



Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"

B0568/89
Ej. 2

"AUMENTO EN LA ADHESION DE Pseudomonas
aeruginosa A CELULAS BUCOEPITELIALES
HUMANAS POR CONVERSION LISOGENICA"

TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO EN
B I O L O G I A
P R E S E N T A
Joceline Adriana Arce García

Los Reyes Iztacala Edo. de Méx.

Febrero, 1989.



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 E.N.E.P. IZTACALA bajo la dirección del M.en C. Sergio Vaca Pacheco y con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto PCSABNA020954).

Gracias ...

A mis padres Ma.Elena y Miguel
por darme su cariño, apoyo y
las armas para luchar en la vida

A mis hermanos Fabiola, Gabriela y
Rodrigo, por que esto sea un estímulo
y porque los adoro

A la personas más maravillosa
Biol.Saul Flores Maya por todo
lo bueno y malo, por su apoyo,
cariño y constante estímulo

A mis amigos Rosa Elena, Irasema,
Sumiko, J.Luis y Martín por
demostrarme lo que realmente significa
AMIGO y demostrármelo

Esta tesis es especialmente dedicada
a dos personas, que me enseñaron lo
bueno y maravilloso que es vivir hasta
el final...

(Mis abuelitos Ma.Luisa+ y Carlos+)

A mi abuelito el Inq.Oscar Ortega
por su apoyo y cariño que siempre
me ha demostrado

Gracias al M. en C. Sergio Vaca Pacheco por su apoyo en esta difícil tarea que es la tesis.

A mis compañeros del laboratorio Gaby, Lupita, Diego Ramón, Froylan, Andres.

A todas las personas que de alguna forma tuvieron que ver con la culminación de esta tesis.

Gracias al Biol. Saul flores Maya por el dibujo realizado en la presente tesis.

I N D I C E

	Paginas
1. Introducción.....	1
2. Bacteriófagos.....	2
3. Antecedentes	
3.1. Adhesión.....	6
4. Factores de virulencia.....	11
5. Objetivos.....	14
6. Materiales y métodos	
6.1 Microorganismos	
6.1.1 Bacterias.....	15
6.1.2 Fagos.....	16
6.1.3 Soluciones y medios de cultivo.....	16
6.1.4 Método de adhesión a células	
bucoepiteliales.....	17
6.1.4.1 Obtención de bacterias.....	17
6.1.4.2 Preparación de bacterias.....	17
6.1.5 Preparación de células	
bucoepiteliales.....	17
6.1.6 Ensayo de adhesión <u>in vitro</u>	17
7. Resultados	
7.1 Modificación superficial inducida por	
el fago FIZ15.....	19
7.2 Incremento en la adhesión inducido por	
el fago FIZ15.....	19
7.3 FIZ15 aumenta la adhesión mediante	

	un mecanismo, adicional al mediado por pili, que requiere energia.....	21
7.4	El incremento en la adhesión de PIZ15 se debe al cambio superficial que le causa el profago a nivel de su propio receptor.....	23
8.	Tablas de Resultados.....	25
9.	Conclusiones y discusion.....	31
10.	Bibliografia.....	35

1. INTRODUCCION

El género Pseudomonas comprende bacilos gram negativos, no esporulados, que miden de 1.3 a 3 um de longitud y 0.5 um de espesor, son móviles debido a la presencia de un flagelo polar (36).

Existen varias especies de Pseudomonas que tienen importancia médica, dentro de estas podemos encontrar a Pseudomonas mallei, responsable de la enfermedad del muermo; Pseudomonas pseudomallei que produce la enfermedad denominada meloidosis; Pseudomonas cepacia y Pseudomonas maltophilia consideradas como patógenos oportunistas y sólo ocasionalmente asociadas con enfermedades (13).

Dentro de la categoría de las patógenas oportunistas, podemos encontrar a Pseudomonas aeruginosa causante de un 10% a un 20% de las infecciones nosocomiales, en pacientes que están inmunodeprimidos, que han sufrido quemaduras graves o se sometieron a intervenciones quirúrgicas (28).

P.aeruginosa crece en forma de microcolonias, cubiertas por un moco de naturaleza polisacárida (alginato) haciendo posible que la bacteria se adhiera a superficies del suelo o bien se mantenga en las superficies de aguas dulces o marinas (9). En hospitales, es factible encontrarla en soluciones oftálmicas, antisépticos, infusiones, jabones, aparatos de succión, ventiladores, esponjas, termómetros, entre otros (7,13).

Por otro lado, debemos de sumar la resistencia de P.aeruginosa a una amplia gama de antibióticos, en virtud de

que en la mayoría de los casos poseen plásmidos, es decir elementos extracromosómicos que codifican para enzimas que modifican o degradan antibióticos.(7,9,15,24).

Las posibles razones por las que se han seleccionado cepas de E.aeruginosa resistentes a antibióticos son:

- 1) El amplio uso de antibióticos en los hospitales
- 2) El hecho de que el principal habitat de esta bacteria es el suelo, en el que convive con una amplia variedad de microorganismos productores de antibióticos (9,15).

Los plásmidos, aparte de conferir resistencia a algunos antibióticos tales como estreptomycin, ampicilina y cloranfenicol; pueden producir efecto sobre la superficie de las bacterias, trayendo consigo la aparición de nuevos determinantes antigénicos y cambios en la estructura del lipopolisacárido, tal es el caso de los plásmidos R1, R100 y R6,5 provocando modificaciones al lipopolisacárido y la aparición de nuevas proteínas en la membrana externa (23,24,25,31,32).

2.BACTERIOFAGOS

Los fagos se definen como entidades subcelulares, capaces de ingresar en las células vivas y reproducirse sólo en dichas células (19,22). Esto los hace parásitos intracelulares obligatorios.

Los fagos están formados principalmente por proteínas y DNA en proporciones aproximadamente iguales (19,22).

Se han detectado 2 tipos de fagos en referencia a su ciclo de vida: el lítico y el lisogénico (Fig.1).

En el ciclo de vida existen 3 pasos secuenciales:

1. Adsorción: El fago se fija a la bacteria reconociendo receptores específicos en la superficie bacteriana (11,19,22).

2. Periodo de latencia o fase vegetativa: Poco después de la inyección o entrada del material genético viral, se inicia la expresión de genes tempranos del fago que codifican para proteínas involucradas principalmente en el cese de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas bacterianas y en la síntesis de ácidos nucleicos virales. La síntesis de estos ácidos nucleicos coincide con la transcripción de genes tardíos del fago involucrados en la síntesis de proteínas estructurales fágicas para, de esta manera generar nuevas partículas infecciosas.

3. Lisis: Rompimiento de la célula por acción de enzimas líticas codificadas por genes virales tardíos, liberándose las nuevas proteínas infecciosas (11,22).

