



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

U. N. A. M.

ESTUDIO DE LA CONTRIBUCION DE PLASMIDOS
Y BACTERIOFAGOS DE CEPAS CLINICAS DE
Pseudomonas aeruginosa A SU PATOGENICIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JAIME ESCOBAR HERRERA



Los Reyes, Iztacala

1987



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio 4 de la Unidad de Morfología y Función (U.M.F.) de la I.N.C.S. Iztacala bajo la dirección del M. en C. Sergio Vaca Pacheco y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONABNA-020954).

A MIS PADRES

MARIA T. y FRUCTUOSO

Por el cariño, apoyo, dedicación
y entusiasmo que siempre nos han
brindado.

A MIS HERMANOS

JORGE A. y ARTURO

Por enseñarme el camino
de la vida.

A MIS HERMANAS

ARACELI, RITA y MIROSLAVA

Por su cariño, apoyo y ale
gria.

A MI ESPOSA E HIJA

Por todo el amor e ilusión
que han despertado en mí.

AGRADECIMIENTO

A mis profesores y amigos Sergio Vaca y Bertha Hashimoto.

A mis amigos del laboratorio de genética.

A mis amigos de generación 80-83.

A Rubén Revilla y Roberto Quezada por el apoyo, orientación y facilidades prestadas en su laboratorio del Departamento de Biología Celular del CINVESTAV del I.P.N., para cubrir - el segundo objetivo de este trabajo.

Gracias.

INDICE

	Pag.
INTRODUCCION _____	1
Características generales de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> _____	1
Distribución de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> en la naturaleza _____	3
Patogenicidad de <u>Pseudomonas aeruginosa</u> _____	6
Importancia de plásmidos y bacteriófagos en la virulencia bacteriana _____	8
Proteasa (s) microbiana (s) que degradan a las inmunoglobulinas _____	11
OBJETIVOS _____	13
MATERIAL Y METODOS _____	14
Origen de las cepas _____	14
Soluciones y medios de cultivo _____	16
Método de aglutinación _____	17
Método de aglutinación cruzada _____	19
Medición de tiempos generacionales _____	20
Medición de la dosis letal 50 para Ratones CD 1 _____	21
Proteólisis bacteriana de Ig A e Ig G _____	22
RESULTADOS _____	26
DISCUSIÓN _____	38
BIBLIOGRAFIA _____	43

INTRODUCCION

Características generales de Pseudomonas aeruginosa.

Entre las numerosas especies del género Pseudomonas, - prácticamente no existen sino tres que son patógenas para - el hombre: P. aeruginosa, P. pseudomallei, P. mallei. Entre estas especies la primera es la más patógena y más difundida en la naturaleza (7).

El género Pseudomonas fué propuesto en 1966 por Sta--- nier, Palleroni y Doudoroff (43) en base a las siguientes - características: son microorganismos aerobios estrictos, -- unicelulares, con un tamaño de 0.5-1 micras por 1.5-4 mi--- cras, móviles debido a la presencia de por lo menos un fla- gelo polar, su energía la obtienen por respiración, no son productores de endosporas, tienen un porcentaje de G-C en - su ADN de 58-69 moles por ciento.

Para la identificación de P. aeruginosa se toman en -- cuenta las respuestas de las bacterias a las pruebas bioquí micas standard (Tabla 1). Sin embargo, existe una forma más sencilla de identificación presuntiva que se basa en morfo- logía colonial y características fenotípicas generales. En- tre éstas últimas podemos encontrar el olor típico "afruta- do", debido a la producción de aminoacetofenona (14), como

Tabla 1

Carácter	Respuesta
Medio abierto de glucosa OF, ácido	+
Medio de maltosa OF, ácido	-
Gas glucosa	-
Indofenol oxidasa	+
Catalasa	+
Arginina dihidrolasa	+
Lisina, ornitina descarboxilasa	-
H ₂ S	-
Indol, rojo de metilo y acetil metilcarbinol	-

Modificada de: Gilardi, G. L. (1979) (14).

también las características ya mencionadas en el párrafo anterior y a la pigmentación de algunas cepas de P. aeruginosa productoras de pigmentos, entre los que se encuentran la piocianina, substancia azulosa que posee cierta actividad antimicrobiana y la fluoresceína, substancia verde fluorescente (22). Además, elaboran otras substancias extracelulares que están relacionadas con su patogenicidad (14); entre éstas tenemos: la exotoxina A, la proteasa alcalina, la elastasa, el moco, la leucocidina y la fosfolipasa C, cuyos efectos se describen en la tabla 2, además de producir la endotoxina común a todas las bacterias gram negativas.

En cuanto a morfología colonial, puede observarse diversos tipos coloniales (14).

Distribución de Pseudomonas aeruginosa en la naturaleza.

P. aeruginosa se encuentra muy extendida en la naturaleza, ocupando varios habitats como son: suelos, sistemas acuáticos marinos y de agua dulce en los que juegan un papel muy importante en la degradación de substancias orgánicas, además de encontrarse sobre la superficie de plantas y epitelios de organismos animales (41).

Tabla 2

Substancias extracelulares de P. aeruginosa relacionadas --
con su virulencia.

Substancia	Efectos
Exotoxina A	Inhibición de la síntesis de proteínas por ADP-Ribosilación de -- EF-2; letal para ratones.
Elastasa y Proteasa	Hemorragia de órganos internos, destrucción de tejido corneal (8) destrucción de 7 de los 9 componentes del complemento, Inhibición del movimiento de leucocitos polimorfonucleares y de la fagocitosis (8). Inactivación del Inhibidor alfa 1 de las serin proteasas tisulares.
Moco	Inhibición de fagocitosis (leuco) efecto similar al producido por infección en ratón con bacterias viables.
Leucocidina	Destrucción de leucocitos.
Fosfolipasa C	Hidrólisis de fosfolípidos (hemólisis). Probable efecto citopático en pulmón.

Tomado de: Hona, J. Yuzuru (1978) (21).

Por observaciones hechas con microscopio óptico y electrónico se ha demostrado que este microorganismo crece formando microcolonias (envueltas por moco de naturaleza polisacárida) adheridas al suelo, superficies de plantas, sobre la superficie de sistemas marinos y dulceacuícolas; también se ha sugerido que esta cubierta polisacárida le ofrece protección contra la actividad de bacteriófagos y amibas de vida libre que abundan en los sistemas habitados por estos bacilos (6).

En 1977 Schroth (41), encontró que una de dos muestras de suelos, que nunca se habían cultivado, contenían P. aeruginosa. Este microorganismo se encuentra más frecuentemente y a altas concentraciones en suelos fertilizados y donde la humedad es cercana al 90%; sin embargo, no se sabe si este bacilo es introducido por plantas o aguas contaminadas. --- Mientras que, en sistemas marinos y dulceacuícolas P. aeruginosa es asociada a la presencia de materia fecal en donde hay actividad humana o animal.

