

729



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO DE PACIENTES
COMPROMETIDOS SOBRE Pseudomonas aeruginosa.

T E S I S

Que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo
p r e s e n t a

PATRICIA ARZATE BARBOSA



México, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUÍMICA

1988

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

I N D I C E

Introducción	1
1.- Generalidades	
1.1 Caracterización de <u>P. aeruginosa</u>	2
1.1.1. Taxonomía y morfología	2
1.1.2. Características generales	3
1.1.3. Composición química y metabolismo	7
1.1.4. Aislamiento e identificación	8
1.2 Propiedades patógenas de <u>P. aeruginosa</u>	11
1.2.1. Toxicogenicidad	11
1.2.2. Resistencia al suero	15
1.2.3. Plásmidos	17
1.3 Importancia clínica de <u>P. aeruginosa</u>	19
2.- Parte experimental	
2.1 Material	22
2.1.1. Biológico	22
2.1.2. Medios de cultivo	22
2.1.3. Adiciones	22
2.1.4. Reactivos	23
2.1.5. Material de vidrio	23
2.1.6. Equipo de laboratorio	23
2.1.7. Equipo Beckman para la determinación de C3	24
2.2 Metodología	25
2.2.1. Toma de la muestra	26
2.2.2. Aislamiento del microorganismo	26
2.2.3. Identificación bioquímica	26
2.2.4. Determinación de la actividad bactericida del suero	28

2.2.5. <i>Determinación de C3 por nefelometría de rayo laser</i>	30
3.- <i>Resultados</i>	33
4.- <i>Discusión</i>	53
5.- <i>Conclusiones</i>	57
6.- <i>Bibliografía</i>	58

Introducción.

Pseudomonas aeruginosa, es un microorganismo con un amplio potencial en zimático, productor de toxinas y exopolisacáridos de superficie, cuya participación en la patogenicidad de la bacteria ha sido ampliamente referida en la literatura (5, 9, 18).

Las infecciones causadas por P. aeruginosa se encuentran generalmente restringidas a pacientes comprometidos, como es el caso del quemado, cuyas lesiones lo predisponen a la colonización y al daño, así como a la invasión de tejidos viables, llevando frecuentemente al paciente a la muerte por septicemia. Por otro lado, el incremento en la incidencia de infecciones por P. aeruginosa, en otros pacientes comprometidos, como es el caso de aquéllos con fibrosis quística (70-90%), ha puesto de manifiesto la contribución de este microorganismo en la iniciación y perpetuación de la enfermedad a nivel pulmonar, aún cuando rara vez causa septicemia (2, 5, 10).

Varios autores se han referido a la actividad del suero humano y de otros animales, demostrada in vitro contra diferentes agentes patógenos, como índice de un importante mecanismo de defensa contra el agente invasor (15, 35).

Tomando en cuenta lo anteriormente dicho, se planteó determinar la actividad bactericida del suero de diferentes sujetos como son: pacientes con quemaduras de 2do y 3er grado, pacientes con fibrosis quística y personas aparentemente sanas, sobre cepas de P. aeruginosa aisladas de los dos primeros. Asimismo se planteó determinar la concentración de C3 en el suero de estos pacientes, ya que el complemento juega un papel importante en la actividad bactericida del suero.

1 - Generalidades.

1.1 - Caracterización de P. aeruginosa.

1.1.1 - Taxonomía y Morfología.

En la familia Pseudomonadaceae existen cuatro géneros:

- 1) Género Pseudomonas.
- 2) Género Xanthomonas.
- 3) Género Fraxurria.
- 4) Género Zooglea.

Estos 4 géneros son bacilos Gram negativos, móviles, estrictamente aerobios, el metabolismo es respiratorio nunca fermentativo, crecen por abajo de los 4°C hasta 43°C. Quimiorganótrofos capaces de usar un compuesto orgánico con un solo carbono como fuente de energía. Catalasa positivos, generalmente oxidasa positivos. La relación GC del DNA es de 58-71% (18, 19).

Características diferenciales de los cuatro géneros de la familia Pseudomonadaceae :

Características I. Pseudomonas II. Xanthomonas III. Fraxurria IV. Zooglea

Requerimiento para factores de crecimiento.	-	+	-	+
Crecimiento en PH 3.6	-	-	+	-
Producción de xanthomonadinas	-	+ ^A	-	-
Patogenicidad de plantas	D	+	-	-

^A Una especie es negativa.

La clasificación de las especies de Pseudomonas fué propuesta por Falle roni y col. (1973) en base a los estudios hechos sobre hibridación de RNA, /DNA, incluye investigaciones de vías metabólicas y sus mecanismos de regulación, de-- terminación de la secuencia de aminoácidos de proteínas seleccionadas, estudios inmunológicos y composición de la pared celular (19).

Dentro del género Pseudomonas, una de las especies más importantes es - Pseudomonas aeruginosa, que son bacilos Gram negativos, unicelulares, rectos y - ocasionalmente curvos, regularmente miden 0.5 - 1.0 μ m de ancho y 1.5 - 5.0 μ m de largo, móviles por un flagelo polar, no forman endosporas (19).

1.1.2 - Características Generales.

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 (19).

En estudios realizados por Fuerts y Hayward en 1969 en el género Pseu- domonas, observaron que los pili están localizados polarmente en ocho especies: P. aeruginosa, P. acidovorans, P. testosteroni, P. maltophilia, P. alcaligenes y en P. solanacearum; por otro lado P. cepacea y P. fragi presentan pili peritri-- cos (5).

Se han encontrado asociados a cepas de P. aeruginosa cuatro dife-- rentes tipos de pili. Uno de ellos es el pili RP4; éste actúa como receptor del fago específico P de RNA. Estos fagos (RP4 tienen una cola fácilmente separable con una vaina pequeña, la cola y la vaina son capaces de fijarse a la bacteria) son portadores de plásmidos, uno de ellos es el plásmido P que le confiere resis-- tencia a agentes antimicrobianos. Muchas cepas de P. aeruginosa tienen pili pola-- res y se les ha designado como PSA, éstos están constituidos por filamentos fle-- xibles, no se encuentran determinados por plásmidos, tienen la propiedad de ac-- tuar como receptores de varios bacteriófagos, como por ejemplo, el fago de RNA PP7. Los pili PSA también son capaces de absorber colas no contráctiles de bacte-- riófagos mediante un mecanismo de retracción del pili. Otro tipo de pili es el - R-130 cuyas dimensiones no se han determinado, no están insertados polarmente,

se les ha encontrado en P. aeruginosa portadores de plásmidos R-130 del grupo P-2. Un tipo más de pili es el W, es flexible, se encuentra en número pequeño en P. aeruginosa, transporta plásmidos W, las bacterias que contienen estos plásmidos son sensibles a los fagos RP4 (4,13).

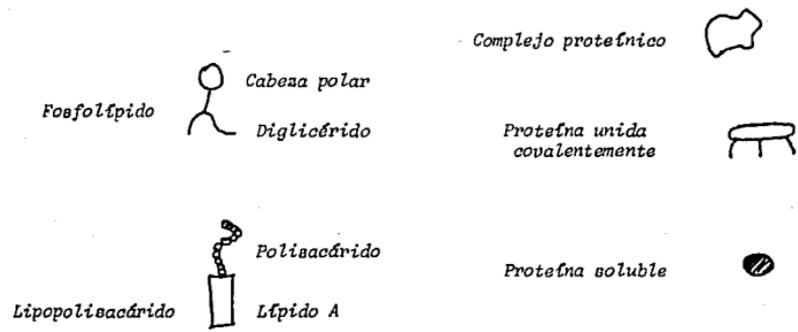
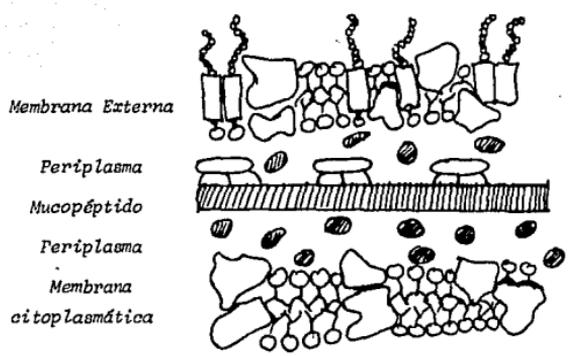
Flagelos.- P. aeruginosa tiene un flagelo polar compuesto por una proteína denominada flagelina de PM= 40,000. El flagelo se encuentra unido a la membrana plasmática por el cuerpo basal; los filamentos pasan a través de cuatro anillos delgados y paralelos que constituyen puntos de contacto con las diversas capas de la envoltura celular (5, 9).

Falsa cápsula o glicocólix.- En P. aeruginosa se encuentra formado por largas filas de poliacárido compuesto por ácido glucónico (6).

El glicocólix tiene como función permitir a las bacterias adherirse a células animales o vegetales e incluso a otras bacterias. Esta unión puede establecerse a través de la atracción ejercida por las proteínas del tipo de las lectinas, así como de cationes divalentes que existen en el medio ambiente que facilita la adherencia entre las bacterias y las células eucarióticas (6). Algunas cepas de P. aeruginosa son capaces de producir un grueso glicocólix entre la unión bacteria-bacteria para formar microcolonias y entre la unión bacteria-epitelio; estos agregados de bacterias resisten la fagocitosis por macrófagos y leucocitos polimorfonucleares (9), la acción de anticuerpos y del complemento activado, los antibióticos, bacterias depredadoras y bacteriófagos (6). El glicocólix posee las características de un factor de virulencia y actúa como un antígeno protector (9).

Pared celular.- La pared celular de P. aeruginosa está constituida por varias capas, observándose de afuera hacia adentro tenemos: la membrana externa, área periplásmica, mucopéptido (peptidoglicano y área periplásmica (5). (Esquema 1).

Mucopéptido.- Está compuesto por una pequeña cantidad de aminoácidos y dos azúcares. La N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico se encuentran unidos



Esquema 1.- Composición química de la pared y membranas de *P. aeruginosa* (5).

por enlaces β 1-4; los aminoácidos involucrados son L-alanina y el ácido D-glutámico. La dureza y rigidez del peptidoglicano se debe en parte a los enlaces β 1-4, esto da a la bacteria forma y resistencia mecánica, ya que su pérdida causa formación de protoplastos e inestabilidad osmótica (5, 9, 33).

Área periplásmica.- En esta región se ha localizado una gran variedad de enzimas como la fosfatasa alcalina; cuando esta enzima es liberada por el magnesio, provoca que las capas externas de la pared sean permeables a la lozoxima y se formen esferoplastos (5).

Muchas enzimas degradativas como la β -lactamasa, acetilasas, adenilasas y fosforilasas son producidas en la membrana citoplasmática y se acumulan en el área periplásmica, su actividad se manifiesta en las cepas resistentes de P. aeruginosa ya que generan la degradación o modificación de los antibióticos, con su consecuente inactivación.

El área periplásmica contiene un número variable de proteínas de unión asociadas con el transporte de aminoácidos y otros nutrientes dentro de la bacteria (4).

Membrana externa.- Constituida por fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido de mayor densidad que el resto de los componentes de dicha membrana. Homma y colaboradores han estudiado una proteína designada como "proteína endotóxica original" (PEO) con un $PI= 42,000$ y con actividad tóxica. Un complejo similar de proteína-lipopolisacárido (LPS), se libera de las capas de la membrana de P. aeruginosa, que contiene dos componentes proteínicos mayores, uno designado como proteína A y el otro proteína E. Estos componentes funcionan como enzimas en la síntesis del lipopolisacárido (LPS) (5).

Fosfolípidos.- El compuesto más importante del que están formados es el fosfatidil-etanolamina; con una mayor cantidad de ácido palmítico y ácido oleico a diferencia de otras bacterias Gram negativas (5).

Lipopolisacárido.- Es una molécula compuesta por tres segmentos unidos

covalentemente: el externo un oligosacárido, la región central y el lípido A. El segmento externo es el responsable de la especificidad antigénica O (aquí se encuentran determinantes específicos de especie). En la región central se encuentra una gran cantidad de fosfato, a su vez se encuentra dividida en dos regiones: la externa de heteropolisacárido y otra interna unida al lípido A. El lípido A es el responsable de las actividades endotóxicas del LPS. Todos los LPS de P. aeruginosa contienen azúcares como: glucosa, ramosa y heptosa junto con galactosamina y 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) (5).