Para el ciclo de vida de un fago lisogénico temperado éste infecta a la bacteria de manera similar al fago lítico sin embargo, una vez inyectado el ácido nucleico éste puede incorporarse al cromosoma bacteriano o mantenerse como plásmido en el interior celular recibiendo el nombre de profago y la cepa portadora es una lisógena. Podemos citar un ejemplo en el que el profago permanece como plásmido manteniéndose en el interior celular, tal es el caso del fago P1 de Escherichia coli. En la lisogénización por otros bacteriófagos de E.coli

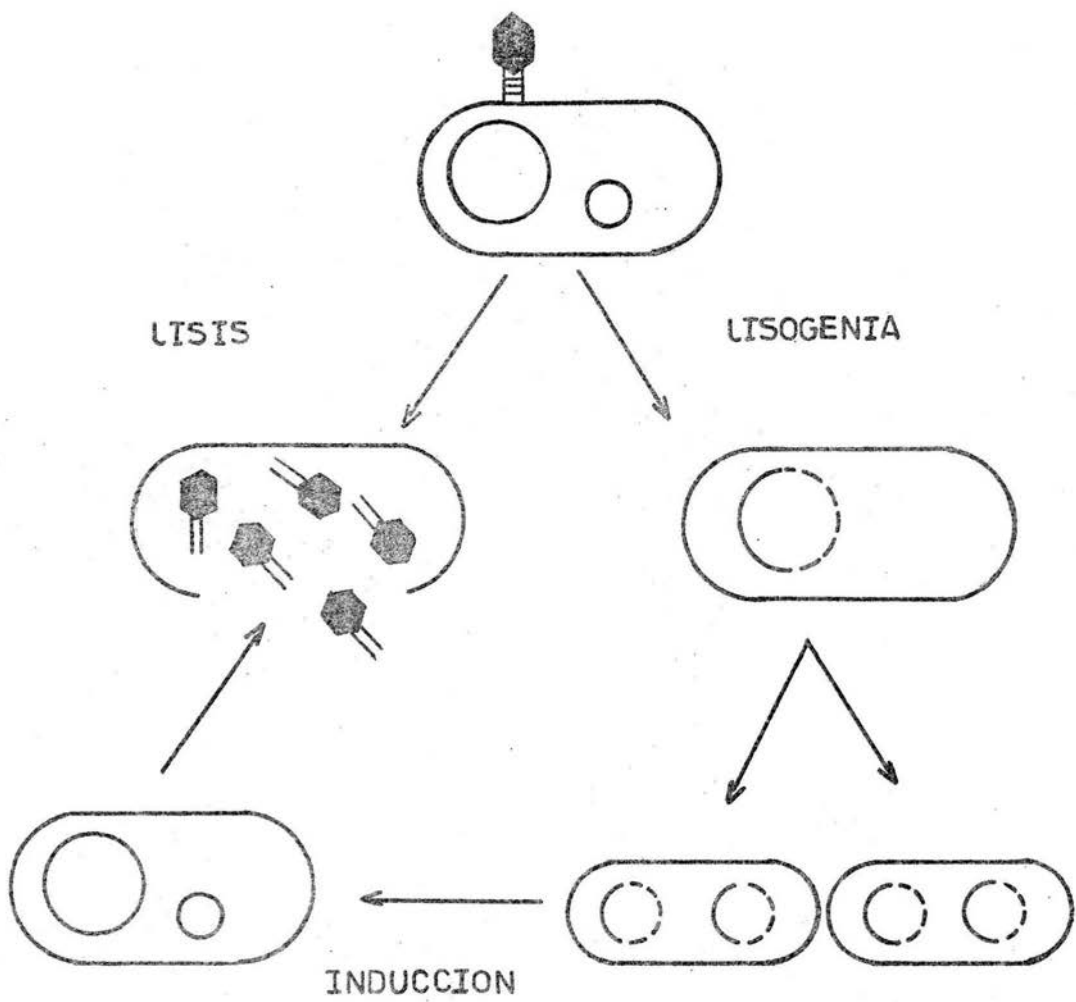


Fig. 1. Ciclo de vida de los bacteriófagos.

como el fago lambda, el genoma viral se integra al cromosoma bacteriano en un sitio específico denominado attE entre los operones gal y bio. En ambos casos se reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis por acción de un represor codificado por el genoma viral (19).

La frecuencia de cepas lisógenas (portadoras de profagos) entre las cepas clínicas de Paeruginosa es cercana al 100% (2,13,15,21), contrastando con Escherichia coli donde la frecuencia es aproximadamente el 10% (13). La polilisogenia (mas de un profago por bacteria) , parece ser común en Paeruginosa, al grado de haberse detectado una cepa que aloja hasta 10 profagos diferentes (13). Se desconoce qué factores determinan esta alta frecuencia de lisogenia en esta bacteria, sin embargo se han detectado cepas lisogénicas que aparte de la habilidad que tienen para producir fagos, y ser inmunes a una superinfección por fagos homólogos presentan una serie de cambios conocidos como conversión lisogénica.

En el caso de bacterias gram negativas, el estado de lisogenia está frecuentemente asociado con cambios en el antígeno "O", aparición de nuevas proteínas específicas en el exterior de la membrana, así como la producción de toxinas y antibióticos (15,18).

Dimitracopoulos y Bartell,(11) demostraron en ratones que la LD de la cepa E1 de Paeruginosa disminuye cuando ésta ha sido lisogenizada por el bacteriófago 8, debido a cambios en la composición química y actividad biológica de la glicoliproteína extracelular (ver tabla A).

TABLA A.

EJEMPLOS DE CONVERSION LILOGENICA EN BACTERIAS.

Bacteria	Fago(s)	Efectos reportados
<u>Bacillus megatherium</u>	1pt,3	Cambios en la morfología colonial.
<u>Corynebacterium diphtheriae</u> Btox+		Toxina diftérica.
<u>Staphylococcus aureus</u>	420	Enterotoxina A.
<u>Streptococcus pyogenes</u> Grupo A	T12g1	Toxina de escarlatina.
<u>Escherichia coli</u>	P2	Incremento a la sencivilidad a la 5-fluorodeoxiyridina.
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	D3	Cambios en antígenos somáticos y pérdida en la habilidad de adsorción al fago D3.
<u>Rhizobium trifolii</u>	7,7cr	Cambios en antígenos somáticos y pérdida en la habilidad de adsorción de los fagos 7,7cr y 8.
<u>Vibrio fetus</u>	VFP-13	Serotipo V al 1.

Tomado de Barksdale (2).

3. ANTECEDENTES.

La virulencia de un microorganismo se define como la habilidad que tiene para asociarse con su hospedero, para invadir y multiplicarse dentro de éste. Esta definición de virulencia es propia para P.aeruginosa, en relación al ser humano como hospedero (27). Entre las propiedades comunes a muchos microorganismos en la producción de la infección se encuentran: la adhesión, la proliferación local, el daño al tejido, la invasión y la diseminación (41).