P. aeruginosa crece como contaminante de agua potable (41), en agua destilada (11) y en ambientes hospitalarios húmedos (14), ésto se debe a la característica de versati--

lidad adaptativa a diversos medios ambientes que posee este microorganismo, así como a su capacidad de requerir nutrientes simples y a la habilidad de metabolizar más de 76 compuestos orgánicos diferentes (35, 41).

Patogenicidad de Pseudomonas aeruginosa.

Las características y versatilidad de P. aeruginosa le permiten estar presente en hospitales (Tabla 3), en donde se caracteriza por ser resistente a un gran número de antibióticos en virtud de que la mayoría de las cepas poseen plásmidos responsables de la resistencia (4, 5, 19, 26). Estas ventajas biológicas le permiten prevalecer por selección en estos ambientes, donde los antibióticos son ampliamente usados, causando entre el 10 y 20% de las infecciones de los pacientes hospitalizados (1), principalmente de aquellos que sufren quemaduras (38, 39), leucemia (13), fibrosis quística (16) o que han sido tratados con drogas inmunosupresoras (40).

Además de presentar plásmidos, las cepas clínicas de P. aeruginosa también poseen bacteriófagos (aproximadamente 98%-100%), en contraste con E. coli en la que la frecuencia de cepas clínicas lisógenas es aproximadamente del 10% (20).

Tabla 3

Origen de P. aeruginosa en hospitales

Jabones	Flores
Soluciones antisépticas	Comida
Cremas antisépticas	Ensaladas
Lavamanos	Catéters
Incubadoras	Esponjas
Equipos de inhalación	Sondas
Equipos de resucitación	Manos del personal
Antibióticos	Excremento de pacientes

Tomado de: Neu, Harold C. (1980) (15).

Importancia de plásmidos y bacteriófagos en la virulencia -
bacteriana.

Los plásmidos son elementos extracromosómicos de DNA, estables en bacterias y necesarios en la poza genética, pero no esenciales para el crecimiento y metabolismo bacteriano. No obstante, estos elementos genéticos contienen genes con alguna actividad suplementaria que permite a su huésped una mejor sobrevivencia en medios ambientes adversos, y por lo tanto, lo capacita para competir mejor con otros microorganismos de la misma o diferente especie (10).

Los plásmidos mejor conocidos desde el punto de vista médico son aquellos que confieren resistencia a antibióticos a las bacterias que los poseen. Sin embargo, numerosos estudios han permitido conocer algunos determinantes de patogenicidad codificados por plásmidos, tales como la adherencia, resistencia al suero, invasividad y mejor captación de hierro (31). Un ejemplo de éstos, es el análisis genético de cepas enterotoxigénicas de Escherichia coli aisladas tanto de humanos como de animales con diarrea, en el que se encontró que la incidencia de plásmidos conjugativos fué mucho más alta en estas cepas que en aquellas aisladas de individuos saludables (10). Además, estudios con cepas aisladas de cerdos jóvenes y becerros indican que los determinan

tes genéticos de producción de enterotoxina y de la elaboración de antígenos superficiales (tales como K88 y K99) fué transmisible por plásmidos (10). Otro ejemplo es el aumento de la virulencia de cepas de E. coli portadoras del plásmido Col V, el cual induce a un incremento de la resistencia a la actividad bactericida del suero (10).]

Papel de los bacteriófagos en la virulencia bacteriana.

Los bacteriófagos, están formados principalmente por proteínas y ADN en proporciones aproximadamente iguales; -- Stent en 1973 (42) los define como entidades subcelulares -- capaces de ingresar en las células vivas y de reproducirse sólo en dichas células. Así, los bacteriófagos son parásitos intracelulares obligados, a diferencia de otros parásitos intracelulares, el parasitismo de los bacteriófagos es a nivel genético. Se han descrito varios ejemplos en los -- que los bacteriófagos contribuyen a la patogenicidad de las bacterias por conversión lisogénica, tal es el caso de la -- toxina diftérica cuya síntesis está bajo el control genético del bacteriófago beta que lisogeniza al bacilo Corynebacterium diphtheriae (12). No se sabe con claridad el papel -- que juega esta proteína que se sintetiza por efecto de la -- información genética del fago. Sin embargo, tanto la proteí

na de envoltura como la toxina se sintetizan simultáneamente; no obstante, son diferentes. Esto ha hecho pensar que la toxina diftérica se deriva de la proteína de envoltura del fago, pero tras modificaciones sufridas después de sintetizarse. Otro ejemplo de síntesis de toxinas dependientes de la presencia de profago son: la toxina del estreptococo hemolítico (34, 48), del estafilococo (42) y del Clostridium botulinum (9). La primera de éstas provoca la escarlatina, que se caracteriza por el enrojecimiento de piel y mucosas, por parálisis capilar y lesiones del endotelio; también son sensibles el tejido hepático, el renal y el cardíaco. En cuanto a las toxinas alfa y beta del estafilococo, éstas poseen poder necrótico para la piel y las mucosas. En el último caso, la toxina que se produce es de las de mayor poder patógeno-virulento elaborada por una bacteria. Además, en P. aeruginosa se reportó otro ejemplo de conversión lisogénica, en la que el fago D3 causa cambios en el antígeno "O" (23), que impiden que la cepa lisogenizada sea capaz de adsorber a fagos homólogos, y disminuye la fagocitosis y muerte de éstas por macrofagos de ratón "in vitro".

Proteasa (s) microbiana (s) que degradan a las inmunoglobulinas.

El sistema inmune secretor (SIS) parece encontrarse en equilibrio dinámico con los microorganismos que normalmente colonizan las mucosas. Este equilibrio puede verse alterado por factores que aceleren o frenen el crecimiento microbiano, o que disminuyen o aumentan la efectividad de la respuesta del SIS. Cuando los organismos patógenos desplazan el equilibrio, ocasionan las enfermedades. Uno de los mecanismos empleados por los microorganismos es la producción de proteasa (s) que degradan a las inmunoglobulinas (27, 30, 33).

La producción de ésta (s) proteasa (s) contra estas inmunoglobulinas ha sido considerada como un factor de virulencia de los microorganismos en los que se encuentra, ya que se menciona que la proteólisis disminuye la respuesta inmune local y por lo tanto facilita la colonización de tejidos mucosos (46). Por ejemplo, en las especies patógenas adherentes como Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae, Streptococcus sanguis y Streptococcus pneumoniae, la actividad de la proteasa contra la Ig A correlaciona con la virulencia específica de cepa (29). Además se ha detectado la habilidad de Streptococcus pneumoniae de degradar inmunoglobulinas secretorias humanas tales como Ig A secreto-

ria (sIg A), Ig G e Ig M (sericas), ésta fué probada en 102 cepas que fueron aisladas de pacientes con otitis media en fase aguda, meningitis y pneumonia como también de personas con caries. La habilidad para degradar sIg A, Ig G e Ig M - fué revelada en 50, 84 y 96 cepas respectivamente (46).

