEPAS.

* HOSPITAL DR. RUBÉN LEÑERO Y DR. MANUEL GEA GONZALEZ.

TABLA XX.

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE PACIENTES .

C E P A	MORFOLOGIA COLONIAL	PROPIEDADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:
		PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECITINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	
RGTZ*	L	+	+	+	-	+	+	-	+	Ap Cm Ni Nx Tc
RGTZ*	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
RGTZ*	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
RGTZ*	R	+	+	+	-	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
3234A**	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
3234B**	L	+	+	+	-	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
3234Ps**	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc

L= LISAS, R= RUGOSAS

Ap= Ampicilina, Cm Cloranfenicol, Ce Cefalosporina, Ni Nitrofurazona

Nx Acido Nalidixico, Tc Tetraciclina

+ POSITIVO

- NEGATIVO

* Hospital Dr. R. Leñero.

** Hospital Dr. M. Géa González

TABLA XXI
 CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE PACIENTES

C E P A	MORFOLOGIA	PROPIEDADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:
	COLONIAL	PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECITINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	
RJ*	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Ce Cm Ni Te To
RJ*	L	+	+	-	+	-	+	-	+	Ap Ce Cm Gm Ni Te To
M4083**	L	+	+	+	-	-	+	+		Ap Ce Km Ni
NC114-5**	L	+	+	+	+	+	+	-	+	Ap Ce Km Ni
K4982**	L	+	+	+	+	-	+	-		Ap Ce Km Ni
REZA *	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Ce Km Ni Se

L- LISAS

Ap Ampicilina, Cm Cloranfenicol, Ce Cefalosporina, Gm Gentamicina,
 Ni Nitrofurazona, Nx Acido Nalidixico, Tc. Tetraciclina

+ POSITIVO

- NEGATIVO

* Hospital Dr. R. Leñero

** Hospital Dr. M. Géa González

TABLA XXII,
 CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE PACIENTES*

C E P A	MORFOLOGIA		PROPIEDADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:
	COLONIAL		PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECITINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	
4466	L		+	-	-	-	-	+	-	-	Ce Tc
4466	L		-	-	-	-	+	+	-	-	Ce Tc
4466B	L		-	+	-	-	+	-	-	-	Ce Tc
4366	L		+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
4366	R		+	+	+	-	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
4366	R		+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Cm Ni Nx Tc

L= LISAS, R= RUGOSAS

Ap Ampicilina, Cm Cloranfenicol, Ce Cefalosporina, Ni Nitrofurazona

Nx Acido Nalidixico, Tc Tetraciclina

+ POSITIVO

- NEGATIVO

* HOSPITAL DR. M. GEA GONZALEZ

TABLA XXIII.

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*
AISLADAS DE MEDIO AMBIENTE.

CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	PROPIEDADES ENZIMATICAS							PIGMENTO	RESISTENTE A:
		PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECTINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA		
H8	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Ce Cm Ni
H9	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Ce Cm Ni Nx Tc
H9	L	+	+	+	+	-	+	-	-	Ap Ce Cm Ni Nx Tc
H11	L	+	+	+	+	-	-	-	+	Ap Cm Ni Tc
H11	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ni
H11	R	-	+	+	+	-	+	-	-	Ap Cm Ni Tc

L= LISAS, R= RUGOSAS

-Ap Ampicilina, Ce Cefalosporina, Cm Cloranfenicol

Km Kanamicina, Ni Nitrofurazona, Nx Acido Nalidixico

Tc Tetraciclina

+ POSITIVO

- NEGATIVO.

TABLA XXIV
 CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS
 DE MEDIO AMBIENTE

CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	PROPIEDADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:
		PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECITINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	
14	L	-	-	-	-	-	+	-	-	Ap Ni Nx Tc
14	L	-	-	-	-	-	-	-	-	Ap Cm No Tc
15	L	-	-	+	-	-	-	-	+	Ap Ni
16	L	-	-	+	-	-	-	-	-	Ap Ni
17	L	-	-	+	-	-	+	-	+	Ap Cm Ni Tc
18	L	+	+	+	+	-	+	-	+	Ap Ce Ni Nx Sm Tc