3.1 ADHESION

La habilidad de una bacteria para adherirse a células epiteliales está asociada, en la mayoría de los casos, con las estructuras de la superficie en este caso los pili o fimbrias, para gram negativas y, fimbrilla o fimbria en bacterias gram positivas (3,9,43).

Los pili (o fimbrias) son polímeros de proteínas compuestos por subunidades idénticas, unidas por puentes de hidrógeno o por interacciones hidrofóbicas. Las subunidades tienen un P.M. de 8 000 a 26 000 d; están formadas en un 50 % de aminoácidos no polares y su punto isoelectrico oscila entre 3.7 y 5.6 (3).

Recientemente se ha demostrado una correlación in vitro de la adhesión de bacilos gram negativos a epitelio respiratorio superior, mediada por pili y la colonización por estos organismos (41,44).

Numerosos estudios han demostrado que los pili juegan un papel importante en la adhesión bacteriana y en la colonización del epitelio mucoso (16). Los resultados de Woods, et al. (41), proporcionan una fuerte evidencia de la importancia de los pili para la adhesión de P.aeruginosa a epitelio respiratorio superior. Para demostrar el papel de los pili en la adhesión, Woods et al.(41), matar a P.aeruginosa con calor o formalina, los organismos pierden la capacidad de adherirse a células epiteliales bucales; mientras que matando a P.aeruginosa con luz ultravioleta, esta retiene la capacidad de adherirse a células bucoepiteliales in vitro, esto se debe, a que se pierden los pili después del tratamiento con calor o formalina y se retienen después del tratamiento con luz ultravioleta, dato confirmado por observaciones a microscopio electrónico (44).

La eliminación de los pili por digestión enzimática, (utilizando tripsina en una concentración de 2.5 μ g por mililitro), decrementa de 29 a 3.2 bacterias por célula, la adhesión a células bucoepiteliales. Fue necesario incorporar cloranfenicol en las pruebas de adhesión para evitar que los pili fueran regenerados después de su eliminación. La preincubación de células epiteliales con pili purificados antes de la pruebas de adhesión causa un decremento (29 a 5.7 bacterias por célula), en la adhesión de P.aeruginosa indicando que es posible saturar los sitios de unión disponibles. Sin embargo los pili obtenidos de una cepa heteróloga son incapaces de bloquear la adhesión (41,43); es decir, los pili solo bloquean la adhesión de cepas de

las que fueron aislados.

La adhesión bacteriana a células epiteliales depende del sistema específico de reconocimiento entre la bacteria y el tejido celular, se ha postulado que este tropismo está determinado en gran medida por la distribución de las adhesinas de la superficie bacteriana y los receptores de los diferentes tejidos (3,14,16).

Se han identificado las adhesinas de muchas bacterias (ver tabla B), así como los receptores celulares de éstas, localizados en la superficie; en general estos receptores contienen en su mayoría carbohidratos; a veces un sólo residuo es el responsable de la adhesión y otras veces son cadenas de oligosacáridos. Para la adhesión intracelular, los receptores contienen los siguientes carbohidratos:

Galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetil glucosamina, manosa, fucosa, N-acetil-ácido-murámico; todos con configuración D excepto L-fucosa (3,14).

La relación entre la fibronectina y los sitios específicos de enlace para bacterias gram negativas aún no está clara. Los estudios sugieren que los sitios de enlace disponibles están localizados en la superficie de células epiteliales, notando que la presencia de la fibronectina inhibe la adhesión de organismos gram negativos, como en el caso de P.aeruginosa, en el cual la fibronectina inhibe los enlaces bacterianos ocupando sitios específicos de enlace (43).

Por otro lado también se dice que hay especificidad de

TABLA B.

ADHESINAS Y RECEPTORES ESPECIFICOS DE VARIAS BACTERIAS.

BACTERIA	ADHESINA	RECEPTOR
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Fimbriae	
<u>Escherichia coli</u>	Fimbriae	2B-D-Gal o GalNac y GicNac
<u>Escherichia coli</u>	Fimbriae	Globotetraosilcera mida
<u>Vibrio cholerae</u>	Fimbriae	Fucosa y manosa
<u>E.coli; Klebsiella</u> <u>Shigella; Salmonella</u>	Fimbriae (Tipo 1)	D-manosa

(Tomado de Beachey (3))

especie; es decir que ciertas cepas bacterianas solo pueden colonizar determinadas especies animales; como ejemplo de pueden citar:

- i) Infecciones gonococales que están limitadas a seres humanos,
- ii) Infecciones diarréicas por Escherichia coli (K88), exclusivas de cerdos,
- iii) Infecciones intestinales de E.coli (CFAI y CFA II), y las infecciones por estreptococos del grupo A que solo se presentan en humanos (36,37).

Se ha usado una gran variedad de modelos experimentales para el estudio in vitro de la adhesión de microorganismos adherentes; estos modelos son útiles para determinar las bases moleculares y alguno de los mecanismos adhesivos que el patógeno dado pueda exhibir.

Se ha encontrado que las condiciones de cultivo de los microorganismos modifican considerablemente la producción de adhesinas; algunos pueden sintetizar más de una adhesina para tener función específica en algún momento de su ciclo de vida y no necesariamente en el huésped. La adhesión de organismos patógenos y la identificación de los mecanismos adhesivos se ha estudiado en los siguientes modelos:

- 1) Adhesión de microorganismos en suspensión a una gran variedad de tipos celulares.
- 2) Adhesión a monocapas de células epiteliales hechas a partir de explantes.
- 3) Adhesión a bordes de cepillo de intestino.

- 4) Adhesión a membranas celulares.
- 5) Utilización de mutantes no adhesivos bien caracterizados.
- 6) Adhesión a células infectadas con virus.
- 7) Adhesión a superficies inertes.
- 8) Hemaglutinación
- 9) Microscopia óptica y electrónica.
- 10) El uso de inhibidores específicos de la adhesión, como carbohidratos, lectinas y anticuerpos específicos.

4. FACTORES DE VIRULENCIA DE Pseudomonas aeruginosa

P.aeruginosa produce varias sustancias extracelulares relacionadas con su virulencia, entre las que se encuentran: una exotoxina letal para ratones (5), producida por un alto porcentaje de cepas aisladas de pacientes (27), la cual inhibe la síntesis de proteínas por ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2) (26); una proteasa alcalina que ha sido relacionada con la producción de hemorragias internas específicamente en pulmones y probablemente responsable de la destrucción del tejido corneal, además de los efectos de necrotización (17); una elastasa que tiene acción destructiva sobre 7 de los 9 componentes del complemento, también inhibe el movimiento de leucocitos polimorfonucleados al sitio de inflamación, disminuye su actividad fagocítica e inactiva

la proteína alfa-1. La elastasa está implicada en las lesiones destructivas vasculares producidas por P.aeruginosa, asociadas con una septicemia infecciosa (34).