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

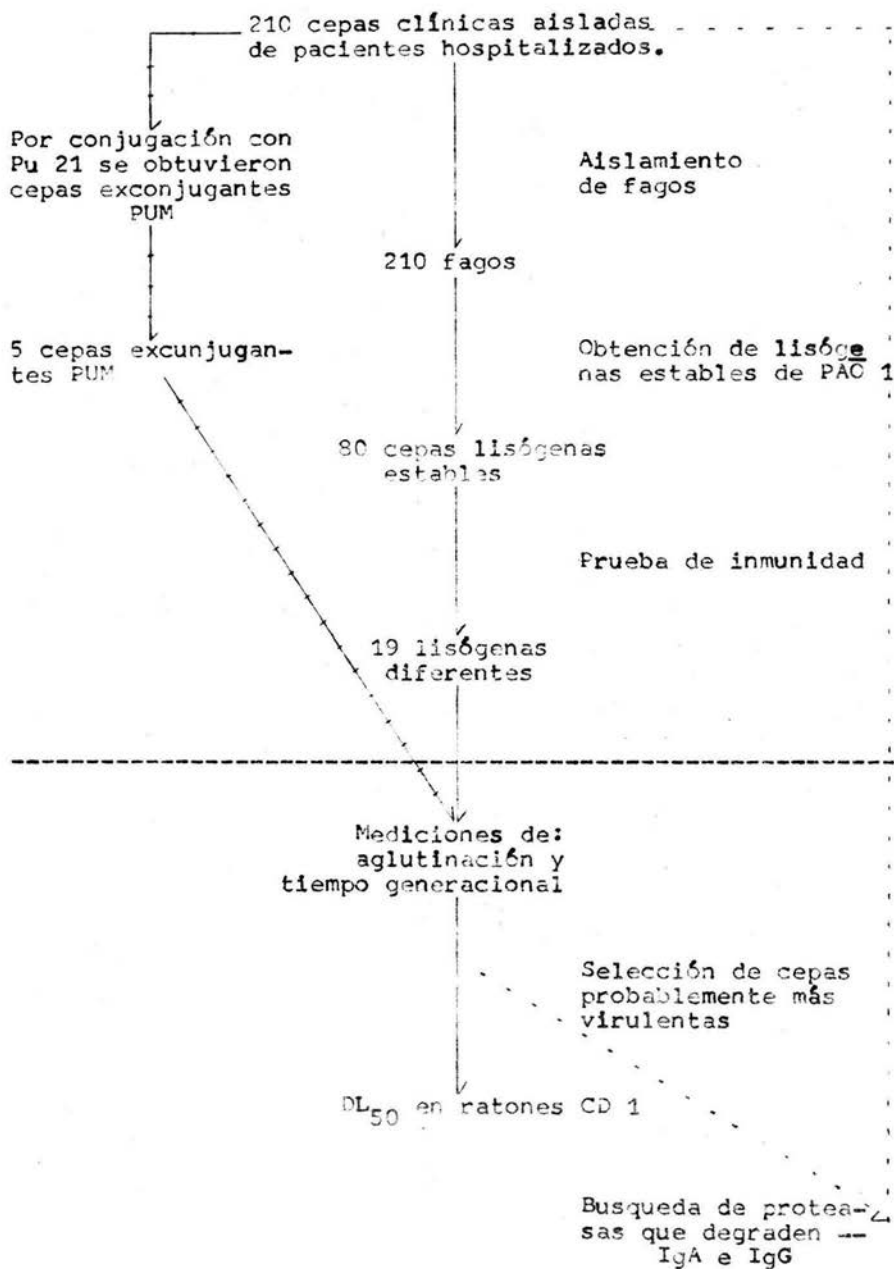
1) Estudiar la contribución de plásmidos y bacteriófagos a la virulencia de un grupo de cepas clínicas de Pseudomonas aeruginosa, aisladas de pacientes hospitalizados; - utilizando como cepa receptora de los plásmidos y bacteriófagos a una cepa de Pseudomonas aeruginosa (PAO 1, ATCC --- 15692) estudiada genética y bioquímicamente.

2) Detectar la producción de proteasas que degraden -- las inmunoglobulinas IgA e IgG, en cepas clínicas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes hospitalizados.

MATERIAL Y METODOS

I) Origen de las cepas.

Para alcanzar estos objetivos se utilizaron 19 cepas - lisógenas (cepas PIZ; *Pseudomonas* de Iztacala) construidas en nuestro laboratorio con bacteriófagos obtenidos de 210 - cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas de pa--- cientes internados en los hospitales Civil y del ISSSTE de Morelia, Mich. (donadas por el M. en C. Carlos Cervantes V. de la Universidad Michoacana), junto con 5 cepas bacteria-- nas (cepas PUM; *Pseudomonas* de la Universidad de Morelia)-- conteniendo plásmidos conjugativos de éstas (ver siguiente esquema). Utilizando como cepa aceptora de los bacteriófa-- gos a la cepa PAO 1, ATCC 15692 estudiada genética y bioquí micamente, y como cepa aceptora de los plásmidos a la Pu 21 (derivada de la cepa PAO 1; Carlos Cervantes). Las cuales - están incluidas en nuestra colección de laboratorio.



II) Soluciones y medios de cultivo.

- 1.- C.N. (caldo nutritivo 3g/l); A.N. (C.N. más 15g/l de agar).
- 2.- C.ST. (caldo de soya tripticasa 30g/l); A.S.T. --- (C.S.T. más 15g/l de agar).
- 3.- T.G.E.A. (peptona de caseína 5g/l; ext. de carne - 3g/l; dextrosa 1g/l; agar 15g/l; glucosa 20% 50 ml/l).
- 4.- S.S. (solución salina NaCl 0.85%).
- 5.- B.B.S. (buffer boratos 0.1 M pH 8.4 más S.S.).
- 6.- P.B.S. (buffer fosfatos 0.15 M pH 7.5 440 ml más - 500 ml de S.S.).
- 7.- Formaldehído 10%.
- 8.- Agarosa 1.5%.
- 9.- Solución acuosa (glicerol 0.1% más agarosa 0.5%).
- 10.- Solución azul de Coomasie (azul de Coomasie 0.25%; 45 ml de metanol; 10 ml de ácido acético; 45 ml de agua destilada).

III) Método de aglutinación.

1) Obtención de antisueros de conejo, específicos contra PAO 1 y Pu 21 respectivamente.

a) Preparación del antígeno.

De un cultivo saturado de bacteria (crecida en C.N. a 37°C, 18-24 hrs. con agitación) se tomó 0.1 ml para sembrar en T.G.E.A., incubándose a 37°C, 18-24 hrs., el cultivo se suspendió en 10 ml de S.S., poniéndolo a ebullición en baño María durante dos hrs. con el fin de matar a las bacterias. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 7500 r.p.m. durante 10 min., el sedimento se resuspendió en S.S. hasta obtener una concentración de 10^8 bacterias/ml ($A_{590}=0.3$).

b) Inmunización.