L = LISAS

Ap= Ampicilina, Ce= Cefalosporina, Cm= Cloranfenicol, Km= Kanamicina

Ni= Nitrofurazona, Nx= Acido Nalidixico, Tc= Tetraciclina

+ POSITIVO

- NEGATIVO

TABLA XXV

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE PACIENTES*

CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	PROPIEDADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:						
		PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECTINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	Ap	Cm	Gm	Km	Ni	Sm	To
G47	L	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Ap	Cm	Gm	Km	Ni	Sm	To
G54	L	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	Ap	Cm	Gm	Km	Ni	Nx	Sm To
G55	L	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	Ap	Gm	Km	Ni	Sm	To	
G60	L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	Ap	Cm	Gm	Km	Ni	Nx	Sm To
G62	L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	Ap	Cm	Gm	Km	Ni	Nx	Sm Tc To

L = LISAS
 Ap = Ampicilina, Cm= Cloranfenicol, Gm= Gentamicina, Km= Kanamicina
 Ni = Nitrofurazona, Nx= Acido Nalidixico, Sm= Streptomina, Tc= Tetraciclina, To= Tobramicina
 + POSITIVO
 - NEGATIVO
 *HOSPITAL DR. R. LENERO

TABLA XXVI

CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS DE PACIENTES
DR. MANUEL GEA GONZALEZ

CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	PROPIEADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:		
		PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LECTINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	Ap	Cm	Gm
G46	L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	Ap	Cm	Gm
										Km	Ni	Sm
										To		
G49	L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	Km	Ce	Te
										To		
G52	L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	Ap	Gm	Km
										Ni	SM	To
G61	L	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	Ap	Cm	Gm
										Km	Ni	Nx
										Sm	Tc	To
3173A	L	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	Ni	To	Tc

L= LISAS

Ap= Ampicilina, Ce Cefalosporina, Cm Cloranfenicol, Gm Gentamicina, Km Kanamicina

Ni Nitrofurazona, Nx Acido Nalidixico, Sm Estreptomicina, Tc Tetraciclina, To Tobramicina

+ POSITIVO

- NEGATIVO

*HOSPITAL DR. M. GEA GONZALEZ

TABLA XXVII
 CARACTERISTICAS FENOTIPICAS DE *Pseudomonas aeruginosa* AISLADAS
 DE MEDIO AMBIENTE.

C E P A	MORFOLOGIA	PROPIEDADES ENZIMATICAS								RESISTENTE A:
	COLONIAL	PROTEASA	GELATINASA	HEMOLISINA	LEGITINASA	LIPASA	ADNasa	COAGULASA	PIGMENTO	
G2	L	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ap Ce Ni Sm
G4	M	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ap Ce Ni Nx
G19	M	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ap Ce Cm Ni Nx Sm
G26	M	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	Ap Ce Ni Nx
G28	L	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	Ap
G38	M	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	Sensible a los antimicrobianos probados
G42	R	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	Ap Ni

L= LISA, M= MUCOIDE, R= RUGOSA

Ap Ampicilina, Ce Cefalosporina, Cm Cloranfenicol, Ni Nitrofurazona

Nx Acido Nalidixico, Sm Estreptomina

+ POSITIVO

- NEGATIVO

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Mendoza, H.P., 1966. Inmunizaciones Antibacterianas y --
contra germen es oportunistas. Academia Nacional de Medicina
na, Simposio sobre inmunizaciones.
- 2.- Artz, P.C., Moncrief, A.J. y Pruitt, A.B., 1979. Burns a
team approach. Saunders Company. Phyladephia, 335-353 pp.
- 3.- Graevenitz, A., 1977. The role of oportunist bacteria in_
human disease. Annual review of microbiology, 31: 447-472
pp.
- 4.- Buchanan, R.E. y Gibbons, N.E. (editores)., 1974. Berge's
Manual of determinative bacteriology, Willians and Wilkins
Baltimore Md., 8a. edition, 1246 pp.
- 5.- Nordstrom, K., Yamamoto, T., 1967. Presence of Rhabidoso-
mes in various species of bacteria and their morphological
characteristics. J. of Bacteriology, 94: 1744-1756.
- 6.- Richmond, H.M. y Clarke, H.P. (editores), 1975. Genetics -
and Biochemistry of *Pseudomonas*. John & Sons. Great Britain.
1-336 pp.
- 7.- Droop, M.P. y Jannasch, H.W., 1977. Advances in Acuatic - -
Microbiology. Academic Press, New York-London, Vol. 1, - -
273-296 pp.
- 8.- Carpenter, L.P., 1979. Microbiologia. 4a. ed. Interamericana
na. México, 127-129 pp.
- 9.- Lennet, E.H., Apaulding, E.H. y Truant, J.P., 1981. Manual
of clinical Microbiology. 3a. ed. American Society for My-
crobiology, Washington, D.C. 250-269 pp.