Membrana citoplasmática.- Está compuesta de una bicapa de fosfolípidos y proteínas; de los fosfolípidos el fosfatidil-etanolamina es el que se encuentra en mayor cantidad; la membrana citoplasmática se encuentra involucrada en el transporte activo y es ahí también donde se lleva a cabo la fosforilación oxidativa. Juega un papel importante en la síntesis de pequeños polímeros de aminoácidos, así como la replicación del DNA, llevando a cabo un gran número de reacciones enzimáticas específicas (5, 29).

1.1.3 - Composición química y metabolismo.

P. aeruginosa es quimiorganótrofo, aerobio, su metabolismo es respiratorio, no fermentativo ni fotosintético, usan el oxígeno como último aceptor de electrones, en algunos casos el nitrato o la arginina pueden usarse como una alternativa de aceptor de electrones; es catalasa positiva, citocromo oxidasa positiva. La relación GC (Guanina : Citocina) es de 67%, la reacción de la arginina dihidrolasa es positiva (5, 21).

Se han encontrado 4 tipos diferentes de polisacáridos en P. aeruginosa, uno de los cuales tiene un núcleo de polisacárido unido a una cadena corta que es antigénica, como en las enterobacterias.

El núcleo de polisacárido contiene: glucosa, ramosa, galactosa, heptosa, 2-ceto-3-desoxioctonato (KDO) y alanina; las colonias pueden desarrollar un color café debido a la alta concentración del citocromo "C". P. aeruginosa tiene dos tipos de pigmentos, uno que es la pioverdina que da una fluorescencia de co-

lor verde bajo la lámpara de luz ultravioleta, debido a un cromóforo de una quinolina; el otro es una pirocianina que da un color azulado, debido a la presencia de una fenazina; el olor "dulzón" es debido al metabolismo de compuestos aromáticos como el benzoato, p-hidroxibenzoato, triftofano y salicilato (5).

Para la degradación de los substratos orgánicos usa la vía oxidativa, - esto involucra la participación de oxigenasas, que actúan en algunos compuestos alifáticos como los alcanos. Todas las Pseudomonas llevan a cabo el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, así como también la síntesis del citrato a partir de -- oxalacetato y acetyl CoA, bajo la acción de enzimas de catabolismo como amidasa, hidrasa y enzimas de compuestos aromáticos; a las moléculas de bajo peso las - pueden degradar enzimas hidrolíticas como las proteasas; también usa la vía de - degradación de hexosas en presencia de oxígeno, o sea la vía de Entner Doudoroff y en condiciones de desnitrificación usan la vía fosforilativa (21).

P. aeruginosa es fácilmente lisada por EDTA, esta sensibilidad está relacionada con el alto contenido de fósforo, no acumula poli β hidroxibutirato -- (PHB) como reserva material de carbono; a diferencia de otras Pseudomonas, es - incapaz de hidrolizar gránulos extracelulares de poli β hidroxibutirato (5, 19).

Se ha reportado la presencia de estructuras microtubulares conocidas - como rapidosomas, su significado biológico no está muy claro, sin embargo, hay evidencia de que están relacionadas con una vaina polimerizada de bacteriocinas, las cuales a su vez, son proteínas letales para otras bacterias, estas bacterio - cinas se conocen también como pirocinas y en P. aeruginosa como aeruginocinas -- (22).

La producción de una aeruginocina puede utilizarse para probar la sen - sibilidad de una determinada bacteria y la existencia de diferentes tipos de - aeruginocinas ha servido para la tipificación de P. aeruginosa con propósitos - epidemiológicos (5).

1.1.4 - Aislamiento e Identificación.

P. aeruginosa puede aislarse de diferentes lugares como lo son: el -

suelo, el agua, las aguas negras y el aire y se presenta en pequeñas proporciones en la flora intestinal normal; aunque su importancia radica en que puede aislarse como patógena en varios sitios como heridas infectadas dando lugar a una pus verde azulado, en casos de meningitis, en enfermedades de vías urinarias, del sistema respiratorio, de los ojos, de la sangre causando una septicemia y también puede aislarse de catéteres, de instrumental o de soluciones (5).

P. aeruginosa se multiplica rápidamente en medios de cultivo simples, es una especie que se aísla con facilidad debido a sus características coloniales, a su olor y pigmento. Las muestras de heridas se siembran normalmente en agar sangre y en medios líquidos. Los pigmentos piocianina y fluoresceína obscuran el medio de agar sangre (5).

Para un rápido aislamiento de P. aeruginosa se puede usar un medio selectivo conteniendo 0.03% de cetrimida y examinando los cultivos después de incubarlos 18 horas a 37°C, bajo una lámpara de luz ultravioleta se puede observar la fluorescencia amarilla, verde o azul verde. Para hacer un medio de cultivo más selectivo se le puede adicionar 0.2 mg de cetrimida y 15 mg de ácido nalidixico por ml de base en lugar de 0.03% de cetrimida. En el medio McConkey la fluorescencia se desarrolla muy poco o nada, en cambio, en agar sangre se desarrolla un alto grado de fluorescencia alrededor de las colonias (5).

Cuando hay una severa infección por P. aeruginosa en una herida de que mado se puede detectar rápidamente la fluorescencia con una lámpara de luz ultravioleta.

P. aeruginosa se desarrolla en un rango de pH de 7 a 8.5, como ya se mencionó, puede crecer por abajo de los 4°C y por arriba de los 43°C, puede identificarse con facilidad en los medios de cultivo ya que no fermenta la lactosa, sus colonias son redondas o irregulares generalmente lisas de color verde o fluorescente y de olor aromático "dulzón", de las colonias difunde un pigmento verde azul hacia el medio. Algunas cepas tienen actividad hemolítica y producen hemólisis en medios de agar sangre; típicamente es un bacilo no fermentador (1, 19).

El siguiente cuadro ilustra las principales pruebas bioquímicas para la identificación de P. aeruginosa (1, 19, 21).

Prueba bioquímica	Reacción
Oxidasa	+
Arginina dihidrolasa	+
Crecimiento en agar Mc Conkey	+
Crecimiento en agar S-S	+
Crecimiento a 42°C en BHI	+
Citrato de Simmons	+
Malonato	+
Indol	-
OF glucosa tubo abierto	+
OF glucosa tubo cerrado	-
OF maltosa tubo abierto	-
OF maltosa tubo cerrado	-
OF xilosa tubo abierto	+
OF xilosa tubo cerrado	-

1.2 - Propiedades patógenas de P. aeruginosa.

1.2.1 - Toxicidad.

Después de un gran número de estudios realizados sobre P. aeruginosa - diversos investigadores, se concluyó que su efecto patológico era causado por - productos extracelulares, como son: hemolisina, lecitinasa, toxina letal A, exo-enzima S, proteinasa, elastasa, gelatinasa, lipasa, DNasa, hialuronidasa, coagu- lasa, fibrinolisisina y muy poco por la endotoxina (? , 17).

Toxina letal A.- P. 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 disminu- das por otros procesos patológicos o por la aplicación de una terapia inmunode- presiva intensa. Los casos fatales de bacteremia y neumonía causados por P. aeru- ginosa, exceden el 70% y entre los factores involucrados en el daño se encuen- tra la toxina A, que es el producto extracelular más potente producido por el - 90% de las cepas aisladas de pacientes clínicos. Ninguna otra bacteria es capaz de producir esta toxina (38).

La toxina A se sintetiza en el citoplasma, en el lado interno de la -- membrana citoplasmática, tiene actividades de DNA glicohidrolasa y ADP-ribosil- transferasa; se ha demostrado que inhibe la síntesis proteica, en células de ma- míferos a nivel ribosomal, por el mismo mecanismo que emplea la toxina diftéri- ca, ambas catalizan la transferencia de la adenosin 5-difosfo-ribosa al factor 2 de elongación, de manera estequiométricamente idéntica. Estas enzimas tienen - diferencias estructurales y no cruzan inmunológicamente (39).

La toxina A juega un papel importante en la destrucción de tejidos y - en la muerte de ratones quemados e infectados con P. aeruginosa. Parece ser un buen inmunógeno, como se ha demostrado en estudios realizados empleando la inmu- nización activa con un toxoide de la exotoxina A formalinizada y con un adyu- vante, ya que se indujo inmunidad protectora en grado variable en ratones, lo - cual puede ser potencialmente útil en la profilaxis de las infecciones por este

bacilo; por otro lado, la inmunización pasiva también confiere un alto grado de protección. En infecciones humanas, los altos niveles de antitoxina en el suero se han correlacionado con una mayor oportunidad de sobrevivencia (8).

Exoenzima S.- Algunas cepas de P. aeruginosa producen una segunda protefna extracelular designada como exoenzima S, que ha mostrado tener actividad - de adenosil difosfato 5-ribosil-transferasa (ADPR-transferasa), la cual difiere de la toxina A, en que no tiene acción sobre el factor 2 de elongación, sino que más bien cataliza la transferencia de ADP-ribose del NAD a varias protefnas diferentes en extractos de células eucarióticas. Se ha observado que la exoenzima S puede ser factor de virulencia cuando no existen niveles detectables de la toxina A (3, 32).

Leucocidina.- La leucocidina de P. aeruginosa es una protefna que ejerce un efecto citopatogénico sobre los leucocitos y otras células, pero es inefectiva sobre eritrocitos o plaquetas. Su acción citotóxica sobre leucocitos de bovinos, se caracteriza por producir mayor permeabilidad de la membrana plasmática para sustancias de bajo peso molecular, lo cual provoca hinchazón de las células, sin que rompa la membrana celular. Esto sugiere que el sitio de patogenicidad es la membrana plasmática, ya que existe en ésta un receptor de naturaleza proteica para la leucocidina (5).

Lecitinasa.- El tipo más común de infecciones humanas producidas por P. aeruginosa involucra la piel y se caracteriza por un área de edema, coloreada, no dura. Esta lesión, con frecuencia ulcerada, se cubre de una costra para formar el clásico "Ethyma gangrenosum". Esta enzima tiene actividad sobre la lecitina, constituyente de la membrana citoplasmática de células eucariotes. Se han realizado experimentos en los cuales se administra lecitinasa purificada por vía intracutánea a conejos, provocando en una hora enrojecimiento, con agrandamiento de la lesión a las 48 horas y finalmente se forma un absceso en el centro de la lesión rodeado por un área de edema, enrojecimiento e induración (5, 12).

Enzimas proteolíticas.- Una de las características más conocidas de P. aeruginosa, es su actividad proteolítica, reconocida poco después de su descubri-

miento en el siglo XIX. La licuefacción de la gelatina, el aclaramiento del agar leche descremada, 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 proteínasa de P. aeruginosa que atrajo la atención de muchos investigadores, fué su modo de hidrolizar la colágena en la que se liberan ciertos péptidos (12).

Las infecciones fatales por P. aeruginosa ocurren cuando están involucradas grandes áreas de 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 microorganismos circulantes en la sangre (2).

Las enzimas proteolíticas de P. aeruginosa elevan su concentración en medios que no contienen glucosa y su actividad aumenta en presencia de ácido láctico el cual tiende a acumularse en los tejidos infectados o dañados representando factores importantes en la patogenicidad.

Existen tres tipos de proteasas identificadas en P. aeruginosa, éstas son: fracción I, fracción II y fracción III, que son activas a diferentes pH: - 6.5 para la fracción I o neutra, 8.0 para la fracción II o semialcalina y 10.0 para la fracción III o alcalina (5).

La proteasa semialcalina (fracción II) difiere de las otras porque posee, además, actividad elastolítica, pudiendo destruir las fibras elásticas de los vasos sanguíneos causando así hemorragias severas en diferentes partes del cuerpo como la pleura, diafragma, tracto gastrointestinal; en la piel da lesiones ulcerativas y hemorragia en tejido subcutáneo (5); igualmente inactiva al complemento destruyendo las fracciones C1, C3, C5, C8 y C9; esta acción da como resultado una disminución en la quimiotaxis y por lo tanto en la fagocitosis e impide la liberación de enzimas lisosómicas (31)

Toxinas hemolíticas.- Bullock y Hunter, desde 1900, descubrieron la pro

ducción de una substancia hemolítica por P. aeruginosa, su observación la confirmaron Landstainer y Raubilschek años después. Estos investigadores señalaron - que la substancia hemolítica era soluble en solventes lipídicos y por lo tanto - diferente a otras hemolisinas bacterianas que son usualmente de naturaleza proteica. Jarvis y Johnson en 1949 la describieron como un glicolípido cristalino - que consiste de dos moles de L-ramosa y de ácido 1-betahidroxidecanoico, aún - cuando la actividad hemolítica de esta substancia no se apreció hasta que 20 - años después lo mencionó Sierra (12).