Se inmunizó a conejos con el antígeno, de acuerdo al siguiente esquema:

Inyección	Tiempo	Dosis	Vía admón.	Observaciones
# 1	día 0	0.5 ml	iv	todas las inocu
# 2	día 7	1.0 ml	iv	laciones fueron
# 3	día 14	2.0 ml	iv	en la vena mar-
# 4	día 21	3.0 ml	iv	ginal de la ore
sangrado	día 30			ja.

Después de obtener la sangre, se permitió la formación del coágulo, se retrajo éste y se centrifugó durante 5 min. a 3 000 r.p.m. y se extrajo el suero, se inactivo el complemento calentandolo 1 hr. a 50°C en baño María y se guardó a -20°C hasta su uso.

2) Prueba de aglutinación.

En una serie de 15 tubos se colocaron 0.5 ml de diluciones dobles seriadas del antisuero (hechas con P.B.S. y comenzando con una dilución de 1:10), a los que se adicionaron 0.5 ml de antígeno (10^{10} bacterias/ml). Se agitó e incubó a 37°C durante 18-24 hrs. Se incubaron 3 controles que contenían:

tubo 16.....0.5 ml de P.B.S.

tubo 17.....0.5 ml de antígeno.

tubo 18.....0.5 ml sobrante de las diluciones.

transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron los -
tubos a 2 500 r.p.m. durante 5 min. Se agitó suavemente pa-
ra observar la aglutinación. El título de aglutinación se -
reportó como el inverso de la máxima dilución en la que se
observó aglutinación.

IV) Método de aglutinación cruzada.

El procedimiento de este método es muy semejante al an-
terior, con la única diferencia que en éste se inmunizaron
ratones sanos CD 1 intraperitonealmente, con antígeno (ce--
pas PAO 1 y PIZ 15, a una concentración de 10^8 bacterias/--
ml) dos veces en un período de 7 días y el día 14 se extra-
jo la sangre por punción cardíaca. Después de obtener el --
suero e inactivado el complemento, como en el método ante--
rior se describe, se realizó la prueba de aglutinación cru-
zada entre las dos cepas mencionadas.

V) Medición de tiempos generacionales.

Después de crecer la bacteria en C.N. durante 18-24 -- hrs. a 37°C con agitación, se inocularon 0.25 ml en 25 ml - de C.N. incubando a 37°C. De este cultivo, cada 30 minutos, se tomaron alícuotas de 2.5 ml, a las que se agregaron 0.2 ml de formaldehído 10% con el fin de detener el crecimien- to bacteriano y posteriormente tomar lectura de su absorven- cia a 590 nm. Se graficó abs. 590 vs tiempo, se ajustó por medio del método matemático de mínimos cuadrados y de la -- pendiente se obtuvieron los tiempos generacionales.

VI) Medición de la dosis letal 50 para ratones CD 1.

a) Preparación del inóculo.

Se creció la bacteria en C.N. a 37°C durante 18-24 --- hrs., se espatuló 0.1 ml de este cultivo en medio T.G.S.A. incubandose 18-24 hrs. a 37°C, el crecimiento obtenido se - cosechó en 10 ml de S.S. y se centrifugó a 7500 r.p.m. 10 - min., el sedimento se resuspendió en 5 ml de S.S. y el con- centrado se diluyó hasta obtener 10^{10} bacterias/ml, mante--- niendo la suspensión a 0°C. Se confirmó la concentración de bacterias en la suspensión por cuenta viable.

b) Preparación e inoculación de los ratones.

Se utilizaron ratones machos CD 1 con un peso de 25 a 35 g.

b.1) Ratones sanos.

La suspensión bacteriana (10^{10} bacterias por ml) se diluyó en S.S. (10^{-1} a 10^{-4}) de estas diluciones se inyectó un volumen de 0.1 ml intraperitonealmente a ratones sanos - CD 1.

b.2) Ratones quemados.

El procedimiento usado en el modelo del ratón quemado ha sido descrito previamente por Stieritz y Holder (1975) - (17); después de anestésiar al ratón, se le provocó una quemadura con 0.5 ml de etanol y 15 seg. de flama, sobre una superficie previamente rasurada, que abarcó 4 cm^2 en la parte dorsal; inmediatamente después, en el sitio quemado, se inyectó subcutáneamente la dilución correspondiente, estas diluciones fueron de 10^{-4} a 10^{-6} , partiendo de 10^{10} bacterias/ml e inyectando un volumen de 0.1 ml.

El diseño de estos experimentos fué tomando 6 grupos - de ratones con 5 individuos cada uno y a cada grupo se le - administró una dilución, utilizando al 6^o grupo como testi- go al que se inyectó 0.1 ml de S.S. estéril. La duración de cada ensayo fué de 8 días durante los cuales se anotó el nú- mero de muertos por dosis. La DL₅₀ se calculó por el método de Reed y Muench (28).

VII) Proteólisis bacteriana de Ig A e Ig G.

a) Preparación de geles de agarosa.

En un portaobjetos (p.o.) limpio, se colocó una gota - de solución acuosa extendiéndose perfectamente, una vez se- co se agregó la agarosa, aproximadamente 2.81 ml por p.o. - para cubrir la superficie, quedando un grosor de 1.5 mm; se dejó gelificar por lo menos 24 hrs. a 4^o antes de usar. -- Los p.o. fueron almacenados en cajas húmedas por no más de 8 días para evitar contaminación.

b) Inmunolectroforesis (I.E.F.) en geles de agarosa.

Se preparó la cámara electroforética, y se colocaron - los p.o. con agarosa, anteriormente perforados a lo ancho -

de la placa a una distancia de 8 mm y un diámetro de 3 mm. Los geles se conectaron al B.B.S. por medio de almohadillas de algodón rectangulares, a una distancia de 0.5 a 1 cm sobre el gel, enseguida se colocaron las muestras en cada pozo 10 ml (ver ensayo de proteólisis bacteriana), del lado izquierdo la muestra testigo y del lado derecho la experimental, utilizando 1 mA/p.o. durante 50-60 min.

c) Inmunodifusión para geles I.E.F.

Una vez terminada la corrida de electroforésis, se produjo un surco en el centro del gel longitudinalmente de 2 mm de ancho y a 3 mm de distancia de los pozos, y se colocaron 100 ml del antisuero específico respectivo, se guardó el gel en una caja de Petri con papel húmedo y se incubó a 37°C de 16-24 hrs.

d) Extracción de proteínas no precipitados por inmunodifusión en geles de agarosa.

Posterior a la incubación se comprimieron los geles sobre un trozo de papel absorbente poniéndoles encima un objeto de aproximadamente 1 Kg. durante 15 min., se lavaron los geles en NaCl 0.1 M durante 24 hrs con agitación suave con-

tinua, se comprimieron nuevamente y se lavaron con agua destilada durante 24 hrs en agitación, comprimiéndolos y secándolos en el horno a 50-60°C.

e) Tinción de geles de agarosa.

Secos los geles se tiñieron durante 15 min., en la solución azul de Coomasie ya filtrada, posteriormente se lavaron con 500 ml de agua destilada y se eliminó el exceso de colorante con ácido acético al 7% durante 10-15 min., secándolos en el horno a 50-60°C.

f) Ensayo de proteólisis bacteriana.