Otra sustancia extracelular relacionada con la virulencia de P.aeruginosa es la leucocidina, la cual destruye a los leucocitos, pero no a los glóbulos rojos (32,33).

Además este microorganismo produce dos sustancias hemolíticas, un glicolípido termoestable y una fosfolipasa termolábil (6) que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina, en eritrocitos(6).

Un determinante más de la virulencia, de este microorganismo es la sustancia mucóide que elaboran algunas cepas clínicas, particularmente las que han sido aisladas de pacientes con fibrosis quística, funcionando también como toxina(29,45). Esta sustancia se conoce como alginato y es un exopolisacárido, principalmente constituido por ácido manurónico y ácido gulurónico (6). El alginato inhibe las actividades fagocíticas de los leucocitos, y es capaz de producir efectos similares a los producidos por la infección de ratones con bacterias viables (33,40).

El alginato también ha sido implicado en la adhesión de P.aeruginosa, a células de tráquea de ratón (29).

Con el propósito de averiguar si los bacteriófagos contribuyen a la virulencia de P.aeruginosa, en nuestro laboratorio aislamos 210 bacteriófagos a partir de cepas clínicas y construimos las correspondientes lisógenas en la cepa PA01 (libre

de fagos). Solamente 80 fagos fueron capaces de formar lisógenas estables. Se obtuvieron 19 lisógenas diferentes mediante el criterio de inmunidad de estas a la superinfección por todos los fagos (21).

Los objetivos de este trabajo son:

5.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

* Caracterizar el aumento en la adhesión de Pseudomonas aeruginosa PAO1, que le confiere el bacteriófago FIZ15 cuando este se encuentra en estado lisogénico (PIZ15).

* Describir parcialmente los mecanismos de adhesión de la cepa lisógena FIZ15 a células bucoepiteliales.

La estrategia para abordar los objetivos anteriores es:

1) Evaluar cuantitativamente la adhesión a células bucoepiteliales humanas, de las cepas PAO1,PIZ15, y PAO1/15 (resistente a la infección por el bacteriófago FIZ15) de Pseudomonas aeruginosa

2) Determinar cuantitativamente si la adhesión a células bucoepiteliales humanas, de la cepa PAO1(FIZ15) lisógena es independiente del mediado por pili.

3) Determinar si la adhesión en la cepa FIZ15 de Pseudomonas aeruginosa a células bucoepiteliales humanas se debe a un mecanismo que requiere energía.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. MICROORGANISMOS

6.1.1 BACTERIAS

CEPAS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	ORIGEN
PAO 1	Silvestre libre de fagos	Dr. B.W. Holloway Monash University Australia.
PIZ15	Lisógena para el fago FIZ15	Lab., genética de la Unidad de Morfología y Función. E.N.E.P.I
FIZ15-1 y FIZ15-2	Lisógenas independientes para el fago FIZ15	Lab., genética de la Unidad de Morfología y Función. E.N.E.P.I
PAO1/15	Mutante espontánea de PAO1 resistente al fago FIZ15	Lab., genética de la Unidad de Morfología y Función. E.N.E.P.I
PAO1 Ser-2	Mutante espontánea resis- tente al efecto bactericida del suero humano normal.	Lab., genética de la Unidad de Morfología y Función. E.N.E.P.I

6.1.2 FAGOS

FAGOS	CARACTERISTICAS RELEVANTES	ORIGEN
FIZ15	Fago temperado obtenido a partir de una cepa de <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Lab. Genética de clínica a Unidad de Morfología Y Función.E.N.E.P.I
D3	Fago temperado, causa conversión lisogénica modificando el antígeno "O" de la cepa bacteriana.	Dr.B.W.Holloway, Monash University Australia.

6.1.3 SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) pH 7.2

KH₂PO₄ 5.1g, Na₂HPO₄ 20.1g, NaCl 4.25g., por litro

Solución de eritrocina β 0.4% en PBS

Solución de azul de metileno 0.4% en PBS

Tripsina 2.5 μ g/ml en PBS

Agar de soja tripticaseína (TSA) 30g + 15 g de agar por litro

Caldo Nutritivo (CN) 8 g por litro

6.1.4 METODO DE ADHESION A CELULAS BUCOEPITELIALES

6.1.4.1 Obtención de bacterias

Se crecieron las bacterias en TSA a 37°C durante 24 horas, se colectó el crecimiento de una caja de Petri en 4 ml de PBS, se centrifugó 3 minutos en la microcentrifuga Eppendorf y la pastilla se lavó 3 veces con 4 ml de PBS. El cultivo se diluyó hasta obtener una D.O. = 0.25 (dilución 1:100)

590

6.1.4.2 PREPARACION DE CELULAS BUCOEPITELIALES

Las células bucoepiteliales fueron recolectadas por raspados vigorosos del carrillo con isopos estériles de 5 a 6 voluntarios (adultos sanos), suspendiéndolas en 4 ml de PBS, las se lavaron 3 veces con PBS por centrifugación, fueron resuspendidas y ajustadas a una concentración de $2-5 \times 10^4$ cel/ml. La suspensión celular se trató con tripsina (2.5 μ g/ml) e incubándose a 37°C durante 10 minutos. La enzima se eliminó por lavados sucesivos con PBS, finalmente el paquete se resuspendió en 4 ml de PBS.

6.1.5 Ensayo de adhesión in vitro

Se preparó un tubo conteniendo 2×10^6 bacterias y 5×10^4 células bucoepiteliales en 1 ml de PBS, se incubaron a 37°C a 20 revoluciones por minuto durante 120 minutos. La suspensión se

lavó 5 veces con PES por centrifugación a 250 g por 10 minutos, para eliminar bacterias no adheridas. En el segundo lavado se agregaron 2 gotas de eritrocina **B** a la suspensión. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de PES, tomándose una alícuota de la suspensión para hacer un frotis que se fijó por calor. Las preparaciones fueron teñidas con azul de metileno durante 2 minutos, el exceso de colorante se lavó con agua destilada y las laminillas se secaron al aire; se examinaron a microscopio de luz con aumento de 40 X y 100 X. De las muestras se examinaron 30 células viables contándose el número de bacterias adheridas por célula. Los controles consistieron en células a los que no se les agregaron bacterias, usándose para determinar la flora natural, sometidas al mismo tratamiento.

R E S U L T A D O S

MODIFICACION SUPERFICIAL INDUCIDA POR FIZ15

Como mencionamos en la introducción, en nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar la contribución de los bacteriófagos a la virulencia de Pseudomonas aeruginosa debido a que esta bacteria representa un grave problema de hospital y casi el 100% de sus cepas clínicas son lisógenas.

Para abordar el problema, otros miembros del laboratorio aislaron 210 bacteriófagos temperados a partir de un número igual de cepas clínicas de P.aeruginosa y construyeron las correspondientes lisógenas en la cepa PAO1, libre de fagos.