Liu, en 1957, señaló que P. aeruginosa produce dos tipos de hemolisinas, la primera es resistente al calor y funciona a 37°C, esta observación llevó al descubrimiento de que era una substancia soluble en alcohol, muy similar al glicolípido descrito por Jarvis, mientras que la segunda es una lisina lábil al calor, llamada fosfolipasa C (12, 40).

La hemolisina activa (resistente al calor) funciona como un detergente solubilizando los lípidos, después de la destrucción de la lecitina por la fosfolipasa C. Esta hemolisina no es por sí sola tóxica, ya que actúa junto con la fosfolipasa C.

Ambas toxinas hemolíticas producen lesiones características en la piel, para ejercer su efecto se fijan a las células del tejido, pero no se transporta al torrente sanguíneo para actuar como toxina letal.

La fosfolipasa C purificada y libre de la actividad de las proteasas, - tiene un efecto histopatológico diferente al producido por éstas últimas. Cuando se inyecta en la piel de conejos, 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 (12, 20).

Enterotoxinas.- Desde 1894 se sabe que P. aeruginosa es capaz de producir cuadros diarréicos, en ocasiones se ha descrito como fiebre de cinco días o de Shanghai (12).

Se reconoció la producción de una enterotoxina por estas especies empleando la técnica de asa ligada de intestino de conejo, la cual se convirtió en una técnica estándar para la demostración de esta toxina que es lábil al calor - y por lo tanto de naturaleza proteica, es posible que en infecciones intestinales la letalidad de P. aeruginosa se deba a las proteasas y a la toxina letal A y no a la pérdida de electrolitos y fluidos. Es difícil de evaluar hasta el momento, porque esta infección es rara (12).

1.2.2 - Resistencia al suero.

Bajo ciertas condiciones, muchas cepas de bacterias Gram negativas son rápidamente destruidas tanto por el suero humano, como por el de otros animales, se dice que estas cepas son susceptibles al suero; sin embargo, otras parecen ser completamente resistentes a la actividad bactericida del suero y siguen desarrollando aún en presencia de cantidades adecuadas de anticuerpos y en exceso de componentes del complemento (15, 30, 34).

Las cepas resistentes al suero pueden ser sensibilizadas por tratamiento con EDTA que baja la permeabilidad de la barrera representada por la membrana externa, con la liberación de aproximadamente de la mitad del complejo lipopolisacárido. De una manera similar, algunas enterobacterias resistentes al suero se convierten en susceptibles al complemento después de una exposición a Polimixina B, antibiótico que afecta la integridad de la membrana externa. Se ha observado que cepas mutantes resistentes a algunos antibióticos, como penicilina o cefalosporina, también son resistentes a la actividad bactericida del suero, asimismo, cepas susceptibles a estos antibióticos también son susceptibles al suero (34).

Se ha observado que bacilos Gram negativos aislados de infecciones localizadas son generalmente sensibles al suero, ya que aquellos que se aíslan de bacteremias son resistentes al suero (27, 28, 34).

La susceptibilidad de P. aeruginosa al suero (FHS) parece ser heterogénea: cepas aisladas de pacientes con bacteremia o endocarditis son resistentes al suero; cepas mucoides y no mucoides de P. aeruginosa aisladas de esputo de -

pacientes con fibrosis quística son mucho más sensibles a la actividad bacteriológica del suero que cepas aisladas de otros pacientes que no tenían fibrosis quística (11, 16, 23, 26, 28, 32). Aunque la mayoría de las cepas aisladas de pacientes con fibrosis quística son sensibles al suero, ocasionalmente se encuentran en los mismos medios de cultivo de las cepas sensibles, mutantes resistentes al suero (28, 37).

Wardlaw, quien trabajó con E. coli, observó que las cepas lisas permanecen resistentes al suero, mientras que las cepas rugosas son extremadamente sensibles al suero (35). Esto sugirió, de alguna manera, que la membrana externa rica en lipopolisacáridos protege a las bacterias de un ataque del complemento. Existen diferencias en los lipopolisacáridos, en cepas lisas o rugosas, esto puede deberse a que el lipopolisacárido tipo R (rugoso) tiene un peso molecular más bajo que el de tipo S (liso), porque al primero le falta parte de la cadena O y algunas veces hasta parte de la porción central del polisacárido, por ejemplo: - mutantes de cepas lisas a cepas rugosas generalmente se asocian con una baja capacidad para sintetizar la cadena O del lipopolisacárido acompañada con un incremento a la susceptibilidad del suero (35).

Neal L. Schiller, en 1984, llevó a cabo un corrimiento electroforético del lipopolisacárido (LPS) de P. aeruginosa en un gel de SDS-poliacrilamida y observó que cuando éste es sensible al suero es principalmente de tipo rugoso y da una banda más corta, comparado con el LPS de P. aeruginosa resistente al suero el cual dió varias bandas en el gel, que representan el número de variantes de sus cadenas largas, y son comparables a aquéllas vistas en otros microorganismos Gram negativos de cepas lisas. Esto puede sugerir que el LPS de cepas resistentes al suero inhibe la capacidad de los anticuerpos bactericidas, evitando la unión con el epítotope de la superficie de la membrana externa (27). Este razonamiento se apoya en el estudio de Feingold, quien reportó que cepas de E. coli y P. aeruginosa resistentes al suero, pueden convertirse en cepas sensibles, si se reduce la cantidad de antígeno O del LPS cultivando estas bacterias en presencia de difenilamina. Neal L. Schiller también observó cambios en el serotipo de P. aeruginosa, considerando el hecho de que el serotipo se basa en la parte del antígeno O de la cadena del LPS, la alteración en la configuración del sero

tipo en estos mutantes resistentes, sugiere una variación en la composición del LPS que puede relacionarse con la resistencia al suero (27).

Schiller y cols., aislaron membranas externas de P. aeruginosa y analizaron sus proteínas por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, observando que existía una proteína de membrana externa (OMP) con peso molecular de 32,000 que estaba presente en las cepas sensibles al suero y que se encontraba ausente o en muy bajas concentraciones en cepas resistentes (27).

Estos estudios sugieren que la susceptibilidad de P. aeruginosa a la actividad bactericida del suero (FHS) puede relacionarse a la estructura de la membrana del LPS, al contenido de OMP, o a ambos (27).

1.2.3 - Plásmidos.

Los plásmidos (material genético extracromosómico) son moléculas circulares de DNA que se multiplican independientemente en las células que los alojan y se heredan con regularidad al dividirse éstas.

Se descubrieron hace aproximadamente 30 años y se encuentran en casi todas las especies de bacterias y probablemente en la mayoría de sus células, éstos no son esenciales para la bacteria.

La pérdida del plásmido es permanente, la célula no puede regenerar un nuevo plásmido, sólo puede adquirirlo de otra bacteria mediante conjugación o transducción (éste último es un método más lento y se hace por medio de bacteriófagos).

Los plásmidos constituyen sólo el 1,2 o 3% del genoma celular; esta pequeña fracción determina rasgos genéticos hereditarios que generalmente no son codificados por el cromosoma de la bacteria. Sólo los plásmidos portan información para la conjugación (apareamiento) entre bacterias. Tienen toda la responsabilidad de varias enfermedades en vegetales y animales. Permiten que sus huéspedes se nutran de una variedad de sustancias complejas y los confieren resistencia a ciertas sustancias como por ejemplo: los antimicrobianos, iones de meta-

les pesados, etc. (25, 34, 35, 36).

Govan demostró que empleando carbenicilina o fluocloxacilina al 5%, se pueden aislar mutantes mucoides de P. aeruginosa a partir de cepas no mucoides - obtenidas de pacientes con fibrosis quística. Cuando tales cepas mucoides revierten nuevamente a su estado no mucoides, pierden simultáneamente su resistencia a carbenicilina, pero son más sensibles a la tetracilina. Los sitios para la producción del material mucoides en el cromosoma bacteriano se han establecido por conjugación en cruces, usando el plásmido FP2 y el plásmido R68.45 (12, 24).

El significado clínico de este descubrimiento reside en que el tipo de antibiótico usado en pacientes con fibrosis quística puede afectar la proporción de células mucoides en las enfermedades del tracto respiratorio debidas a P. aeruginosa (12).

Krishnapillai demostró que la presencia de ciertos plásmidos en P. aeruginosa puede alterar o prevenir la replicación de algunos bacteriófagos, otros pueden convertir cepas rugosas en lisas, aunque los cambios precisos involucrados en la pared celular no se conocen y otros más pueden inhibir la producción - de aeruginocinas que podrían alterar significativamente la tipificación de cepas (12).

1.3 - Importancia clínica de P. aeruginosa.

P. aeruginosa aparece en los hospitales como un microorganismo predominante que coloniza las heridas por quemadura. Puede llegar a causar hasta una septicemia o la enfermedad generalizarse sin la evidencia de la diseminación de la bacteria en la sangre del quemado, lo que indica que esto puede ser a través de absorción de toxinas (14).

En 1960, P. aeruginosa se reconoció como la más importante causa de muerte en pacientes con quemadura de 3er grado. En estos pacientes, la respuesta celular inflamatoria es pobre en los tejidos debilitados por quemaduras y favorece la infección invasiva. Cuando el daño es severo, se requiere de un injerto de piel; se han usado métodos de quimioterapia e inmunológicos para combatir la contaminación por P. aeruginosa en pacientes quemados y esto ha reducido significativamente las infecciones por este microorganismo (2, 14).

En el tracto urinario existen dos clases de infección: la primaria y la secundaria; la primera casi siempre es causada por E. coli derivada de la flora intestinal del paciente y es sensible a la mayoría de los antibióticos; la segunda casi siempre viene de una reinfección después de tratamiento y regularmente es causada por cepas multirresistentes transmitidas de otros pacientes, principalmente P. mirabilis, P. aeruginosa o Klebsiella sp.

Pseudomonas puede causar una infección localizada y dar una cistitis, puede ascender a través de los uréteres dando lugar a una pielonefritis, que es un tipo fatal de infección, en la cual primero hay infecciones endógenas por E. coli, seguidas por las de P. aeruginosa.

En tracto respiratorio, la infección causada por P. aeruginosa se ha asociado con lesiones preexistentes debidas a la instrumentación, después del uso de antibióticos o esteroides; tal es el caso de la fibrosis quística, P. aeruginosa causa una bronconeumonía severa e intratable, el microorganismo aparece en un estado tardío de la enfermedad, generalmente después de una infección por S. aureus y H. influenzae. Burns y Kay, en 1968, demostraron la presencia de an-

titulosos (precipitinas y aglutininas) contra P. aeruginosa en el suero de pacientes con fibrosis quística, igualmente este microorganismo se puede encontrar en las muestras de esputo. La colonización del tracto respiratorio es una evidencia de patogenicidad, la presencia de anti-sueros en suero se asocia a cepas mucoides de P. aeruginosa las cuales predominantemente son las más severas para estos pacientes (5, 10).

Las bronconeumonías causadas por P. aeruginosa se caracterizan por una infiltración masiva de la bacteria dentro de las paredes de las arteriolas y vénulas, con una respuesta inflamatoria mínima, hay una necrosis difusa alrededor de la pared del vaso que se rompe causando hemorragias en los alvéolos adyacentes y puede dar lugar a abscesos hemorrágicos. La vía de contaminación pueden ser los ventiladores mecánicos, catéteres, vaporizadores, etc.

Las infecciones oculares por P. aeruginosa pueden causar una conjuntivitis necrosante, una vez que el microorganismo se encuentra en la cámara ocular, puede causar una úlcera corneal y traer como consecuencia la pérdida del ojo. Es un patógeno peligroso en el ojo quemado, también da una infección fatal cuando se encuentra en los ojos de los niños prematuros; la vía de contaminación pueden ser las soluciones usadas, como las gotas para irrigar al ojo, soluciones de fluoresceína o solución salina, soluciones desinfectantes y conservadoras de los lentes de contacto, las operaciones expuestas de la cámara anterior del ojo, por ejemplo, cuando se remueve una catarata, puesto que presentan un alto riesgo de contaminación.