Utilizando Ig A o Ig G a una concentración de 2 a 5 -- mg/ml en el amortiguador de corrida usado para la I.E.F., se colocaron 50 ul de la solución de inmunoglobulina en un tubo eppendorf y se agregó una colonia bacteriana aislada, crecida durante 28-24 hrs en A.S.T. a 37°C un día antes. Utilizando como muestra control 50 ul de inmunoglobulina, a la que se agregaron en vez de la colonia 10 ul de amortiguador usado en la I.E.F. Se incubaron las muestras 24 hrs a - 37°C y se centrifugó durante 5 min a 15 000 r.p.m., tomándose 10 ul del sobrenadante para colocarlos en los pozos del

p.o. con agarosa para iniciar la corrida electroforética.

RESULTADOS

Debido a que el número de bacterias a estudiar es elevado y a la dificultad de aplicar a todas ellas la prueba de virulencia escogida en este trabajo (DL_{50}), se aplicó la prueba de aglutinación y medición de tiempos generacionales, como anteriormente se señaló, con el fin de revelar posibles candidatas a presentar un cambio en su virulencia. En la prueba de aglutinación hecha a las 19 cepas lisógenas solo 4 de ellas mostraron diferencias en el título, con respecto a la copa testigo, como se puede observar en la tabla 1, en donde los títulos se expresan como el recíproco de la dilución mayor en la que todavía se observó aglutinación. Al aplicarles esta misma prueba a las 5 cepas exconjugantes construidas en Morelia Mich., sólo 2 de ellas presentaron títulos de aglutinación diferentes a la cepa testigo Pu 21, como se muestra en la tabla 2. La medición de tiempos generacionales fué realizada también a las cepas construidas, en esta prueba se encontró que 10 cepas lisógenas presentan una diferencia, en cuanto al tiempo generacional que presentó la cepa BAO 1, en porcentaje de por lo menos 10% (ver tabla 3). En la tabla 4 se observan solo los valores de tiempo generacional de las 2 cepas exconjugantes que también mostraron una diferencia de por lo menos 10% con referencia a la cepa Pu 21.

Después de haber realizado estas pruebas preliminares, decidimos seleccionar a las cepas con las que podríamos continuar nuestra investigación. Una de las pruebas que realizamos fué la prueba de aglutinación cruzada con antisueños obtenidos en ratones CD 1. Los resultados de esta prueba se muestran en la tabla 5, en donde se ve que los dos antisueños utilizados presentan un título de aglutinación más alto para la cepa lisógena.

Al medir la virulencia de las primeras cepas seleccionadas, por medio de la prueba de DL_{50} inoculando intraperitonealmente ratones sanos CD 1, no se detectaron diferencias entre los valores promedio de DL_{50} (ver fig. 1). Mientras que al utilizar el modelo del ratón quemado, con otras cepas lisógenas (PIZ 2 y PIZ 15), se manifestaron diferencias entre los valores promedio de DL_{50} , entre estas cepas y la cepa testigo (ver fig. 2).

Para abordar el segundo objetivo, se realizó la prueba de degradación de inmunoglobulinas, antes descrita. De las 8 cepas clínicas de P. aeruginosa probadas, el 50% no degradó ninguna de las inmunoglobulinas (Ig A, s-Ig A e Ig G), el 37% degradó s-Ig A (secretoria), el 25% de ellas degradó Ig A (sangre) y la Ig G no fué degradada por ninguna. Al --

probar las cepas construidas PIZ 2 y PIZ 15 se observó la -
degradación de s-Ig A al igual que en PAO 1, esta última --
también degradó Ig A, en las dos cepas lisógenas no se pro-
bó (ver tabla 6 y foto 1).

Tabla 1

Detección de cambios superficiales inducidos por bacteriófagos, por medio de la prueba de aglutinación.

Lisógenas	Título
PAO 1	1:20 480
PIZ 5	1:7 000
PIZ 6	1:5 120
PIZ 7	1:81 920
PIZ 15	1:81 920

De las 19 cepas lisógenas construídas, solo las que se muestran en esta tabla presentaron cambios en cuanto al título de aglutinación, con respecto al -- testigo (PAO 1).

Los títulos de aglutinación se expresan como el recíproco de la dilución mayor en la que todavía se observó aglutinación, utilizando anti-PAO 1 (obtenido en conejo).

Tabla 2

Detección de cambios superficiales inducidos por plásmidos, por medio de la prueba de aglutinación.

Exconjugantes	Título
Pu 21	1:10 240
PUM 100	1:2 560
PUM 110	1:01 920

De las 5 cepas exconjugantes construídas, solo - las que se muestran en esta tabla presentaron cambios en cuanto al título de aglutinación, con respecto al testigo (Pu 21).

Los títulos de aglutinación se expresan como el recíproco de la dilución mayor en la que todavía se - observó aglutinación, utilizando anti-Pu 21 (obtenido en conejo).

Tabla 3

Medición de tiempos generacionales.

Lisógenas	T. generacionales %
PAO 1	100
PIZ 4	150.78
PIZ 7	100
PIZ 8	145
PIZ 9	111.25
PIZ 12	77.34
PIZ 13	125.62
PIZ 15	125.46
PIZ 16	112.18
PIZ 17	59.06
PIZ 19	71.87

Las cepas fueron crecidas en C.N. y los tiempos generacionales se calcularon a partir de la pendiente de la gráfica A_{590} vs. t. como se describe en material y método.

Tabla 4

Medición de tiempos generacionales.

Exconjugantes	T. generacionales %
Pu 21	100
PUM 100	111.10
PUM 110	113.15

Las cepas fueron crecidas en C.N. y los tiempos generacionales se calcularon a partir de la pendiente de la gráfica A_{590} vs. t. como se describe en material y método.

Tabla 5

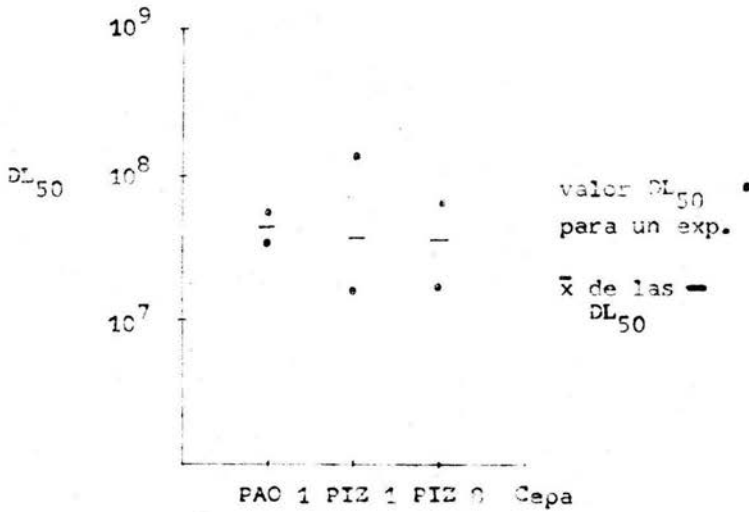
Títulos de aglutinación cruzada, con antisueros obtenidos en ratones sanos CD 1.

cepa	antisueros vs.	
	PAO 1	PIZ 15
PAO 1	1:32	1:128
PIZ 15	1:512	1:2048

Los títulos de aglutinación se expresan como el recíproco de la dilución mayor en la que todavía se observó aglutinación.