- 10.- Burrows, W., 1979. Tratado de Microbiologia. 20a. ed. Interamericana, México, 613-618 pp.
- 11.- Wretling, B. y Wadstrom, T., 1977. Purification and properties of a Protease with Elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. of General Microbiology, 103: 319-324.
- 12.- Liu, V.P., 1962. Nonmotile varieties of *Pseudomonas aeruginosa* producing melaninlike pigment. J. of Bacteriology 84: 378 p.
- 13.- Coxi, D.C., y Parker, J., 1979. Use of the production of 2-amino acetophenona in the identification of *P. aeruginosa*. J. of Bacteriology. 9: 479-484.
- 14.- Schlessinger, D., 1977. Microbiology. American society for Microbiology. Washington, D.C. 115-169 pp.
- 15.- Bradley, D.E., 1972. A study of pili on *Pseudomonas aeruginosa*. Genet. Res. 19: 39-51.
- 16.- Bradley, D.E., 1975. The occurrence of pili associated with a plasmid of the W compatibility group. Biochem. Biophys. Res. Commun., 64: 918-925.
- 17.- Frost, S.L. y Paranchych, W., 1977. Composition and molecular weight of pili purified from *P. aeruginosa*. J. of Bacteriology, 131: 259-269.
- 18.- Davis, B., Dubecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H., Wood, B., 1980. Microbiologia. 2a. ed. Harper and Row Publishers. New York, 27-31, 110-115. pp.
- 19.- Costerton, J.W., Greese, G.G. y Cheng, C.J., 1978. How bacteria stick. Scientific American, 238: 85-86.

- 20.- Dogget, R.G., 1979. *Pseudomonas aeruginosa*. Academic Press, New York-London, 1-504 pp.
- 21.- Sensakovic, J. y Bartell, P., 1974. The slime of *Pseudomonas aeruginosa*: Biological characterization and possible role in experimental infection. *J. of Infectious Diseases*, 27: 614-619.
- 22.- Blackwood, L. y Pennington, J., 1981. Influence of mucoid coating on clearance of *P. aeruginosa* from lungs. *Infection and Immunity*, 32: 443-445.
- 23.- Dimitracopolus, G., Sensakovic, J. y Bartell, P., 1974. Slime of *P. aeruginosa* : In vivo production. *Infection and Immunity*, 10: 152-156.
- 24.- Williams, A. y Wimpenny, J., 1977. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB 11264 grown in batch culture. *J. of general Microbiology*, 102: 13-21.
- 25.- Sutherland, I., 1977. Surface Carbohydrates of the Prokaryotic Cell. Academic Press, New York-London, 1-472 pp.
- 26.- Burman, L.G., Nodstrom, K. y Bloom, G.D., 1972. Murein and the outer penetration barrier of *Escherichia coli* K-12, *Proteus mirabilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of bacteriology*, 110: 1364-1374.
- 27.- Nicas, I.T., y Hancock, E.W.R., 1980. Outer membrane protein H-I of *P. aeruginosa*: involvement in adaptive and mutational resistance to Ethylenediaminetetraacetate, Polimyxin B and Gentamicin. *J. of. Bacteriology*, 143: 872-878.

- 28.- Matsushita, y col., 1980. Membrane-bound respiratory chain of *P. aeruginosa* grown aerobically. *J. of bacteriology*, 141: 389-392.
- 29.- Mondragón, M.G., 1975. Inducción de Síntesis de Colicinas con Acido Nalidixico y Rifampicina. (tesis) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 39 pp.
- 30.- Janda, J. y Bottone, E., 1981. *P. aeruginosa* enzyme profiling: Predictor of potencial invasiveness and use as epidemiological tool. *J. of clinical Microbiology*, 14: 55-60.
- 31.- Cross, S.A. y col., 1980. Evidence for the role of toxin A in the pathogenesis of infection with *P. aeruginosa* in humans. *J. of Infectious Diseases*, 142: 538-546.
- 32.- Vasil, L.M., Kabat, D. e Iglewski, H.B., 1977. Structure activity of an exotoxin of *P. aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 16: 353-361.
- 33.- Morihara, K., y col., 1981. Effects of proteases on the structure and activity of *P. aeruginosa* exotoxin A. *Infection and Immunity*, 24: 837-842.
- 34.- Fernandez, B.P., y Cundy, R.K., 1980. Demonstration of cell envelope-bound exotoxin A in *P. aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 28: 411-416.
- 35.- Walker, L.H. y col., 1979. Evaluation of *P. aeruginosa* toxin A in experimental rat burn wound sepsis. *Infection and Immunity*, 25: 828-830.