Las infecciones óticas por P. aeruginosa se encuentran normalmente en el oído externo, especialmente en climas tropicales, también se pueden encontrar en otitis medias, donde generalmente aparece como un invasor secundario después del tratamiento para cocos Gram positivos en una infección primaria. P. aeruginosa llega a causar meningitis cuando hay contaminación durante una punción lumbar o una microcirugía, o directamente por una extensión del oído infectado, o a través de una transferencia hematológica, casi siempre éstas son fatales.

Pueden llegar a causar septicemia y por esta vía una endocarditis, o puede invadir los huesos y causar osteomielitis y artritis; en el estómago y/o

pared intestinal puede causar úlceras similares a las de la piel ya que se ha aislado de lesiones de enterocolitis pseudomembranosa; causa fuertes diarreas en niños neonatos o en aquéllos que sufren alguna enfermedad, ya que su mecanismo inmunológico es inadecuado.

La septicemia por Pseudomonas aparece generalmente en niños que tienen hipogammaglobulinemia congénita. Las inmunodeficiencias por enfermedades como leucemia, quemaduras, diabetes o por tratamientos con corticosteroides, agentes inmunosupresores o radiaciones, son el tipo de condiciones que favorecen el desarrollo de la septicemia más severa en una infección invasiva por P. aeruginosa (5, 18).

2 - Parte Experimental.

2.1 - Material.

2.1.1 - Biológico.

Cepas Utilizadas: se utilizaron 12 cepas de P. aeruginosa aisladas de - pacientes hospitalizados con quemaduras de 2do y 3er grado del Hospital "Rubén Leñero" DDF y pacientes con fibrosis quística del Hospital Infantil de México.

2.1.2 - Medios de cultivo para P. aeruginosa.

a) Para el aislamiento: Agar Mc Conkey (Difco) y Agar SS (Difco).

b) Para su identificación: Agar de Kligler (Merck), medio de SIM (Difco), medio de citrato de Simmons (Merck), caldo rojo de metilo Voges Proskauer - (Merck), medio OF basal (Difco), medio de descarboxilasa de Weller (Merck), - caldo de malonato (Merck), medio de cetrimida (Difco).

c) Para su conservación: peptona al 1% (Merck) y Agar 1.5% (Merck).

d) Para determinar la actividad bactericida del suero: caldo infusión - cerebro-corazón (Difco).

e) Para su transporte: medio de Cary Blair (21).

2.1.3 - Adiciones.

a) Carbohidratos: Glucosa, Maltosa y Xilosa (Merck) a una concentra- ción del 10%.

b) L-aminocidos (Merck): Arginina, Lisina y Ornitina al 10% para el - medio base de descarboxilasa de Weller.

2.1.4 - Reactivos.

- Acido clorhídrico (Merck).
- Alcohol etílico.
- Alfa naftol 5% (J. T. Baker).
- Colorantes de Gram.
- Hidróxido de potasio 40%.
- Reactivo de Ehrlich (prueba de Indol).
- Reactivo de Kovacs (prueba de la oxidasa).
- Rojo de metilo.

2.1.5 - Material de vidrio.

- Cajas de petri de 100 x 20 (Pyrex).
- Matraces Erlenmeyer graduados de 250 y 500 ml (Pyrex).
- Pipetas serológicas 1 ml 1/10, 5 ml 1/10.
- Probetas graduadas de 50, 100 y 1000 ml.
- Tubos de cultivo de 13 x 100, 16 x 150 y 22 x 175 (Pyrex).
- Tubos de cultivo con tapón de rosca 22 x 175 (Pyrex).

2.1.6 - Equipo de laboratorio.

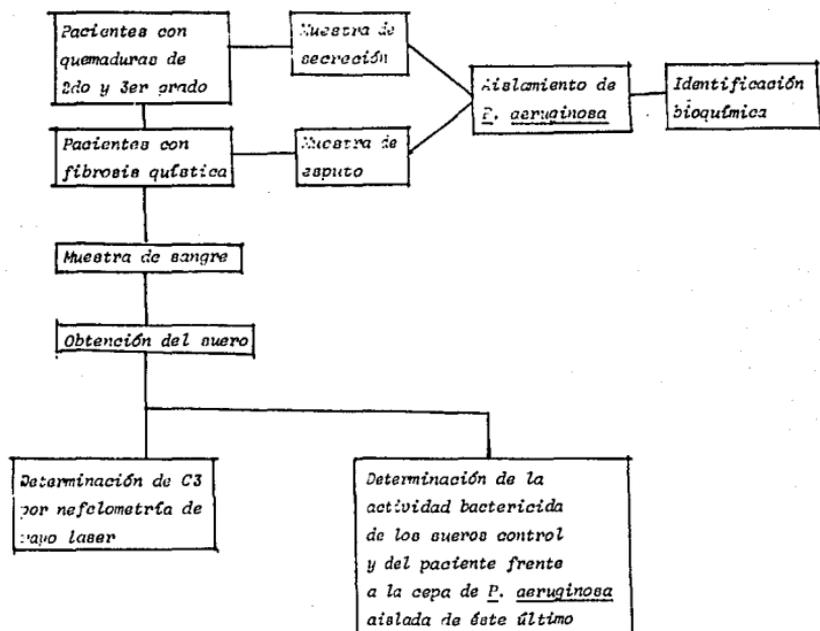
- Asa bacteriológica de nicromel.
- Balanza analítica modelo H35R (Mettler).
- Balanza granataria doble plato capacidad 2 kg modelo 1510D (Ohaus).
- Centrífuga 6,000 rpm refrigerada modelo CRU5000 (Daimon/IEC Div.o).
- Estufa a 36°C.
- Fotocolorímetro modelo 800-3 (Klett-Summerson).
- Gradilla de alambre.
- Lámpara de luz U.V. modelo UVL-56 (Black-Ray).
- Mechero Fisher.
- Microscopio óptico (Carl Zeiss).
- Hisopos estériles.
- Olla de presión de 20 lbs.

- Papel parafilm.
- Potenciómetro digital (Cole Parmer).
- Refrigerador a -70°C (Reuco).
- Nefelómetro de rayo laser (Beckman).

2.1.7 - Equipo Beckman para la determinación de C3.

- Frasco con 5 ml del suero calibrador C3 (ICS) a una concentración conocida.
- Tarjeta con el suero calibrador.
- Frasco con 5 ml del suero anti C3 (ICS).
- Tarjeta con el suero.
- Solución diluyente de fosfatos con azida de sodio 0.1% (ICS).
- Solución amortiguadora de fosfatos con un polímero con azida de sodio 0.1% (ICS).
- Pipeta de 42 microlitros (Beckman).
- Inyector de 600 μL (Beckman).
- Dilutor 1:6 (Beckman).
- Celdas de vidrio donde se lleva a cabo la reacción (ICS).
- Agitadores para las celdas (ICS).

2.2 - Metodología.



2.2.1 - Toma de la muestra.

De los pacientes quemados se toma con un hisopo estéril de su secreción, procurando no contaminarla con flora de la piel y se deposita en un tubo que contiene el medio de transporte de Cary Blair, se cierra bien para su traslado al laboratorio.

De los pacientes con fibrinólisis quística, se toma una muestra de esputo - en frasco estéril y se traslada al laboratorio.

2.2.2 - Aislamiento del microorganismo.

Las muestras de ambos tipos de pacientes se trabajan lo más rápido posible y se siembran en cajas con Agar No Conkey; se incuban 24 h a 36°C.

Las cajas de petri se sacan de la estufa para ver su desarrollo y se procede a escoger colonias lactosa negativas, pequeñas, alargadas un poco donde está la estría, pero bien aisladas; éstas se siembran en tubos con medio de Kligler y Sim y se incuban a 36°C por 24 h.

2.2.3 - Identificación bioquímica.

Los tubos se sacan de la estufa y se seleccionan aquellos que concuerdan con el siguiente esquema de pruebas bioquímicas:

H ₂ S	_____	(-)
Glucosa	_____	(-)
Lactosa	_____	(-)
Gas de glucosa	_____	(-)
Índol	_____	(-)
Movilidad	_____	(f)

Las cepas pueden presentar un aspecto mucoso o brillo metálico. A estos tubos se procede a hacerles una tinción de Gram para confirmar que son bacilos.

los o cocobacilos Gram negativos.

Se procede a incubarlos en una serie de pruebas bioquímicas como: citrato, molanato, MRVP, OF glucosa, OF maltosa, OF xilosa, crecimiento en Agar SS, - determinación de oxidasa, crecimiento a 42°C, L-arginina dihidrolasa, L-lisina - descarboxilasa y L-ornitina descarboxilasa. Todas las cepas se siembran en Agar cetrimida y se observa la fluorescencia de color verdoso bajo una lámpara de luz ultravioleta.

Se procede a escoger aquellos tubos que dan el siguiente esquema de pruebas:

Indofenol oxidasa	_____	(+)
Crecimiento en Agar SS	_____	(+)
Citrato de Simmons	_____	(+)
Rojos de metilo	_____	(-)
Voges Proskauer	_____	(-)
Malonato	_____	(+)
L-lisina descarboxilasa	_____	(-)
L-arginina dihidrolasa	_____	(+)
L-ornitina descarboxilasa	_____	(-)
Crecimiento en BHI a 42°C	_____	(+)
Pigmento de fluorescencia en Agar cetrimida	_____	(+)
OF glucosa tubo abierto	_____	(+)
OF glucosa tubo cerrado	_____	(-)
OF maltosa tubo abierto	_____	(-)
OF maltosa tubo cerrado	_____	(-)
OF xilosa tubo abierto	_____	(+)
OF xilosa tubo cerrado	_____	(-)

Las cepas una vez identificadas, se siembran en tubos de tapón de rosca con medio de conservación para su uso posterior.

2.2.4 - Determinación de la actividad bactericida del suero.

Una de las formas más sencillas para la determinación de la actividad bactericida del suero involucra la exposición de una suspensión de microorganismos viables a una concentración adecuada de anticuerpos y complemento, incubando a una temperatura óptima para la actividad del complemento. La muerte por lisis de la bacteria es seguida midiendo la densidad óptica del sistema de prueba (bacteria expuesta al suero) a intervalos regulares de tiempo.

El análisis colorimétrico se hace en la fase de crecimiento exponencial de la bacteria en caldo BHI y suero. Si la bacteria se lisa hay un aclaramiento del medio que la contiene y la densidad óptica disminuye, mientras que si ella sobrevive y crece, produce una mayor concentración de bacterias e intensifica el color amarillo del medio debido a sus pigmentos solubles y la densidad óptica aumenta, esto se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda de 650 nm.

Los resultados son expresados como % de lisis en un tiempo dado (34).

Después de que se identificó la cepa de P. aeruginosa, a los pacientes cuyo cultivo haya salido positivo para este microorganismo, se procede a tomarles una muestra de sangre que deberá permanecer a 4°C hasta su traslado al laboratorio; ahí se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga refrigerada a 4°C, luego se separa el suero y se guarda en alícuotas de 0.5 ml a -70°C hasta su uso.

Si la cepa de P. aeruginosa ha permanecido en un medio de conservación, se hace un pase mágico a un medio de Agar Mc Conkey y se incuba 24 h a 36°C.

Se toman de 2 a 3 colonias bien aisladas y se inoculan en un tubo que contiene 5 ml de caldo BHI, y se incuba 18 h a 36°C. Después de incubada la cepa, se ajusta a una concentración de 1×10^8 bacterias/ml, la cepa se diluye con caldo BHI. Para el suero control, se toma de un individuo aparentemente sano una muestra de sangre, se separa el suero y se guarda a -70°C junto con los sueros -

de los pacientes. Para usar los sueros se toma una alícuota del suero del paciente y del suero control y se descongelan a 36°C. Se marcan 4 tubos y se procede a seguir con el siguiente esquema:

Determinación de la actividad bactericida del suero.

	TUBO 1	TUBO 2	TUBO 3	TUBO 4
Caldo BHI	1 ml	0.5 ml	---	---
<u>P. aeruginosa</u> (1×10^8 bac/ml)	---	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Suero control (individuo sano)	---	---	0.5 ml	---
Suero problema (paciente)	---	---	---	0.5 ml

Inmediatamente se lee la densidad óptica de los tubos 2, 3 y 4 contra el blanco (tubo 1) en el tiempo 0 a una longitud de onda de 650 nm y de inmediato se procede a incubar los tubos a 36°C, se lee la densidad óptica cada hora durante dos horas. Los resultados se grafican: densidad óptica vs tiempo en papel milimétrico.