Figura 1

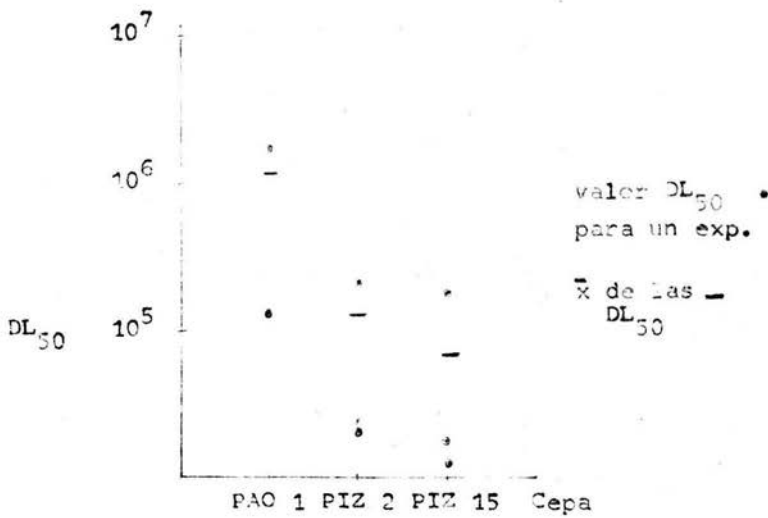
Valores de la DL_{50} para ratones sanos CD 1 inoculados intraperitonealmente.



Los valores de la DL_{50} fueron calculados por el método de Reed y Muench (28).

Figura 2

Valores de la DL_{50} en ratones CD 1, utilizando el -
módulo del ratón quemado.



Los valores de las DL_{50} fueron calculados por -
el método de Reed y Muench (28).

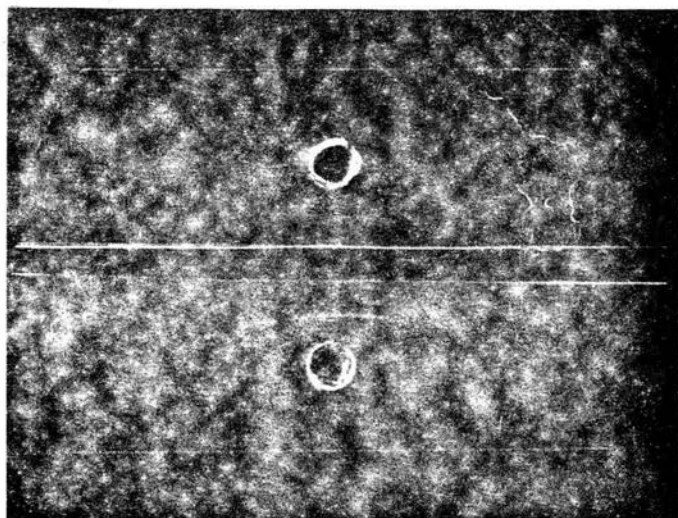
Tabla 6

Prueba de degradación de inmunoglobulinas.

Cepa Clínica	Ig A sangre	Ig G sangre	sIg A
PHC 1640, 582	-	-	+
4 cepas	-	-	-
PHC 1051	+	-	+
* PIS 8502	+	-	-
testigo PAC 1	+	-	+
lisógenas FIZ 2, 15 probadas	no	-	+

Degradación de Ig A sérica, sIg A (secretoria) e Ig G de humano normal por proteasa (s) de cepas de P. aeruginosa. Donde + significa degradación.

*Degradó a las 48 hrs. a diferencia de las demás (24 hrs.).



Muestra
control
(solo -

sig. 0)

Intensificación de ^{125}I a través de una sus-
pensión de ^{125}I durante 24 hrs., utilizando anticuerpo de -
coneja contra ^{125}I A. 1. 1. 1.

DISCUSION

Se ha demostrado que en Pseudomonas aeruginosa la conversión lisógena a nivel del antígeno "O" es efectuada -- por varios bacteriófagos (Castillo, 1974 (2); Dimitracopoulos, 1979 (8); Liu, 1969 (24)). Holloway y Cooper (18) describieron la conversión de la cepa PAO 1 de P. aeruginosa -- por el bacteriófago D3; demostrando mediante un análisis in -- munológico el cambio de un solo determinante antigénico --- (puesto de manifiesto, entre otras cosas, por un aumento en la aglutinación con antisuero obtenido contra la cepa no li -- sógena) responsable de que la lisógena sea fagocitada menos que la no lisógena por macrófagos de ratón "in vitro".

En este trabajo reportamos que el 21% (4/19) de las ce -- pas lisógenas que estudiamos presentó un título de aglutina -- ción diferente (mayor o menor) que el de la cepa PAO 1 con antisuero dirigido contra ésta última (Tabla 1). Esto nos -- sugiere que estas 4 cepas han sufrido un cambio en el anti -- geno "O" ya que el antisuero se obtuvo inoculando conejos -- con la cepa PAO 1 muerta por calentamiento, procedimiento -- que elimina el flagelo y las fimbrias (Woods, 1980 (47)). -- En el caso de la cepa PIZ 15, el cambio superficial debe -- ser sutil ya que no se altera su fagotipo al utilizar los -- 19 fagos del CPHC (Pitt, 1980 (36)), es decir, no pierde ni

gana receptores para estos fagos (C. Cervantes, comunicación personal), resultado consistente con el obtenido por Holloway y Cooper para la cepa PAO 1 lisógena para el fago D3 (19), la cual no mostró cambios en su sensibilidad a 14 fagos no relacionados entre sí. Para confirmar el cambio superficial en la cepa PIZ 15 obtuvimos antisueros en ratones contra ella y contra la cepa PAC 1. La tabla 5 muestra que, efectivamente, la cepa PIZ 15 posee un cambio superficial que podría consistir en una mayor exposición o un mayor número de determinantes antigénicos preexistentes. Así mismo detectamos, por aglutinación, cambios superficiales en dos cepas exconjugantes (de 5 probadas; Tabla 2) por lo que creemos que en las cepas clínicas este fenómeno debe ser muy común ya que cerca del 100% de las cepas aisladas de pacientes poseen plásmidos y bacteriófagos (20).

Con el propósito de determinar si los bacteriófagos aumentan la virulencia de P. aeruginosa decidimos medir la DL_{50} de dos lisógenas y de la cepa control PAC 1. Para ello, inoculamos intraperitonealmente a ratones sanos con las cepas PIZ 1, PIZ 3 y PAC 1 sin detectar ninguna diferencia en los valores de DL_{50} de estas cepas (Fig. 1).