Como primer criterio para seleccionar aquellas lisógenas en las que el profago hubiese alterado alguna propiedad de virulencia, se aglutinaron con antisuero (obtenido en conejos) dirigido contra la cepa PAO1, para de este modo detectar cambios superficiales inducidos por el profago.

En la tabla 1 se observa que la lisógena PIZ15 efectivamente posee una modificación superficial inducida por el profago FIZ15, ya que muestra un título de aglutinación 4 veces mayor que la cepa PAO1.

INCREMENTO EN LA ADHESION INDUCIDO POR EL FAGO FIZ15

Una importante propiedad de virulencia de P.aeruginosa es la adhesión la que permite colonizar al hospedero para

TABLA #1.

TITULOS DE AGLUTINACION DE LAS CEPAS
PAO 1 Y PIZ15 DE Pseudomonas aeruginosa
CON ANTISUERO CONTRA PAO 1.

CEPA	TITULO
PAO1	1:20480
PIZ15	1:81920

SE MEZCLARON DILUCIONES DOBLES SERIADAS (EN PBS)
CON 5×10^4 BACTERIAS MUERTAS POR CALOR. DESPUES
DE INCUBAR A 37°C DURANTE 18 HS , LAS MEZCLAS SE
CENTRIFUGARON Y SE AGITARON SUAVEMENTE PARA
OBSERVAR LA AGLUTINACION. EL TITULO ES EL
RECIPROCO DE LA MAXIMA DILUCION DE SUERO QUE
MOSTRO AGLUTINACION MACROSCOPICA.

posteriormente invadirlo y causarle enfermedad.

Para averiguar si el bacteriófago FIZ15 alteraba las propiedades de adhesión a células bucoepiteliales humanas de esta bacteria, medimos esta propiedad de virulencia a las cepas PAO1 y FIZ 15.

En la tabla 2 podemos observar que la cepa FIZ 15 muestra un incremento de 1.6 veces en la adhesión a células bucoepiteliales humanas. Este incremento en la adhesión se debe a la presencia del fago FIZ15, toda vez que ambas cepas son isogénicas cromosómicamente y difieren solamente en la presencia del profago en la lisogénia. (La cepa PAO1Ser2 será tratada en la parte de discusión y conclusiones)

El número de bacterias en la cepa PAO1 adheridas por célula que nosotros encontramos es idéntico al reportados en la literatura la misma cepa (41), por lo que podemos afirmar que el ensayo de adhesión funciona adecuadamente en nuestras manos.

Para confirmar que el aumento en la adhesión de la cepa FIZ15 se debe a la presencia del profago y no a otra causa, como pudiera ser que la cepa lisogénica que estudiamos poseyera una mutación cromosómica responsable del incremento, obtuvimos otras dos lisógenas independientes y les medimos su adhesión. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Ambas lisógenas independientes FIZ15-1 y FIZ15-2 muestran una adhesión mayor que la cepa PAO1 y similar a FIZ15, lo que nos permite concluir que el incremento en la adhesión de las lisógenas se debe a la presencia del fago FIZ15.

TABLA #2.

ADHESION DE Pseudomonas aeruginosa
A CELULAS BUCEOPIHELIALES HUMANAS.

CEPAS.	# DE BACTERIAS ADHERIDAS/CEL*	
PAO1	20	±0.89
PIZ15	31.83	±0.41
PAO1Ser2	47.05	±0.06
**	0.9	±0.09

* MEDIA ± DESVIACION ESTANDARD DE 3 ENSAYOS

** : CONTROL SIN ADICION DE BACTERIAS, PARA ESTIMAR
EL NUMERO DE BACTERIAS INDIGENAS.

SE MEZCLARON 5×10^4 CELULAS (TRATADAS CON TRIPSINA
2.5 µg/ml 10 MINUTOS A 37°C) CON 2×10^8 BACTERIAS.
DESPUES DE 2 HORAS DE INCUBACION A 37°C EN AGITACION
(20 rpm), EN PBS pH 7.2, SE LAVO PARA ELIMINAR LAS
BACTERIAS NO ADHERIDAS. SE TINO Y SE HIZO UN
FROTIS. SE CONTO EL NUMERO DE BACTERIAS ADHERIDAS/CEL
EN 40 CELULAS ELEGIDAS AL AZAR.

TABLA #3.

ADHESION DE Pseudomonas aeruginosa
A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS.

CEPAS	# DE BACTERIAS ADHERIDAS/CEL*	
PA01	20	± 0.88
FIZ15-1	38.15	± 1.23
FIZ15-2	37.35	± 0.47
PA01(D3)	28.90	± 0.171
**	0.9	± 0.09

* MEDIA \pm DESVIACION ESTANDARD DE 3 ENSAYOS

**= CONTROL SIN ADICION DE BACTERIAS, PARA ESTIMAR
EL NUMERO DE BACTERIAS INDIGENAS.

Debido a que la lisógena PIZ 15 también presenta un incremento en la resistencia a la fagocitosis in vitro por macrófagos peritoneales de ratón (39) y a que este fenotipo también es conferido a la cepa PAO1 por el profago D3 (15,18), decidimos evaluar la contribución de D3 a la adhesión. Como se observa en la Tabla 3, el bacteriófago D3 también causa un incremento en la adhesión de PAO1, si bien éste es menor que el causado por el FIZ15.

FIZ15 AUMENTA LA ADHESION MEDIANTE UN MECANISMO, ADICIONAL AL MEDIADO POR PILI, QUE REQUIERE ENERGIA

Se ha descrito que la adhesión de la cepa PAO1 de Paeruginosa a células bucoepiteliales humanas está mediada por los pili bacterianos y ocurre mediante un proceso independiente de energía (41).

Con el propósito de determinar si la adhesión aumentada de la cepa PIZ15 ocurre por el mismo mecanismo de adhesión de la cepa PAO1, medimos la adhesión de ambas después de someterlas a los siguientes tratamientos:

- a) Muerte por calentamiento, tratamiento que además elimina los pili de la superficie bacteriana(41)
- b) Muerte por irradiación con luz ultravioleta, en la que los pili no son eliminados (41).

En ambos tratamientos, confirmamos la muerte bacteriana por la ausencia de crecimiento en agar nutritivo.

En los resultados de la Tabla 4 podemos observar que la cepa

TABLA #4.

EFEECTO DEL CALOR Y LA LUZ ULTRAVIOLETA SOBRE
LA ADHESION DE Pseudomonas aeruginosa A
CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS.

CEPAS	TRATAMIENTO	#BACTERIAS/CELULA*
PAO 1	—	23.5 ±1.7
	C	3.3 ±0.70
	U.V.	20.9 ±0.88
FIZ 15	—	30.7 ±2.15
	C	4.0 ±1.8
	U.V.	23.2 ±1.06

* MEDIA ± DESVIACION ESTANDARD DE 2 ENSAYOS

U.V.= LAMPARA GERMICIDA GE,50 W A 40 cm / 10'
(Luz Ultravioleta)

C = 100 °C / 2 hrs.