Este esquema se sigue para cada uno de los sueros problema.

Nota: se debe tener cuidado que al elegir el suero que se va a probar, corresponda al mismo individuo de quien se aisló la cepa de P. aeruginosa que se va a usar en el sistema de prueba. Por ejemplo: para determinar la actividad bactericida del suero en un sistema de prueba se pone a reaccionar la cepa de P. aeruginosa del paciente no. 1 con el suero del paciente no. 1; en otro sistema de prueba, la cepa del paciente no. 2 con el suero del paciente no. 2 y así sucesivamente con cada suero problema.

La determinación del % de lisis se obtiene de acuerdo con la siguiente fórmula (15):

$$\% \text{ de lisis} = \frac{DO_o - DO_f}{DO_o} \times 100$$

Donde:

DO_o = Densidad Óptica inicial

DO_f = Densidad Óptica final

2.2.5 - Determinación de C3 por nefelometría de rayo laser.

La actividad bactericida del suero depende en gran parte del sistema - del complemento, el cual puede ser activado por la vía clásica y/o la vía alterna. La activación del complemento en la reacción bactericida puede depender en un principio del complejo antígeno-anticuerpo. La función de la vía clásica requiere la formación del complejo involucrando inmunoglobulinas de la clase IgM - principalmente o IgG y esta reacción puede ser amplificada por la vía alterna.

Una de las evidencias más importantes de la actividad bactericida es - proporcionada por observaciones en pacientes con una parcial o total deficiencia congénita de uno de los componentes del complemento. C3 juega un papel importante en una variedad de reacciones inmunes benéficas para el huésped, los individuos deficientes en C3 presentan susceptibilidad generalizada a la infección - bacteriana. La determinación de C3 es importante, ya que es el componente que se encuentra en mayor concentración en el suero, es un componente intermediario de la vía clásica y el iniciador de la vía alterna (34).

Los sistemas de Inmunofluorescencia Beckman miden el aumento en la intensidad de luz desviada por las partículas suspendidas en solución como un resultado de - complejos más grandes formados durante la reacción antígeno-anticuerpo.

La señal de la luz desviada se transmite a una microcomputadora analizada donde se convierte a unidades de concentración, las cuales se muestran en una pantalla como caracteres alfanuméricos.

Para la realización de la técnica, se hacen diluciones tanto del estándar (calibrador) como de cada uno de los sueros problema con el diluyente de fosfatos (ICS).

Dilución:

- A - Sin diluir
- B - 1:6
- C - 1:36
- D - 1:216
- E - 1:1296

En las celdas de reacción se depositan 600 μ l de solución amortiguadora de fosfatos (ICS) conteniendo un agitador.

Primero el nefelómetro determina el valor de estándar, esto se hace introduciendo la tarjeta del estándar C3 en el nefelómetro, después de que éste sea leído, se introduce la tarjeta del suero anti C3. En la cámara de reacción se introduce una de las celdas conteniendo 600 μ l de amortiguador y se depositan 42 μ l de la dilución C (1:36) del estándar, ahí mismo se depositan 42 μ l del suero anti C3; el nefelómetro lee el valor de referencia que se programó en la tarjeta del estándar y lo almacena en la microcomputadora; se desechan las celdas usadas y de una manera similar se procede a determinar la concentración de C3 en cada uno de los sueros problema. En la cámara de reacción se pone una celda con 600 μ l de amortiguador y se depositan 42 μ l del suero problema dilución C (1:36), luego se depositan 42 μ l del suero anti C3, el nefelómetro busca el valor de la concentración del suero problema, lo verifica y lo convierte en unidades de concentración. La pantalla presenta la respuesta final en unidades de concentración (mg/dl).

Rango de valores de C3 en suero humano.

<i>C3 en suero humano</i>	<i>mg/dl</i>
<i>Rango normal</i>	<i>83 - 177</i>
<i>Rango de medición del estándar (calibrador ICS) dilución C</i>	<i>50 - 500</i>

3 - Resultados.

Tabla 1.- Resultados obtenidos:

Tipo de pacientes	No. de pacientes estudiados	% aislamiento <u>P. aeruginosa</u>	% actividad bactericida determinada
Quemados	40	50	45
Fibrosis quística	10	70	30

Se estudiaron 50 pacientes, 40 con quemaduras de 2do y 3er grado y 10 - con fibrosis quística. De los pacientes quemados se encontró que sólo el 50% estaba infectado por P. aeruginosa y sólo se pudo determinar actividad bactericida en el 45% de éstos. De los pacientes con fibrosis quística se encontró que el 70% estaba infectado por P. aeruginosa y sólo se pudo determinar actividad bactericida al 30% de éstos.

Actividad bactericida del suero:

Densidad óptica obtenida de cada sistema de prueba.

Pacientes quemados:

Paciente no. 1 (Gráfica no. 1)

Tubo	Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2) Control Cepa	0.0E	0.07	0.09
Tubo (3) Control Suero	0.10	0.12	0.08
Tubo (4) Suero Problema	0.10	0.11	0.11

Paciente no. 2 (Gráfica no. 2)

Tubo	Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2) Control Cepa	0,06	0,08	0.10
Tubo (3) Control Suero	0.10	0.05	0.03
Tubo (4) Suero Problema	0.10	0.14	0.15

Paciente no. 3 (Gráfica no. 3)

Tubo	Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2) Control Cepa	0.06	0.12	0.13
Tubo (3) Control Suero	0.10	0.07	0.02
Tubo (4) Suero Problema	0.10	0.07	0.06

Paciente no. 4 (Gráfica no. 4)

Tubo	Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2) Control Cepa	0.06	0.07	0.08
Tubo (3) Control Suero	0.10	0.09	0.075
Tubo (4) Suero Problema	0.10	0.07	0.06

Paciente no. 5 (Gráfica no. 5)

Tubo		Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2)	Control Cepa	0.06	0.07	0.08
Tubo (3)	Control Suero	0.10	0.07	0.05
Tubo (4)	Suero Problema	0.10	0.11	0.11

Paciente no. 6 (Gráfica no. 6)

Tubo		Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2)	Control Cepa	0.06	0.07	0.09
Tubo (3)	Control Suero	0.10	0.04	0.01
Tubo (4)	Suero Problema	0.10	0.11	0.10

Paciente no. 7 (Gráfica no. 7)

Tubo		Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2)	Control Cepa	0.06	0.08	0.10
Tubo (3)	Control Suero	0.10	0.04	0.01
Tubo (4)	Suero Problema	0.10	0.05	0.02

Paciente no. 8 (Gráfica no. 8)

Tubo		Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2)	Control Cepa	0.06	0.10	0.11
Tubo (3)	Control Suero	0.10	0.05	0.01
Tubo (4)	Suero Problema	0.10	0.02	0.01

Paciente no. 9 (Gráfica no. 9)

Tubo		Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2)	Control Cepa	0.06	0.08	0.10
Tubo (3)	Control Suero	0.10	0.05	0.02
Tubo (4)	Suero Problema	0.10	0.12	0.14

Pacientes con fibrosis quística:

Paciente no. 10 (Gráfica no. 10)

Tubo		Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2)	Control Cepa	0.06	0.07	0.08
Tubo (3)	Control Suero	0.10	0.04	0.01
Tubo (4)	Suero Problema	0.10	0.02	0.005

Paciente no. 11 (Gráfica no. 11)

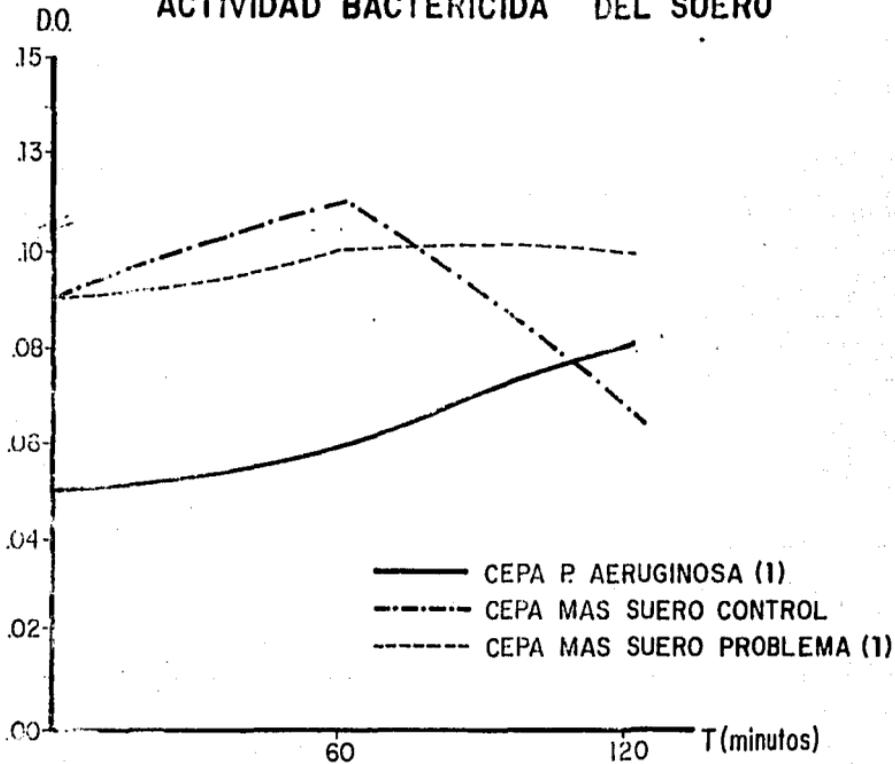
Tubo	Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2) Control Cepa	0.06	0.07	0.08
Tubo (3) Control Suero	0.10	0.04	0.02
Tubo (4) Suero Problema	0.10	0.135	0.15

Paciente no. 12 (Gráfica no. 12)

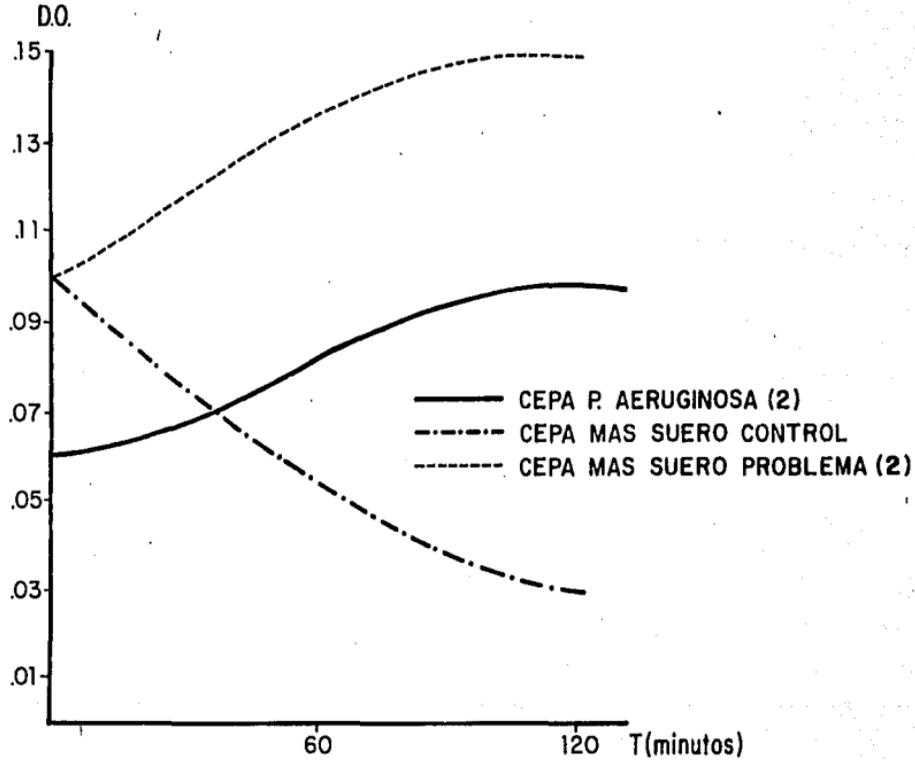
Tubo	Tiempo 0	T= 60 min	T= 120 min
Tubo (2) Control Cepa	0.06	0.07	0.09
Tubo (3) Control Suero	0.10	0.02	0.01
Tubo (4) Suero Problema	0.10	0.07	0.06