En este punto, decidimos emplear el modelo del ratón quemado puesto que éste se aproxima a la situación normal de infección de pacientes que han sufrido quemaduras, los cuales son colonizados principalmente por P. aeruginosa --- (38, 39). Como puede verse en la fig. 2, el modelo del ratón quemado es más apropiado para estimar la virulencia de P. aeruginosa, ya que la cepa PAC 1 mostró una DL_{50} un logaritmo inferior a la mostrada en ratones sanos (ver Fig. 1). En este modelo, la cepa PIZ 15 y PIZ 2 mostraron una virulencia mayor que la de la cepa PAC 1 (Fig. 2), aunque los intervalos de variación de los valores de DL_{50} son amplios, quizá debido a que el peso de los ratones utilizados varió de 25 a 35 g. (dependiendo del lote de animales que nos donaban en la facultad de medicina de la UNAM). A pesar de éstas fluctuaciones en las DL_{50} de las dos lisógenas, creemos que ambas son más virulentas que la cepa PAC 1, si bien por distintas razones: la cepa PIZ 15 muestra un incremento en la adhesión a células epiteliales humanas así como una disminución en la fagocitosis por macrófagos de ratón "in vitro" (45); la cepa PIZ 2 produce el doble de proteasas totales que la cepa PAC 1 (44) y tanto adhesión, resistencia a macrófagos y aumento en la producción de proteasas son factores de virulencia bacteriana (17, 18, 47).

Para determinar si la virulencia aumentada de las dos lisógenas se debía a una mayor velocidad de crecimiento, medimos el tiempo de generación en C. N.; la cepa PIZ 15 mostró un tiempo de generación mayor que la cepa PAC 1 (Tabla 3), en tanto que el de la PIZ 2 no varió. Así pues el aumento de la virulencia de PIZ 2 y PIZ 15 probablemente no se deba a una mayor velocidad de crecimiento; si bien no podemos descartar que "in vivo" crezcan más rápidamente que PAC 1, la PIZ 2 debido a su mayor producción de proteasas que le permitirían una mejor obtención de nutrientes y la PIZ 15 debido a su resistencia a los macrófagos, lo que haría que fuera eliminada menos eficientemente por el ratón.

Por otro lado, de las 5 exconjugantes probadas, detectamos cambios superficiales en dos (Tabla 2) y tiempo de generación diferentes (Tabla 4). Debido a la carencia de ratones en número suficiente, no pudimos medir la DL_{50} de las cepas PUM.

La producción de proteasas contra inmunoglobulinas ha sido considerada un factor de virulencia en los microorganismos que se encuentra, ya que disminuye la respuesta local y facilita la colonización. Tal es el caso de algunas bacterias que presentan la actividad de la proteasa contra

la Ig A que correlaciona con la virulencia específica de cepa (29).

En nuestro estudio la habilidad para degradar sIg A -- fué más evidente en cepas aisladas de vagina y faringe, lo que podría significar una ventaja biológica al colonizar superficies mucosas. Sin embargo, esta característica no se mostró en cepas aisladas de urocultivo y esputo, pudiendo ser menos virulentas, aunque esto es discutible por ser cepas aisladas de pacientes infectados, además de que P. aeruginosa presenta una serie de factores que intervienen en su virulencia y ésta no depende de un solo factor.

En el caso de las lisógenas probadas (PIZ 2 y PIZ 15) al igual que la cepa PAO 1 degradaron sIg A, lo que sugiere que el gen que codifica para esta enzima proteolítica se localiza en el cromosoma bacteriano.

Dado que la cepa PIZ 2 produce el doble de proteasas totales que la cepa PAO 1 (44), y puesto que degradó sIg A, creemos que sería interesante determinar si hay una diferencia cuantitativa entre ambas cepas en la degradación de sIg A.

De acuerdo con las conclusiones a las que se llegó en este trabajo, sería interesante revizar algunos aspectos -- que podrían surgir como nuevas líneas de trabajo. Algunas -- de ellas serían: medir la DL_{50} de las cepas PIZ 2 y PIZ 15, utilizando el modelo del ratón quemado, con ratones machos CD 1 con un peso de 25 g.; estudiar que tan abundantes son los fagos FIZ 2 y FIZ 15 (fagos de Iztacala; aislados de ce pas clínicas de P. aeruginosa) en una población de cepas -- clínicas; purificar el lipopolisacarido de la cepa PIZ 15, para medir su virulencia (DL_{50}) y estudiar su composición -- por medio de análisis químicos; probar la quimiotaxis de la cepa PIZ 15; ver si existe correlación entre aumento de a-- glutinación, aumento de virulencia y adhesión para las o--- tras cepas que mostraron cambios; probar la cepa PIZ 2 en -- el modelo de úlcera corneal (21), debido a que es un modelo muy sensible a proteasas.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Bodey, G.F., R. Bolivar, V. Fainstein and L. Jadeja --- (1983). Infections caused by Pseudomonas aeruginosa. Rev. - Infect. Dis. 5(2):279-313.
- 2.- Castillo, F.J. and P.F. Bartell (1974). Studies on the bacteriophage 2 receptor of Pseudomonas aeruginosa. J. Virol. 14:904-909.
- 3.- Cervantes, V.C. (1986). Comunicación personal.
- 4.- Cervantes, V.C. y L.L. Sosa (1981). Análisis de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos en cepas de -- Pseudomonas aeruginosa de origen clínico. Resúmenes del XII Congreso Nacional de Microbiología. Mérida, Yuc. p. 40.
- 5.- Chakrabarty, A.M. (1976). Plasmids in Pseudomonas. Ann. Rev. Genet. 10:7.
- 6.- Costerton, J.W. (1979). Pseudomonas aeruginosa in nature and disease. En Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Ed. por L.D. Sabath, Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart Vienna. 31-55.
- 7.- Daguet, G.L. (1977). Técnicas de bacteriología, 1 aerobios. Ed. Jims. Barcelona, España. 1:333-336.
- 8.- Dimitracopoulos, G. and P.F. Bartell (1979). Phage related surface modifications of Pseudomonas aeruginosa: effect on the biological activity of viable cells. Infect. Immun. 23(1):87-93.

- 9.- Ecklund (1971). Bacteriophage and the toxigenicity of - Clostridium botulinum type C. *Science*. 172:480-482.
- 10.- Elwell, L.F. and P.L. Shipley (1980). Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. - *Ann. Rev. Microbiol.* 34:465-496.
- 11.- Favero, M.S. (1971). Pseudomonas aeruginosa growth in distilled water from hospitals. *Science*. 173:826-833.
- 12.- Freeman, V.J. (1951). Studies on the virulence of bacteriophage infected strains of Corynebacterium diphtheriae. *J. Bacteriol.* 61:675-688.
- 13.- Frei, E.R., H. Levin, G.P. Bodey, E.E. Morse and E.J. Preireich (1965). The nature and control of infection in patients with acute leukemia. *Cancer Res.* 25:1511-1515.
- 14.- Gilardi, G.L. (1979). Medical Microbiology. In Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes, and --- their treatment. Ed. por L.D. Sabath, Hans Huber Publishers. Bern Stuttgart Vienna. 25-31.
- 15.- Harold, C. Nau (1982). The role of Pseudomonas aeruginosa in infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* - 11 suppl. B. 1-13.
- 16.- Holby, N. (1977). Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis. *Acta Pathologica Scandinavica* 262, suppl. C. 3-9.