LAS CONDICIONES DE ENSAYO SON LAS DESCRITAS EN LA TABLA
No. 2. EXCEPTO EN LA MUERTE BACTERIANA POR CALOR (100°
C/2 h) ó POR IRRADIACION CON LUZ ULTRAVIOLETA (LAMPARA
GERMICIDA GE 50 W DIST.40 cm DURANTE 10 min.

PA01 muerta por calor practicamente no se adhiere, en tanto que la irradiación con luz ultravioleta no afecta la adhesión. Estos resultados confirman los reportados por Woods et al., (1980). Al contrario de lo que ocurrió con PA01, la cepa PIZ15 mostró una reducción significativa en la adhesión cuando fue muerta por irradiación. Igual que PA01, PIZ15 practicamente no se adhirió cuando fue muerta por calor.

De estos resultados concluimos que el bacteriófago FIZ15 aumenta la adhesión mediante un mecanismo adicional al mediado por pili.

Para confirmar la conclusión anterior, hicimos una serie de experimentos en los que incluimos en el ensayo de adhesión un desacoplante de la fosforilación oxidativa con el propósito de inhibir la síntesis de ATP de las cepas bacterianas.

Los resultados de esta serie de experimentos se muestran en la Tabla 5. La adhesión de la cepa PA01 no se afecta por los desacoplantes carbonil cianuro m-clorofenil hidrazona (CCCP) ó 2,4 dinitrofenol (2,4 DNP), lo que confirma, que por otro criterio, que el mecanismo de adhesión de esta cepa no requiere energía, solo la presencia de pili.

La adhesión de la cepa PIZ15, por el contrario, disminuye drásticamente por afecto de los desacoplantes. Estos resultados confirman la conclusión de que el bacteriófago FIZ15 aumenta la adhesión de la lisógena PIZ15 mediante un mecanismo (adicional al descrito en la literatura, mediado por pili), que requiere energía.

En la Tabla 5 podemos observar también que el aumento en la

TABLA #5.

EFFECTO DEL CCCP Y DEL 2,4 DNP SOBRE LA
ADHESION DE Pseudomonas aeruginosa
A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS.

CEPAS	TRATAMIENTO	#BACTERIAS ADHERIDAS/CEL*
PA01	—	19.5 ± 1.3
	CCCP	23.5 ± 0.4
	2,4 DNP	18.4 ± 0.55
PIZ15	—	37.5 ± 0.4
	CCCP	12.7 ± 0.3
	2,4 DNP	11.3 ± 0.3
PA01(D3)	—	18.6 ± 0.66
	2,4DNP	28.9 ± 0.98
	2,4DNP	28.0 ± 0.77

* MEDIA ± DESVIACION ESTANDARD DE 3 ENSAYOS

LAS CONDICIONES DEL ENSAYO SON LAS DESCRITAS EN LA TABLA
No. EXCEPTO POR LA ADICION DE CCCP (50 µg / ml) ó 2,4
DNP (250 µg / ml), DURANTE LAS 2 HORAS DE INCUBACION.

adhesión de la cepa PA01 que causa el bacteriófago D3, es independiente de energía, ya que la lisógena PA01 (D3) presenta la misma adhesión con o sin desacoplantes.

EL INCREMENTO EN LA ADHESION DE FIZ15 SE DEBE AL CAMBIO SUPERFICIAL QUE LE CAUSA EL PROFAGO A NIVEL DE SU PROPIO RECEPTOR.

La lisógena FIZ15 no permite la adsorción del bacteriófago FIZ15 (40), lo que demuestra que el profago altera su propio receptor en la superficie bacteriana. El receptor para FIZ15 probablemente es el antígeno "O" ya que la FIZ15 tampoco permite la adsorción del bacteriófago D3 del cual se ha reportado que es antígeno "O"-específico y una vez que lisogeniza a la cepa PA01 le causa un cambio superficial en el antígeno "O" que imposibilita que pueda adsorberlo.

Así, la lisógena PA01(D3) tampoco permite la adsorción del bacteriófago FIZ15 (10).

Para averiguar si el cambio superficial inducido por FIZ15 en la lisógena es el responsable del incremento en la adhesión, en nuestro laboratorio se obtuvo una mutante de PA01 resistente al bacteriófago FIZ15 y se confirmó que la resistencia se debía a una alteración en el receptor para FIZ15 lo que impedía su adsorción (10). Cuando medimos la adhesión de esta mutante (PA01/15) a células bucoepiteliales humanas, encontramos que la alteración en el receptor fágico causó un incremento de 4 veces en la adhesión respecto a PA01 y que este es independiente de

energía (Tabla 6).

Así, para que se presente el incremento en la adhesión no se requiere la presencia del profago FIZ15, basta con que haya ocurrido la modificación en el receptor bacteriano para el fago.

Un fenotipo más que el profago FIZ15 le confiere a la lisogena es la resistencia al efecto bactericida del suero humano normal. Esta resistencia se debe también a la alteración en el receptor fagico y no requiere la presencia del cromosoma viral en el interior de la bacteria ya que la cepa PAO1/15 es resistente al suero no permite la adsorción de FIZ15 ni D3 siendo el mismo caso para la cepa PAO1Ser2 (10). El caso de la cepa PAO1Ser2 será tratada en la parte de discusión y conclusiones.

En la Tabla 6 podemos observar que la cepa PAO1Ser2 también muestra una adhesión aumentada células bucoepiteliales humanas sin embargo esta es independiente de energía.

TABLA #6.

EFFECTO DEL CCCP Y DEL 2,4 DNP SOBRE LA
ADHESION DE Pseudomonas aeruginosa
A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS.

CEPAS	TRATAMIENTO	#BACTERIAS	ADHERIDAS/CEL*
PA01	---	19.5	± 1.3
	CCCP	23.5	± 0.4
	2,4 DNP	18.4	± 0.55
PA01/15	---	79.3	± 0.05
		18.6	± 0.66
PA01Ser2	---	47.0	± 0.98
	2,4 DNP	46.4	± 1.09

* MEDIA \pm DESVIACION ESTANDARD DE 3 ENSAYOS

LAS CONDICIONES DEL ENSAYO SON LAS DESCRITAS EN LA TABLA

No.2

CONCLUSIONES Y DISCUSION

La adhesión es un factor importante para la virulencia de Pseudomonas aeruginosa ya que es un pre-requisito indispensable para que la bacteria pueda colonizar y posteriormente invadir al hospedero causándole una infección local y/o sistemática. Este microorganismo es invasivo y toxigénico capaz de causar cuadros clínicos muy variados, predominando infecciones urinarias, óticas oculares y de heridas quirúrgicas y quemaduras (27).

Se ha descrito que el mecanismo de adhesión de P.aeruginosa a células bucoepiteliales humanas (modelo de adhesión ampliamente utilizado por sencillo barato y reproducible), está mediado por pili y no requiere energía metabólica ya que mientras las bacterias posean pili se adhieren, aún y cuando hayan sido muertas por formalina o luz ultravioleta (44).