GRAFICA No. 1

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO

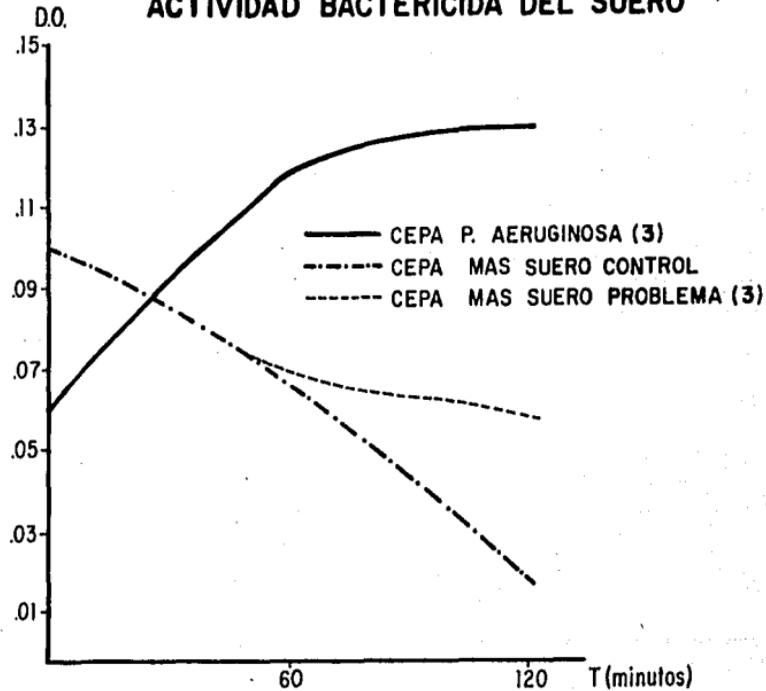


ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



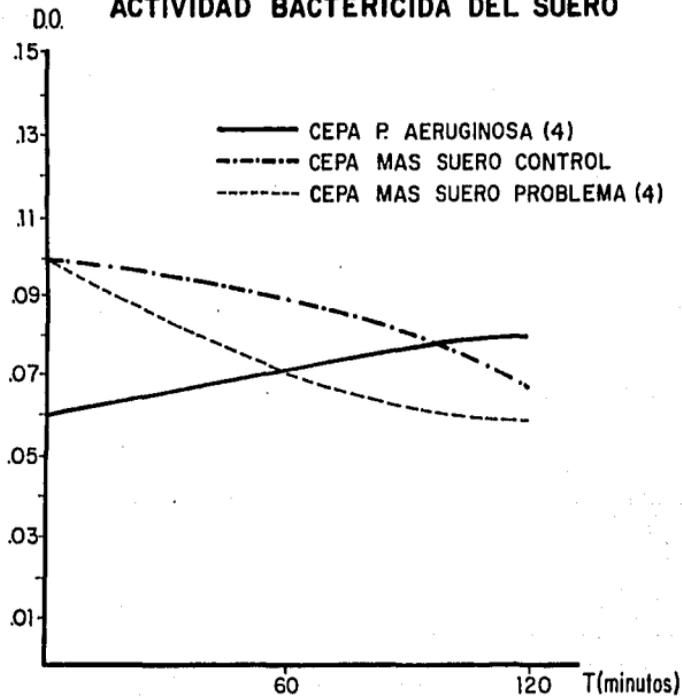
GRAFICA No. 3

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO

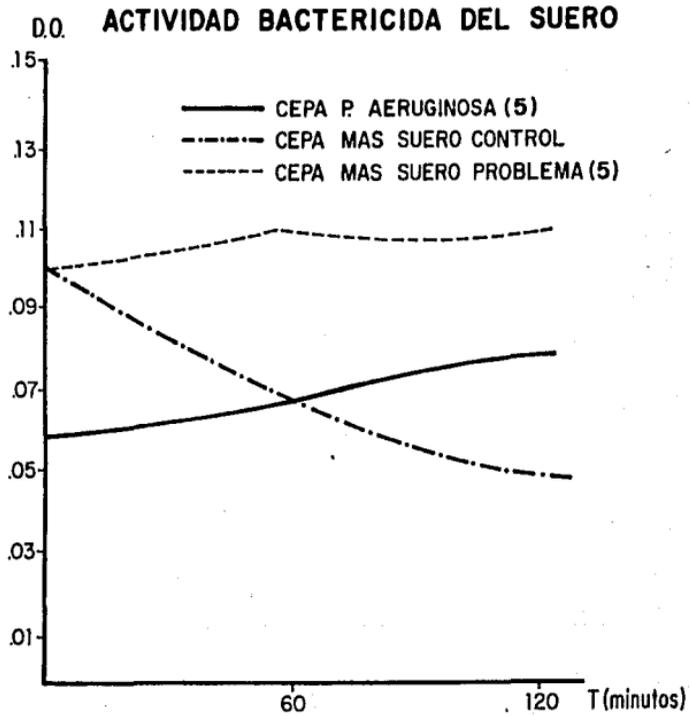


GRAFICA No.4

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO

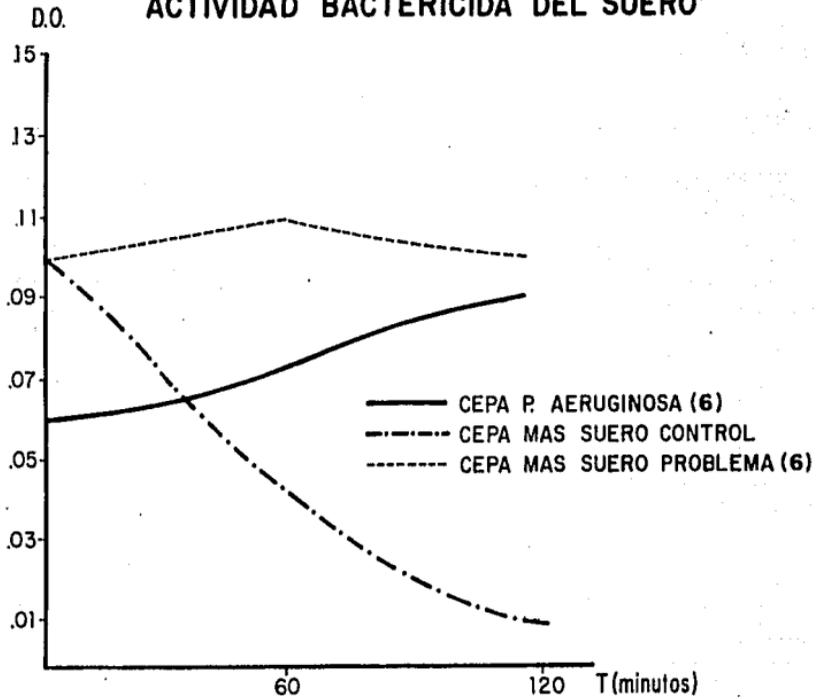


GRAFICA No. 5



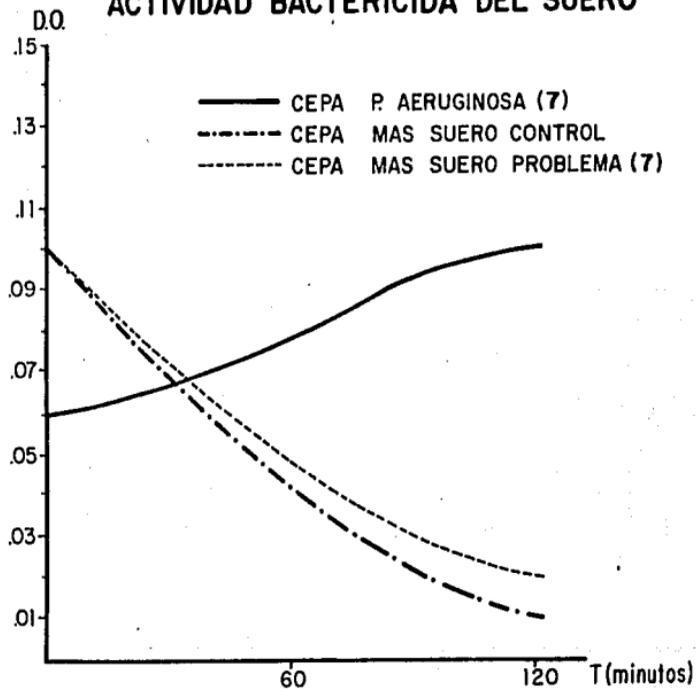
GRAFICA No. 6

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



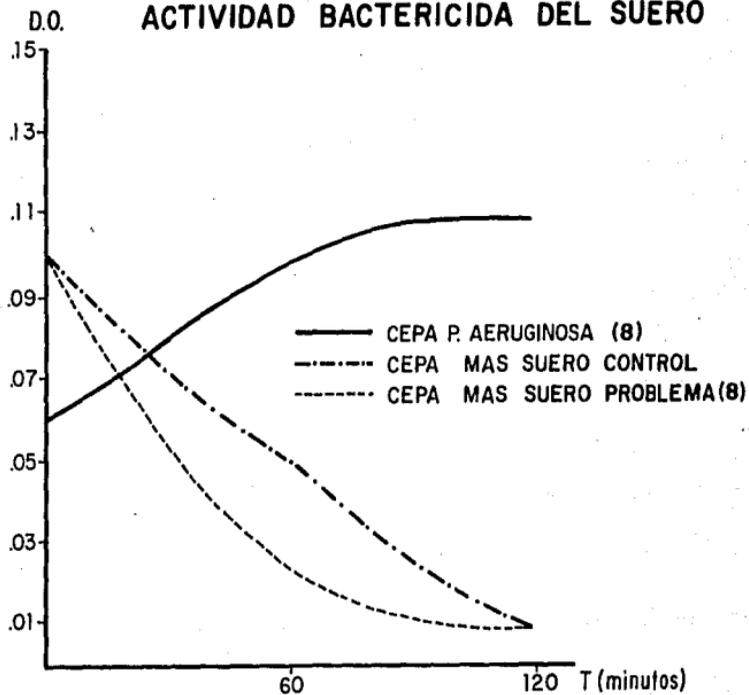
GRAFICA No. 7

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



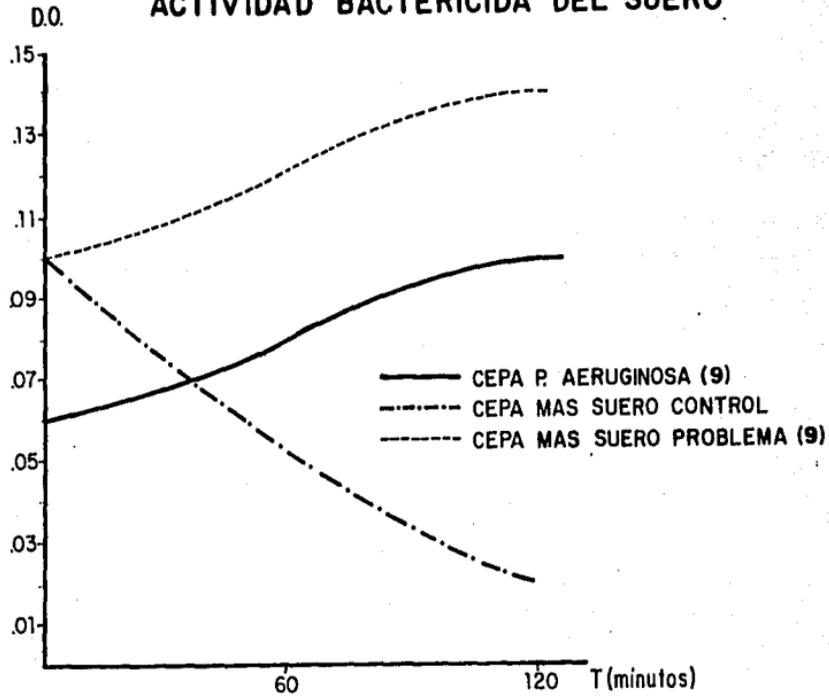
GRÁFICA No. 8

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



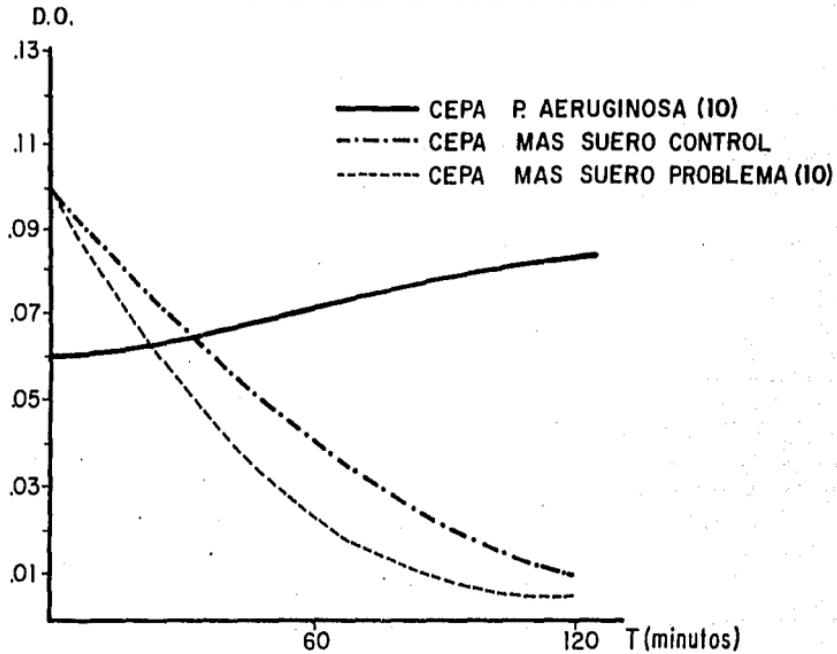
GRAFICA N.º 9

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



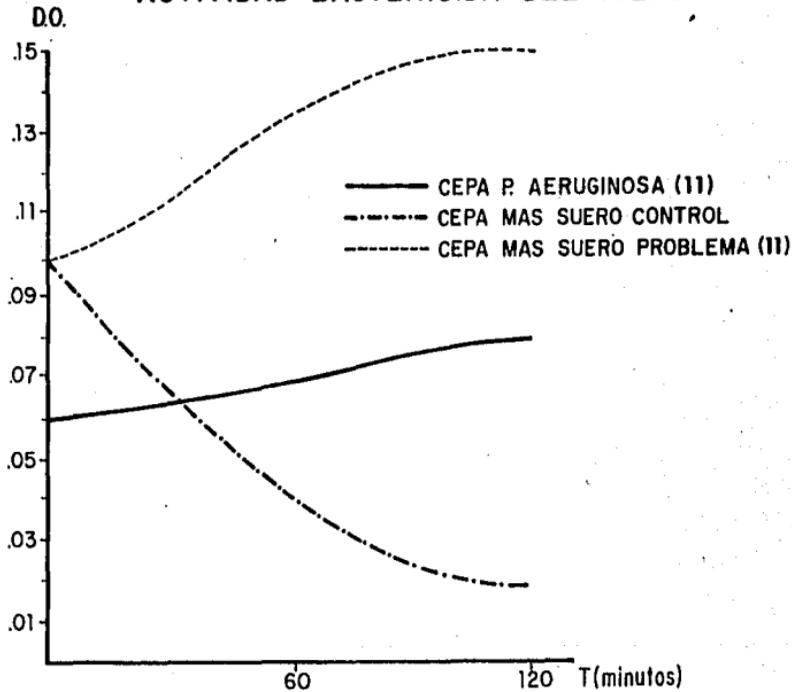
GRAFICA No.10

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



GRAFICA No. 11

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO



GRAFICA No. 12

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO

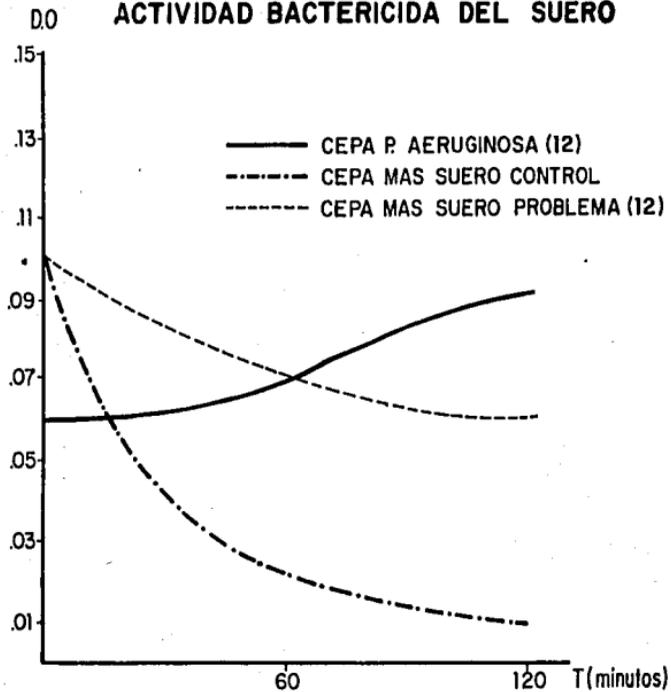
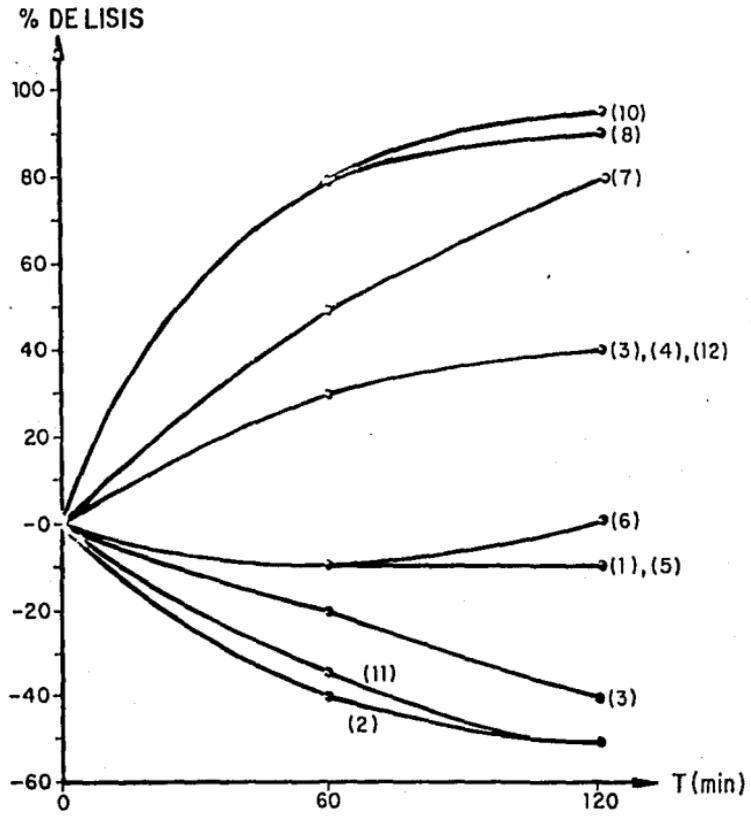


Tabla 2: % de listas.

Paciente	Tiempo 60'	Tiempo 120'
1	- 10 %	- 10 %
2	- 40 %	- 50 %
3	30 %	40 %
4	30 %	40 %
5	- 10 %	- 10 %
6	- 10 %	0 %
7	50 %	80 %
8	80 %	90 %
9	- 20 %	- 40 %
10	80 %	95 %
11	- 35 %	- 50 %
12	30 %	40 %

GRAFICA No. 13

% DE LISIS vs. TIEMPO (min)



() INDICA EL NUMERO DEL SUERO PROBADO

Tabla 3 .- Resultados obtenidos en la determinación de C3 por nefelometría de rayo laser.

Suero de pacientes quemados:

Paciente no. 1	:	156 mg/dl
Paciente no. 2	:	235 mg/dl
Paciente no. 3	:	209 mg/dl
Paciente no. 4	:	197 mg/dl
Paciente no. 5	:	130 mg/dl
Paciente no. 6	:	319 mg/dl
Paciente no. 7	:	197 mg/dl
Paciente no. 8	:	154 mg/dl
Paciente no. 9	:	175 mg/dl

Suero de pacientes con fibrosis quística:

Paciente no. 10	:	343 mg/dl
Paciente no. 11	:	429 mg/dl
Paciente no. 12	:	239 mg/dl

Suero de personas normales:

Suero control	:	89 mg/dl
---------------	---	----------

Valores normales: 83 - 177 mg/dl

4 - Discusión.

Al determinar la actividad bactericida de pacientes comprometidos y -- suero control frente a P. aeruginosa, se observaron cuatro grupos:

El primero se formó con el 50% de los sueros (gráficas: 3, 4, 7, 10 y 12) los cuales mostraron actividad bactericida durante todo el experimento, tanto los sueros problema, como el control.

El segundo grupo lo formó el 25% de los sueros (gráficas: 2, 9, y 11), en los que se presentó ausencia de la actividad bactericida, en tanto que el -- suero control sí presentó dicha actividad .

El tercer grupo lo integró el 16.7% de los sueros (gráficas 1 y 5), en este caso hubo ausencia de actividad en los primeros 60 minutos, pasado este - tiempo no se observó ninguna actividad con los sueros problema, pero el suero-control sí mostró actividad bactericida .

El cuarto grupo quedó integrado por el 8.3% (gráfica 6), el cual pre-- sentó ausencia de actividad bactericida en los primeros 60 minutos, pasado este tiempo se presentó una ligera actividad bactericida.