- 17.- Holder, Ian A. and G.C. Haidaris (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.
- 18.- Holloway, B.W. and G.N. Cooper (1962). Lisogenic conversion in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 84:1321-1324.
- 19.- Holloway, B.W. (1974). Genetic organization of Pseudomonas. En Genetics and biochemistry of Pseudomonas. Ed. por P.H. Clarke and M.H. Richmond. John Wiley and Sons. 133-162.
- 20.- Holloway, B.W. and V. Krishnapillai (1975). Bacteriophages and bacteriocins. En Genetics and biochemistry of Pseudomonas. Ed. por P.H. Clarke and M.H. Richmond. John Wiley and Sons. 99-132.
- 21.- Homa, J. Yuzuru (1978). Progress in the study on P. aeruginosa with emphasis on its pathogenicity. Asian Med. - J. 21:8.
- 22.- Jawetz, E. and J.L. Melnick, and E.A. Adelberg (1981). Manual de microbiología médica. 9a Ed. Manual Moderno S.A. México. 225-226.
- 23.- Kuzio, J. and A.N. Kropinski (1968). O-antigen conversion in Pseudomonas aeruginosa PAC 1 by bacteriophage D3. J. Bacteriol. 155(1):203-212.

- 24.- Liu, P.V. (1969). Changes in somatic antigens of Pseudomonas aeruginosa induced by bacteriophages. J. Infect. -- Dis. 119:237-246.
- 25.- Liu, P.V. (1979). Toxins of Pseudomonas aeruginosa. En Pseudomonas aeruginosa. Ed. R.G. Dooggett, Academic Press. - 63-88.
- 26.- Lowbury, E.J.L. (1974). Ecological importance of Pseudomonas aeruginosa: medical aspects. En genetics and biochemistry of Pseudomonas. Ed. por F.H. Clarke and M.H. Richmond. John Wiley and Sons. 37-66.
- 27.- Mackowiak, P.A. (1982). The normal microbial flora. -- New. Eng. J. Med. 307:83-97.
- 28.- Manual de practicas de inmunologia. I.P.N. México (1975). 47-50.
- 29.- McNabb, P.C. (1981). Host defense mechanisms at mucosal surfaces. Ann. Rev. Microbiol. 35:477-496.
- 30.- Metha, S.K., A.G. Plant, N.J. Calvanico and T.B. Tomasi Jr. (1973). Human immunoglobulin A: production of an Fc fragment by an enteric microbial proteolytic enzyme. J. Immunol. 111:1274-1276.
- 31.- Molecular biology, pathogenicity and ecology of bacterial plasmids. Ed. por Stuart B.L., Royston C.C. and Ellen L.K. (1981). 91-143.

- 32.- Montie, T.C., H.D. Doyle, R.C. Craven, I.A. Holder --- (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of Pseudomonas aeruginosa in the burned mouse model. *Infect. Immun.* 38:1296-1298.
- 33.- Müller, H.E. (1971). Immunoelctrophoretische untersuchen zur einwirkuns bakterieller enzyme auf menschliche - plasma protein. *Zbl. Bakteriol. Hyg. I. Abt. Orig. A.* 217: 254-274.
- 34.- Wida, S. and J.J. Ferreti (1982). Phage influence on the synthesis of extracelular toxins in group A Streptococci. *Infect. Immun.* 36(2):745-750.
- 35.- Palleroni, N.J. (1975). General proprieties and taxonomy of the genus Pseudomonas. In *Genetics and biochemistry of Pseudomonas*. Ed. por P.H. Clarke and M.H. Richmond. John Wiley and Sons. 1-37.
- 36.- Pitt, T.L. (1980). State of the art: typing Pseudomonas aeruginosa. *J. Hosp. Infect.* 1:193.
- 37.- Pollack, M., N.S. Taylor and Callahan (1977). Exotoxin production by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Infect. Immun.* 15:776-780.
- 38.- Pruitt, B.A. (1974). Infections caused by Pseudomonas species in patients with burns and in other surgical patients. *J. Infect. Dis.* 130:s8-13.

- 39.- Rabin, E.R., C.D. Graver, E.H. Vogel, R.A. Finkelstein and W.A. Tubush (1961). Fatal Pseudomonas infection in burned patients. A clinical bacteriological and anatomic study. N. Engl. J. Med. 265:1225-1235.
- 40.- Reynolds, H.Y., A.S. Levine, R.E. Wood, G.H. Zierdt, - D.C. Dale and J.S. Pennington (1975). Pseudomonas aeruginosa infections: persisting problems and current research to find new therapies. Ann. Inter. Med. 82:819-831.
- 41.- Rhame, F.S. (1979). The ecology and epidemiology of -- Pseudomonas aeruginosa. En Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes and their treatment. Ed. por D.L. Sabath, Hans Huber Publishers. Bern Stuttgart Vienna. 31-55.
- 42.- Rodríguez, Leiva M. (1975). Relación huésped-parásito, mecanismos de patogenicidad de los microorganismos. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. - Series de Biología Monografía. 14:33-37.
- 43.- Stanier, R.Y., N.J. Palleroni and M. Doudoroff (1975). General properties and taxonomy of genus Pseudomonas. En Genetics and biochemistry of Pseudomonas. Ed. por P.H. Clarke and M.H. Richmond. John Wiley and Sons. 1-37.
- 44.- Vaca, P.S., J. Escobar, G. Martínez, M. Urzúa, A.E. -- Campos, B. Hashimoto y C. Cervantes (1985). Aumento de la - virulencia de Pseudomonas aeruginosa debido a bacteriófagos. XVI Congreso Nacional de Microbiología. Durango, Dgo. 56.

- 45.- Vaca, F.S., G. Oliver, J. Escobar, G. Martínez y D. -- Arenas (1986). Modificación de propiedades de virulencia de Pseudomonas aeruginosa inducida por el fago FIZ 15. XVII -- Congreso Nacional de Microbiología. Puebla, Pue. p. 1.
- 46.- Wikström, M.B., G. Dahlén, B. Kaiser and H. Nygren --- (1984). Degradation of human immunoglobulins by proteasas - from Streptococcus pneumoniae obtained from various human - sources. Infect. Immun. 33-37.
- 47.- Woods, D.E., D. Strans (1980). Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian bucal epithelial - cells. Infect. Immun. 29:1146-1151.
- 48.- Zabriskie, J.B. (1964). The role of temperate bacteriophage in the production of erythrogenic toxin by group A -- Streptococci. J. Exp. Med. 119:761-780.