Por otro lado, prácticamente el 100% de las cepas clínicas de P.aeruginosa son lisógenas y algunas de ellas albergan hasta 10 profagos diferentes (15). Esta gran abundancia de lisógenas entre las cepas clínicas llevó a nuestro grupo de trabajo a postular la hipótesis de que los bacteriófagos de P.aeruginosa contribuyen a elevar su virulencia.

En este trabajo hemos demostrado que el bacteriófago FIZ15 aumenta la adhesión de P.aeruginosa a células bucoepiteliales humanas (Tabla 2). Confirmamos también que este incremento se debe a la presencia del profago ya que lo presentan no solo la

lisógena que construimos inicialmente, sino también otras dos lisógenas construimos en forma independiente en nuestro laboratorio (Tabla 3).

En el presente trabajo también confirmamos los resultados de adhesión de la cepa PAO1 a células bucoepiteliales humanas reportados por otros investigadores, tanto en lo relativo al número de bacteria adheridas por células (Tabla 2 y Ref.44), como el hecho de que la adhesión de esta cepa ocurre mediante un mecanismo independiente de energía (Tabla 4 y Ref.44).

Un hallazgo no descrito que reportamos aquí, es el que el profagos D3 también aumenta la adhesión de la cepa PAO1 a células bucoepiteliales humanas (Tabla 3).

Sin embargo, el incremento en la adhesión que le confieren los profagos FIZ15 y D3 a la cepa PAO1 no es idéntico; el profago FIZ15 lo hace mediante un mecanismo que requiere energía (Tablas 4 y 5), mientras que D3 lo hace en menos grado y a través de un mecanismo independiente de energía (Tabla 5). Ambos fagos FIZ15 y D3, al lisogenizar a la cepa PAO1 alteran el antígeno "O" (15,40), no obstante, las alteraciones deben ser diferentes ya que los fenotipos de adhesión de las lisógenas correspondientes difieren del requerimiento de energía.

Parece poco probable que el mecanismo de adhesión dependiente de energía se deba, además del cambio en el antígeno "O", a otra causa; ya que la mutante espontánea PAO1/15 fue seleccionada como resistente al fago FIZ15 (por lo que tiene alterado el receptor fágico, que es antígeno "O") y presenta un importante incremento en la adhesión, el cual también es dependiente de energía

(Tabla 5). Adicionalmente, este resultado nos permite afirmar que no es necesario que el ADn fágico se encuentre presente para que se incremente la adhesión, basta que la cepa haya sufrido el cambio superficial a nivel del antígeno "O" (receptor para los fagos FIZ15 y D3).

Por otro lado, la mutante espontánea PAO1Ser2 (que fue seleccionada como resistente al efecto bactericida del suero humano normal y posee un cambio superficial en el receptor fágico (40), también tiene incrementada la adhesión pero el mecanismo es independiente de energía (Tabla 6).

Tomados en conjunto todos los resultados nos permite afirmar que el lipopolisacárido de Pseudomonas aeruginosa, específicamente en el antígeno "O", participa en la adhesión de esta bacteria a células bucoepiteliales humanas. Así, es probable que existan dos componentes superficiales, además de los pili, que contribuyen a aumentar la adhesión de P.aeruginosa a células bucoepiteliales humanas: uno dependiente de energía y otro independiente. Alteraciones en cualquiera de ellos afectan al receptor para FIZ15.

La energía requerida para incrementar la adhesión pudiera ser utilizada para:

- a) Síntesis de novo de una nueva adhesina
- b) Transporte activo de cationes que favorezcan la adhesión (probablemente potasio).
- c) Incremento de la movilidad flagelar que favorecería el que las bacterias se dirigieran a las células epiteliales.

De estas posibilidades, la segunda ser la más acertada ya que en nuestro laboratorio se ha demostrado que el potasio favorece significativamente la adhesión de las cepas PA01, PIZ15 y PA01/15, en tanto que ni el sodio ni el fosfato tienen efecto (1). Queda por aclarar de qué modo el potasio participe en la adhesión de F.aeruginosa a células bucoepiteliales humanas.

10. BIBLIOGRAFIA

- 1 Arguñello, R.F. "Efecto tónico en la adhesión de Pseudomonas aeruginosa a células bucoepiteliales humanas. (Tesis de Licenciatura E.N.E.P.I.UNAM). Manuscrito en preparación.
- 2 Barksdale, L., and S.B. Arden. (1974). Persisting Bacteriophage Infections, Lisogeny, and Phage Conversions. Ann. Rev. Microbiol. 28:265-299.
- 3 Beachey, H.E. (1981). Bacterial adherence: Adhesin - Receptor Interactions Mediating The Attachment of Bacteria to Mucosal-Surfaces. J. Infect. Dis. 143:325-343.
- 4 Bodey, G.B. (1983). Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa Rev. Infect. Dis. 5:270-313.
- 5 Callahan, L.T. III (1974). Purification and Characterization of Pseudomonas aeruginosa exotoxin. Infect. Immun. 9:113-118.
- 6 Carlson, D.M. & L.W. Mathews. (1966). Polyuronic acids produced by Pseudomonas aeruginosa. Antonie Van Leeuwenhoek. 52: 319-324.
- 7 Cervantes-Vega, C., J. Chávez., N.A. Cordova., P. Mora & J.A. (1986). Resistance to metals by Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Microbios. 48:159-163.
- 8 Coleman, K., G. Dougan & J.P. Arbuthnott. (1983). Cloning and Expression in Escherichia coli K12 of the Chromosomal Hemolysin (Phospholipase C) Determinant of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 153:909-915.
- 9 Costerton, J.W. (1979). Pseudomonas aeruginosa in Nature and Disease. In: Pseudomonas aeruginosa the Organism Diseases It Causes and Their Treatment. Sabath, L.D. (eds.). Hans Huber Publishers Bern Stuttgart, Viena. pp15-25.
- 10 Cruz, H.A. (1988). "Resistencia al efecto bactericida del suero humano normal en Pseudomonas aeruginosa, mediada por conversión lisogénica". (Tesis licenciatura en Biología. E.N.E.P.I.UNAM) 50 pp.
- 11 Dimitracopoulos, G., and Bartell, P.F. (1979). Phage Related Surface Modifications of Pseudomonas aeruginosa; effect on the Biological Activity of Viable Cells. Infect. Immun. 23:87-93.
- 12 Escobar, H.J. (1987). "Estudio de la contribución de plásmidos y bacteriófagos de cepas clínicas de Pseudomonas aeruginosa a su patogenicidad. (Tesis licenciatura en

Biologia.E.N.E.P.I.UNAM.)