En el caso del primer grupo, hubo un rango de lisis de P. aeruginosa - de 30 a 80% en los primeros 60 minutos (gráfica 13), lo cual indica la presen-- cia de factores del complemento y anticuerpos específicos disponibles en el sue- ro para llevar a cabo la reacción, que da no sólo la muerte, sino también la - destrucción de P. aeruginosa en estos pacientes. Es evidente en las gráficas, - que hay un descenso en el desarrollo de P. aeruginosa al ser sometida al suero tanto problema como control, esto se debe a que hay una destrucción de la bacte- ria debida, por un lado, a la formación del complejo (MAC) de ataque a la mem- brana (26, 27, 30, 31) y, por otro, a la participación de enzimas con actividad hidrolítica presentes en el suero como lo es la lisozima (mucopéptido N-acetil muramyl-hidrolasa), que actúa degradando los enlaces β 1-4 de la mureina para formar monómeros, disacáridos o tetrasacáridos de este constituyente de la pa--

red celular de P. aeruginosa (34). Se debe recordar que la membrana externa de la pared celular de Gram negativos, en este caso P. aeruginosa, presenta como constituyente de esta envoltura, lipopolisacáridos, los cuales presentan en su porción más externa el antígeno O reconocido por su especificidad de especie. Existen referencias en la literatura (26, 27, 34) acerca de la sensibilidad y resistencia al suero como una característica dependiente de la longitud de la cadena del lipopolisacárido, específicamente la sensibilidad al suero, que se interpreta como una consecuencia del acortamiento que presenta el lipopolisacárido a nivel del antígeno O, facilitando o favoreciendo la formación de un complejo de ataque del sistema de complemento a la membrana externa de la pared celular (27, 34).

En el segundo grupo se observó un incremento en el desarrollo bacteriano de 20 a 40% en los primeros 60 minutos, y de 40 a 50% al finalizar el tiempo de prueba (gráfica 13). Existen dos posibles teorías para la explicación de esta forma de actuar:

- La primera es que se ha observado en algunos pacientes una carencia selectiva de la actividad bactericida de su suero contra su propia cepa de P. aeruginosa, posiblemente reflejando la presencia de anticuerpos bloqueadores de la actividad bactericida, lo cual se ha descrito en pacientes infectados crónicamente (12, 35).

- La segunda teoría de la ausencia de actividad bactericida en estos pacientes, es que posiblemente se deba a la disminución de algún otro componente del complemento diferente a C3, ya que al determinarse éste por nefelometría de rayo laser se encontró que estaba en el nivel superior de los valores normales o por arriba de éstos. Algunos autores han reportado que la proteasa (fracción II) de P. aeruginosa inactiva y destruye las fracciones del complemento C1, C3, C5, C8 y C9 (31).

Por otro lado, se sabe que los anticuerpos de mayor importancia en la resistencia a la infección son inmunoglobulinas de las clases IgG e IgM y éstas se ven disminuidas en pacientes quemados mal nutridos, por lo que no responden

bien a un estímulo antigénico. En heridas por quemaduras muy extensas, especialmente cuando hay sepsis, la respuesta de anticuerpos puede verse repetida (2).