- 36.- Pavlovskis, R.O., y col., 1981. Protection against experimental *P. aeruginosa* infection in mice by active immunization with exotoxin A Toxoids. *Infection and Immunity*, 32: 681-689.
- 37.- Pollac, M., Callaha, T.L. y Taylor, N., 1976. Neutralizing antibody to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in human sera: Evidence for in vivo toxin production during infections. *Infection and Immunity*, 14: 942-947.
- 38.- Cryz, J.S. y col., 1981. Effect of formalin toxoiding on *Pseudomonas aeruginosa* Toxin A; Biological, chemical and Immunochemical studies. *Infection and Immunity*, 32: 759-768.
- 39.- Sokol, A.P. y col., 1981. Production of exoenzyme S by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 34: 147-153.
- 40.- Bjorn, J.M. y col. 1979. Production of exoenzyme S during *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 34: 147-153.
- 41.- Scharmann, W., 1976. Interaction of purified leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* with bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity*, 13: 1046-1053.
- 42.- Liu, V.P., 1967. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis; Effects of lecithinase and protease. *J. Infect. Dis.*, 116: 112-116.

- 43.- Hedberg, Sc. M. Miller, J., y Tompkins, V., 1969. Elastase activity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital patients. The American journal of clinical pathology, 39: 631-633.
- 44.- Paulouskis, R.O. y Wretlind, B., 1979. Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infection. Infection and Immunity, 24: 181-187.
- 45.- Jensen, E.S., Fecycz, T.I., y Campbell, N.J., 1980. Nutritional factors controlling exocellular protease production by *Pseudomonas aeruginosa*, J. of Bacteriology, 144: 844-847.
- 46.- Liu, V.P., 1967. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. J. infect. Dis. 14: 481-489.
- 47.- Morihara, K., 1964. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bacteriology, 88: 745-757.
- 48.- Mull, J.D., y Callahan, W.S., 1965. The role of the elastase of *Pseudomonas aeruginosa* in experimental infection. Exper. Molec. Path., 4: 567-575.
- 49.- Kawaharajo, K. y Homma, J.Y., 1975. Pathogenesis of the mouse keratitis produced with *Pseudomonas aeruginosa*. Japan J. Exp. Med., 45: 515-524.
- 50.- Morihara, K., y Tsuzuki, H., 1966. Substrate Specificity of Elastolytic and nonelastolytic proteinases from *Pseudomonas aeruginosa*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 114: 158-165.

- 51.- Watanabe, M., Murata, R., y Homma, Y.J., 1978. Partial purification of Heat-labile hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Japan. J. Exp. Med. 48: 449-453.
- 52.- Kurioga, S. y Liu, V.P., 1967. Effects of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase C activity. J. of Bacteriology, 93: 670-674.
- 53.- Okada, K., Kawaharajo, K., Kasai, T., y Homma, Y.J., -- 1980. Effects of somatic component of *Pseudomonas aeruginosa* on protective immunity in experimental mouse burn infection. Japan. J. Exp. Med. 50: 53-61.
- 54.- Edwards, P.R. y Ewings, W.H., 1974. Identification of Enterobacteriaceae. Third Edition. Burgess Publishing Co. Minneapolis. 1-377 pp.
- 55.- Merck, 1978. Reactivos orgánicos e inorgánicos garantizados, medios de cultivo. Equipos de diagnóstico clínico. México. 117-210 pp.
- 56.- Merck, 1978. Manual de Microbiología. México. 1-433 pp.
- 57.- Mac Faddin, J.F., 1976. Biochemical tests for indication of medical bacteria. The Williams and Wilkins Company - Baltimore. 1-310 pp.
- 58.- Bailey, W.R., y Scott, G.E. Diagnostic microbiology. -- fourth edition. Mosby Company. Saint. Louis. 1-414 pp.
- 59.- Sokol, A.P., Ohman, E.D., y Iglewski, H.B. 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Clinical Microbiology 9: 538-540.