- 13 Gilardi, G. L.(1979). Medical microbiology. In: Pseudomonas aeruginosa.Sabath,L.D.(ed.)Hans Huber Publishers.pp 25-27.
- 14 Gibbons,R.J., and J. Van Houte.(1980).Bacterial adherence and the Formation of Dental Plaques.In:Beachey,E.H.(ed.).Bacterial Adherence.Chapman and Hall,London.Methen,New York.pp 60-104.
- 15 Holloway ,B.W.,and Krishanapillai,V.(1975).Bacteriophages and Bacteriocins.In:Genetics and Biochemistry of Pseudomonas .Clarke,P.H.&M.H.Richmond (eds.)Wiley. New York pp.133-161.
- 16 Johanson,V.G.Jr and D.E. Woods,(1979).Association of Respiratory Tract Colonization With Adherence of Gram-Negative Bacilli to epithelial cells.J.Infect.Dis.139:667-673
- 17 Kawaharajo,K.J.Y.Homma,Y.(1975).In vivo Studies on Protease and Elastase From Pseudomonas aeruginosa.Jpn.J.Exp.Med.45: 89-100.
- 18 Kuzio,J.,and Kropinski,A.M.(1981)."O" Antigen Conversion in Pseudomonas aeruginosa PAO 1 by Bacteriophage D3.J.Bacteriol.155:203-212.
- 19 Luria,S.,et al.(1977).General Virology.3er.Ed.John Willer & Sons.Nueva York.EEUU.577 pp.
- 20 Luzar,M.A., y T.C., Montie.(1985)."A virulence and altered physiological properties of cistic fibrosis strains of Pseudomonas aeruginosa."Infect.and Immun.50:572-576.
- 21 Martinez,G.S.López;S.Vaca & C.Cervantes,(1984).Aislamiento de bacteriófagos de cepas clínicas de Pseudomonas aeruginosa.IV Coloquio de Investigación.E.N.E.P.Iztacala.UNAM.26-30 Nov.
- 22 Mathews,C.(1977)." Reproductions of large virulent bacteriophages."In Comprehensive Virology.3:179-294.
- 23 Moll,A.,P.A.Manning y K.N.Timmis.(1980)."Plasmid determined resistance to serum bactericidal activity, a Major outer membrane protein the, that T gene product, is responsible for plasmid specified serum resistance in Escherichia coli".Infect and Immun.28:359-367.
- 24 Ogata,R.T.y R.P.Levine.(1980)."Characteritration of complement resistance in Escherichia coli conferred by the antibiotic resistance plasmid R 100".J.of Immun.125:1494-1498.
- 25 Pavlovskis,C.R. and Shakelford.(1974).Pseudomonas aeruginosa Exotoxin in Mice: Localization and Effect on Protein

Syntesis.Infect.Immun.9:540-546.

- 26 Pollack,M., Taylor,M.S., and Callahan,L.T.(1977).Exotoxin Production by Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa.Infect.Immun.15:776-780.
- 27 Pollack,M(1984).The Virulence of Pseudomonas aeruginosa. Rev.Infect.Dis.6:617-626.
- 28 Pruitt,E.A.(1979). Infections of Burns and Other Wounds Caused by Pseudomonas aeruginosa. In: Pseudomonas aeruginosa. The organism, Diseases, it Causes and Their Treatment. Sabath, L. D.(ed.) Hans Huber Publishers, Ben. Stuttgart Vienna.pp 55-71.
- 29 Ramphal,R.&G.B.Pier.(1985).Role of Pseudomonas aeruginosa mucoid exopolisaccharide in adherence to tracheal cells.Infec.Immun.47:1-4.
- 30 Reynard, A.M. y M.E.Beck.(1976)."Plasmid mediated resistance to the bactericidal effects of the rabbit serum".Infect.and Immun 14:848-850.
- 31 Reynard,A.M;M.E.Beck y R.K. Cunningham.(1978)."Effects of antibiotic resistance plasmid on the bactericidal activity of normal rabbit serum".Infect. and Immun.19:861-865.
- 32 Scharman, W.(1976). Formation and Isolation of Leucocidin from Pseudomonas aeruginosa.J.Microbiol.93:303-308.
- 33 Scharman,W.and Postendorfur.(1979).The Citotoxic Action of Leucocidine from Pseudomonas aeruginosa. J.Gen.Microbiol. 93:283-291.
- 34 Schultz,D.R.,and Miller,K.D.(1974).Elastase of Pseudomonas aeruginosa: Inactivation of Complement and Complement Derived Chemotactic and Phagocytic Factors.Infect.Immun 10:128-135.
- 35 Sensakovic,J.W. and P.F.Bartell.(1974).The Smile of Pseudomonas aeruginosa:Biological Characterization and Possible Role in experimental Infection.J.Infect.Dis.129:101-109
- 36 Stanier,V.R.,Adelberg,A.E.,Ingraham,L.J.(1984).Microbiologia Ed.Reverte.Barcelona,España.,pp 570-578.
- 37 Stent, S.G. y R.Calendar.(1978).Molecular Genetics, ans introductory narrative.2a ed.W.H.Freeman and Company.
- 38 Sparling,P.F.(1983).Bacterial virulence and pathogenesis an overview.Trev.Infect.Dis.5:637-646.

- 39 Vaca, P.S., G. Oliver, G. Martinez y D. Arenas (1986). Modificación de Propiedades de Virulencia de Pseudomonas aeruginosa Inducida por el fago FIZ15. XVII Congreso Nacional de Microbiología. Puebla, Pue. Del 27 al 30 de Abril. Pag 1.
- 40 Vaca, P.S., Martinez, H.G., Cruz, H.A., Escobar, H.J. (1988). Decreased sensitivity to phagocytosis and serum bactericidal effect induced by FIZ15 bacteriophage in Pseudomonas aeruginosa. Rev. Lat. Microbiol. 30(4): (en prensa).
- 41 Woods, D.E., D.C. Straus. (1980). Role of pili in adherence of Pseudomonas aeruginosa to Mammalian Buccal Epithelial Cells. Infect. Immun. 29:1146-1151.
- 42 Woods, D.E., Straus, D.C., Johnson, W.G. Jr., and Bass J.A. (1981). Role of Salivary Protease Activity in Adherence of Gram-negative Bacilli to Mammalian Buccal Epithelial Cells In vivo. J. Clin. Invest. 68:1435-1440.
- 43 Woods, D.E., and Straus, D.C. (1981). Role of Fibronectin in the Prevention of Adherence of Pseudomonas aeruginosa to Buccal Cells. J. Infect. Dis. 143:784-790.
- 44 Woods, D.E., D.C. Straus, W.G. Johanson. Jr. (1983). Factors Influence The Adherence of Pseudomonas aeruginosa to Mammalian Buccal Epithelial Cells. Rev. Infect. Dis. 5: 846-851.
- 45 Zierdt, C.H., and Williams, R.L. (1975). Serotyping of Pseudomonas aeruginosa isolated from Patients With Cystic Fibrosis of the Pancreas. J. Clin. Microbiol. 1: 521-526.