Las gráficas 2 y 9 son de pacientes quemados y la falta de actividad bactericida de su suero, se debe tal vez a una disminución de inmunoglobulinas de las clases IgG e IgM por lo anteriormente dicho, ya que estos pacientes son del Hospital "Rubén Leñero", que generalmente atiende a personas de bajos recursos económicos.

Dentro de este mismo grupo dos, se encuentra un paciente con fibrosis quística (gráfica 11), por las observaciones de algunos científicos (12), existen casos de pacientes con fibrosis quística, en quienes aunque los niveles de inmunoglobulinas se encuentran dentro de los niveles normales, la actividad bactericida falla, por lo antes dicho en la primera teoría.

El tercer grupo estuvo integrado por el 16.7% de las cepas (gráficas 1 y 5), observándose ausencia de lisis a partir del minuto 60 para las cepas 1 y 5, ya que éstas se mantuvieron con un 10% de desarrollo hasta el minuto 120 (gráfica 13). En el caso de la cepa 5, el suero control presentó actividad bactericida desde un principio, y en la cepa 1, el suero control presentó actividad a partir del minuto 60, la posible explicación a este fenómeno puede radicar en que se trabaja con suero de pacientes quemados, en quienes como consecuencia del daño térmico localizado, se propicia la pérdida de factores del suero, específicamente inmunoglobulinas del tipo IgG (2,34), que junto con otros componentes, como pueden ser factores del complemento, al perderse en cantidades suficientes, no generan el descenso esperado del desarrollo bacteriano con respecto al suero control. Se puede pensar que la actividad bactericida del suero problema se encuentra alterada por la pérdida de dichas inmunoglobulinas o fracciones del complemento diferentes a C3, puesto que éste al ser determinado por nefelometría de rayo laser, da cifras adecuadas para que se lleve a cabo la activación del complemento (2)

Finalmente, 8.3% de los sueros (gráfica 6) manifestó una ligera actividad bactericida, pero ésta no fué lo suficientemente elevada como para que duran

te todo el periodo que duró el experimento hubiera un descenso significativo del desarrollo bacteriano, la explicación es muy parecida a la dada en el grupo anterior, ya que al encontrar cifras elevadas de C3, es de pensarse que si no existe deficiencia de otra fracción del complemento, ésta puede ser a nivel de inmunoglobulinas, específicamente IgM, que como ha sido referido por distintos investigadores, su deficiencia y su posterior corrección a nivel experimental, tras como consecuencia la activación del complemento esencialmente por la vía clásica (15, 30), ya que se ha dicho que la vía alterna tiene una actividad bactericida de menor importancia que la clásica para inactivar a P. aeruginosa a través de la actividad bactericida del suero (28).

Por lo que respecta al fenotipo de las cepas, aunque aquéllas obtenidas de pacientes con fibrosis quística eran mucoides en un principio, después de algunos pases en los cultivos se volvieron de tipo rugoso, semejantes a las obtenidas de los pacientes quemados.

Al comparar la actividad bactericida del suero de ambos tipos de pacientes (con fibrosis quística y quemados) no se observó diferencia en el comportamiento de las cepas, los resultados fueron semejantes, ya que los sueros presentaron tanto lisas de P. aeruginosa como también permitieron el desarrollo de la bacteria.

En ninguno de los pacientes se encontraron cepas resistentes al suero, ya que el control en todos los casos manifestó su actividad bactericida; si en el presente experimento se hubiera encontrado alguna cepa resistente a la actividad bactericida del suero tanto control como problema, cabría la posibilidad de pensar en lo antes dicho por algunos autores, y esto es que una cepa lisa, - por lo general será resistente al suero (26, 27, 34), aunque también se podía tratar de una cepa que portara algún plásmido de resistencia al suero, semejante a los plásmidos de E. coli K-12, descrito ya por algunos autores, (25, 34, 34).

5 - Conclusiones.

- 1.- Del total de 50 pacientes estudiados sólo en un 60% de ellos se aisló P. aeruginosa.
- 2.- De acuerdo a la actividad bactericida del suero obtenida de los mismos pacientes se realizó la formación de 4 grupos:
El primer grupo lo formó el 50% de las cepas, observándose actividad bactericida tanto del suero control como con el suero problema.
El segundo grupo lo formó el 25% de las cepas y presentó actividad bactericida sólo con el suero control.
En el tercero y cuarto grupos se observó actividad bactericida de manera parcial.
- 3 - La determinación de C3 por nefelometría de rayo laser para todos los pacientes, estuvo dentro de los niveles normales o por arriba de éstos.
- 4.- Se observó una total actividad bactericida en el 44% de los sueros de pacientes quemados y en el 66% de los sueros de pacientes con fibrosis quística.

6.- Bibliografía.

- 1.- American Society for Microbiology.: Identification of Glucosa Non-fermenting Gram Negative Rods. Comitee on Continuing Education. (1981).
- 2.- Arts, C.P., Moncrief, J.A., Fruit, B.A.: BURNS A TEAM APPROACH. Philadelphia W.B. Saunders Company. (1979).
- 3.- Bjorn, J.M.: Production of Exoenzyme S in Pseudomonas aeruginosa. *Infect. Immun.* 34: 147-153 (1979).
- 4.- Bradley, D.E.: The Occurrence of Pili Associated with a Plasmid of The W Compatibility Group. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64: 918-925. (1975).
- 5.- Clarke, P.H., Richmond, M.H.: GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF Pseudomonas. 1a ed. London. (1975).
- 6.- Costerton, J.W., Greesey, G.G., Cheng, J.: How Bacteria Stick. *Scientific American*. 238: 85-86. (1978).
- 7.- Cross, S.A.: Evidence for The Role of Toxin A in The Pathogenesis of Infection with P. aeruginosa in Humans. *J. Infect. Dis.* 142: 538-546. (1980).
- 8.- Crya, J.S.: Effect of Formalin Toxoiding on Pseudomonas aeruginosa Toxin A; *Biological, Chemical and Immunochemical Studies*. *Infect. Immun.* 32: 759-768 (1981).
- 9.- Davis, B.D., Dulbecco, R., Hersen, H.N., Ginberg, H.S., Wood, B.W.: TRATADO DE MICROBIOLOGIA. 2a ed. Salvat Editores S.A. (1978).
- 10.- Davis, P., Colten, H., Penninton, J., Smith, A.: Pulmonary Infection in - Cystic Fibrosis. *Cystic Fibrosis Foundation Conference*. Sandpiper Bay, Florida. (1983).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 11.- De Mateo, C.S., Hammer, M.C., Balch, A.L.: Susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to Serum Bactericidal Activity. *J. Lab. Clin. Med. V.A. Medical Center N.Y.* 511-518 (1981).
- 12.- Dogget, R.G.: Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestations of Infection and Current Therapy. Jacksonville, Texas. Academic Press. New York, San Francisco, London (1979).
- 13.- Frost, S.L. y Paranchych, W.: Composition and Molecular Weight of Pili Purified from P. aeruginosa. *J. Bacteriol.* 131: 259-269 (1977).
- 14.- Garofa, G.R., Hernández, S.R., Oropeza, M.I., Reyes, R.R.: Exploración de Lesiones por Quemaduras Infectadas. *Infectología V (1)*: 14-18 (1985).
- 15.- Glynn, A.A., Line, C.M.: A Kinetic Study of The Bacteriolytic and Bactericidal Action of Human Sera. *Immunol.* 12: 639-653 (1967).
- 16.- Hoiby, N., Olling, S.: Pseudomonas aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis: Bactericidal Effect of Serum from Normal Individuals a Patients with Cystic Fibrosis or Other Diseases. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica, Section C.* 85: 107-114 (1977).
- 17.- Janda, M.J. y Bottons, E.: P. aeruginosa Enzyme Profiling: Predictor of Potencial Invasiveness and use as Epidemiological Tool. *J. Clin. Microbiol.* 14: 55-60 (1981).
- 18.- Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelgerg, A.E.: MANUAL DE MICROBIOLOGIA MEDICA. 8a ed. El Manual Moderno S.A. (1981).
- 19.- Krieg, N.R., Holt, J.: BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. Baltimore/London. Williams and Wilkins. I: 140-174 (1984).
- 20.- Kurioga, S., Liu, V.P.: Effects of Thr Hemolysin of Pseudomonas aeruginosa on Phosphatides and on Phospholipase C Activity. *J. Bacteriol.* 93: 670-674 (1967).

- 21.- Lennette, E.H., Spaulding, E.H. y Truant, J.P.: *MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*. 4a ed. Washington D.C. American Society for Microbiology (1984).
- 22.- Matshushita y Col.: *Membrane-Bound Respiratory Chain of Pseudomonas aeruginosa Grown Aerobically*. *J. Bacteriol.* 141: 389-392 (1980).
- 23.- Meshulam, T., Verbrugh, H., Verhoeff, J.: *Serum Induced Lysis of Pseudomonas aeruginosa*. *European J. Clin. Microbiol.* 1: 1-6 (1982).
- 24.- Potter, A.A., Loutit, J.S.: *FP2 Plasmid Curing in Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 29:732-733 (1983).
- 25.- Reynard, A.M., Beck, M.E.: *Plasmid-Mediated Resistance to The Bactericidal Effects of Normal Rabbit Serum*. *Infect. Immun.* 14(3): 848-850 (1976).
- 26.- Schiller, N.L., Alazard, M.J., Borowski, R.S.: *Serum Sensitivity of a Pseudomonas aeruginosa Mucoid Strain*. *Infect. Immun.* 45(3): 748-755 (1984).
- 27.- Schiller, N.L., Hackley, D.R., Morrison, A.: *Isolation and Characterization of Serum-Resistant Strains of Pseudomonas aeruginosa Derived from Serum-Sensitive Parenteral Strains*. *Curr. Microbiol.* 10: 185-190 (1984).
- 28.- Schiller, N.L., Hatch, R.A.: *The Serum Sensitivity, Colonial Morphology, Serogroup Specificity, and outer Membrane Protein of Pseudomonas aeruginosa Strains Isolated from Several Clinical Sites*. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.* 1: 145-157 (1983).
- 29.- Schlessinger, D.: *MICROBIOLOGY*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. (1977).
- 30.- Schreiber, R.D., Morrison, D.C., Podack, E.R., Müller-Eberhard, H.J.: *Bactericidal Activity of The Alternative Complement pathway Generated from 11 Isolated Plasma Proteins*. *J. Exp. Med.* 149: 870-882 (1979).

- 31.- Schultz, D.R., Miller, K.D.: Elastase of Pseudomonas aeruginosa: Inactivation of Complement Components and Complement Derived Chemotactic and Phagocytic Factors. *Infect. Immun.* 10: 128-135 (1974).
- 32.- Sokol, A.P. y Col.: Production of Exoenzyme S by Clinical Isolates of P. aeruginosa. *Infect. Immun.* 34: 147-153 (1981).
- 33.- Sutherland, I.: Surface Carbohydrates of The Prokaryotic Cell. Academic Press. New York- London (1977).
- 34.- Taylor, P.W.: Bactericidal and Bacteriolytic Activity of Serum against Gram Negative Bacteria. *Microbiological Reviews.* 47(1): 46-83 (1983).
- 35.- Taylor, P.W., Hughes, C., Robinson, M.: Plasmids and The Serum Resistance of Enterobacteria. Elsevier/North Holland Biomedical Press. 135-143 (1979).
- 36.- Timmis, N.K., Moll, A., Danbara, H.: Plasmid Gene That Specifies Resistance to The Bactericidal Activity of Serum. Elsevier/North Holland. Biomedical Press. 145-153 (1979).
- 37.- Tomassen, M.J., Demko, C.A.: Serum Bactericidal Effect on Pseudomonas aeruginosa Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Infect. Immun.* 33: 512-518 (1981).
- 38.- Vasil, L.M., Kabat, D., Iglewski, H.B.: Structure Activity of an Exotoxin of P. aeruginosa. *Infect. Immun.* 16: 353-361 (1977).
- 39.- Walker, L.H. y Col.: Evolution of P. aeruginosa Toxin A in Experimental Rat Burn Wound sepsis. *Infect. Immun.* 25: 828-830 (1979).
- 40.- Watanabe, M., Murata, R. y Homma, Y.J.: Partial Purification of Heat-Labile Hemolysin from Pseudomonas aeruginosa. *Japan, J. Exp. Med.* 48: 449-453 -- (1978).