- 60.- Janda, M.J., Sheehan, J.D, y Bottone, J.E., 1982. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* colonial dissociants on a proteasa detection medium. *J. of Clinical Microbiology*, 15: 178-180.
- 61.- Brow, M. y Foster, J., 1970. A simple diagnostic milk medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. of Clinical Pathol.* 23: 172-177.
- 62.- Lorian, M.D.V., 1980. Antibiotics in laboratory medicine. Williams and Wilkins. Baltimore/London. 1-54 pp.
- 63.- Reynolds, H., Levine, D., Wood, R., Zierdt, C., Dale, D y Penington, J., 1975. *Pseudomonas aeruginosa* infections: Persisting problems and current research to find new therapies. *Annals of Internal Medicine.* 82: 819-931.
- 64.- Lynn, M., Sensakovic, J., y Bartell, P., 1977. In vivo distribution of *Pseudomonas aeruginosa* slime glycolipoprotein: Association with leukocytes. *Infection and Immunity*, 15: 109-114.
- 65.- Kawaharajo, K., Homma, J.Y., Abe, C., Aoyama, Y. and Morihara, K., 1975. In vivo studies on protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa* on skin. *Japan. J. Exp. Med.* 145: 79-100.
- 66.- Pier, G., y col., 1978. Isolation and characterization of a high-molecular-weight polisaccharide from the slime of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 22: 908-918.

- 67.- Ramphal, R. y col., 1980, Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to tracheal cells injured by influenza infection or by endotracheal intubation. *Infection and Immunity*, 27: 614-619.
- 68.- Lam, J., Chan, K., y Costerton, J.W. 1980. Production of mucoide microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 28: 546-556.
- 69.- Sensakovic, W.J., y Bartell, F.B., 1977. Glycolipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa* as a protective antigen against *P. aeruginosa* infection in mice. *Infection and Immunity*, 18: 304-309.
- 70.- Sheenan, J.D., Janda, M.J. y Bottone, J.D., 1982. *Pseudomonas aeruginosa*: Changes in antibiotic susceptibility, enzymatic activity, and antigenicity among colonial morphotypes. *J. of Clinical Microbiology*, 15: 926-930.
- 71.- Holder, A.I. y Haidaris, G.C., 1979. Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: extracellular protease and elastase as *in vivo* virulence factors. *Can J. Microbiol.*, 25: 593-599.
- 72.- Snell, K., y col., 1978. Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*, 19: 839-845.

- 73.- Okada, K., Kawaharajo, K., Kasai, T. y Homma, Y.J., --
1980. Effects component of somatic component of *Pseudo-*
monas aeruginosa on protective immunity in experimental
mouse burn infection. Japan. J. Exp. Med. 50: 53-61.
- 74.- Kregger, S.A., y Gray, D.L., 1978. Purification of --
Pseudomonas aeruginosa proteases and microscopic characte-
rization of pseudomonal protease induced rabbit corneal
damage. Infection and Immunity, 19: 630-648.
- 75.- Sanai, Y., Takeshi, K., Homma, Y. y Kamamoto, H., 1978.
Production of exotoxin, protease and elastase of *Pseudo-*
monas aeruginosa strains isolated from patients and envi-
ronmental specimens. Japan, J. Exp. Med., 48: 553-556.
76. Kawaharajo, K., Homma, .J.Y., Doyama, Y. y Morihara, K.,
1975. In vivo studies on protease and elastase from --
Pseudomonas aeruginosa. Japan. J. Exp. Med., 45: 79-88.
- 77.- Guillerand, H.E. y Murray, R.C.E., 1976. Ultrastructur-
al study of polymixin-resistant isolates of *Pseudomonas*
aeruginosa. J. of Bacteriology, 125: 267-281.
- 78.- Guilleland, H.E. y Lyle, D.R., 1979. Chemical altera-
tions in cell envelopes of polymixin-resistant. *Pseudomo-*
nas aeruginosa. J. of Bacteriology, 18: 232-238.
- 79.- Shibl, L.M. y Al Sawaygh, J.A., 1980. Antibiotic inhi-
bition of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* - -
J. Med. Microbiology, 13: 345-349.
- 80.- Holloway, W.B., Krishnapillal, V., y Morgan, F.A., 1979,
Cromosomal genetic of *Pseudomonas*. Microbiology reviews
43: 73-102,

- 81.- Vázquez, D., 1981. Inhibidores de biosíntesis de proteínas. *Scientific American*, 62: 130-144.
- 82.- Fukita, K., Lilly, H.A., Kioson, A.A. y Liffe, G., 1981. Gentamicin resist *Pseudomonas aeruginosa* infection from mattresses in a burns unit. *British Medical Journal*, 283: 219-220.
- 83.- Scudamore, R.A. y Goldner, M., 1982. Limited contribution of the outer penetration barrier to towards intrinsic antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Can J. Microbial.*, 28: 169-175.