

11271



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO ¹ *Ley*

Facultad de Medicina
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ANTICUERPOS CONTRA PROTEASAS DE Pseudomonas
aeruginosa EN PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

T E S I S

Para obtener el Grado de

ESPECIALIDAD EN CIENCIAS BIOMEDICAS

(Rama Terminal Bacteriología)

p r e s e n t a

MARIA LUISA MIRANDA ROJAS

México, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	32
SUMMARY.....	34
CUADROS, TABLAS y FIGURAS.....	36
BIBLIOGRAFIA.....	52

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa, es un microorganismo con un amplio potencial enzimático, productor de toxinas y exopolisacáridos de superficie. Estos componentes están involucrados en los mecanismos de patogenicidad de la bacteria, particularmente en pacientes inmunocomprometidos, como es el enfermo con fibrosis quística. Diferentes autores han referido la Acción de inmunoglobulinas hacia productos extracelulares de P. aeruginosa como un mecanismo importante de defensa contra éste agente colonizante. El objetivo de éste trabajo fue identificar anticuerpos antiproteasas con actividades específicas para las proteasas de P. aeruginosa asociada a complicaciones de la fibrosis quística. La metodología empleada permitió el aislamiento de la bacteria a partir de, expectoración de pacientes con fibrosis quística y la identificación se hizo con base en la morfología colonial, pruebas bioquímicas y producción de proteasas. Se obtuvieron las proteasas a partir de la cristalización mediante el criterio de Morihara y la posterior separación por cromatografía de intercambio iónico.

Se estudiaron 6 cepas de P. aeruginosa seleccionadas al azar, las cuales fueron procesadas en conjunto con la copa testigo, para determinar y aislar el material con actividad proteolítica, por la técnica antes mencionada. Dos de las cepas estudiadas presentaron alta actividad para la elastasa o proteasa semialcalina. Todas las cepas presentaron actividad en agar leche descremada y agar elastina. La proteasa, obtenida a partir de las cepas mejores

productoras de la enzima, fue utilizada como antígeno para la técnica de ELISA, la cual se utilizó para la determinación de anticuerpos antiproteasa en suero de 24 pacientes con fibrosis quística. Los resultados revelados con un conjugado anti IgG humana acoplado a peroxidasa, mostraron que de los sueros de pacientes con fibrosis quística el 45.83 % tuvo reacción positiva a una dilución de 1:1000, 25 % a una dilución de 1:100, 20.83 % a una dilución de 1:10 y un 8.34 % resultó negativo. De los testigos negativos, sólo el 4 % reaccionó a una dilución de 1:10.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis quística más que una enfermedad, es un síndrome y se conoce como "la gran simuladora" por sus variadas formas de presentación. La literatura popular medieval de Alemania, describe una relación entre la piel con sabor a sal y la muerte precoz de niños. La descripción del síndrome fue realizada por primera vez en el año 1936, por Fanconi, quien publicó que la insuficiencia pancreática exócrina, en la infancia precoz, estaba asociada a graves síntomas del tracto digestivo y respiratorio. Dos años después Dorothy Andersen describió el síndrome como una entidad separada y lo denominó fibrosis quística del páncreas. Faber, en 1944, observó una viscosidad de las secreciones en los conductos glandulares y en los acinos de muchos órganos, tales como el tubo digestivo, sistema biliar y sistema respiratorio. Un año después le dió el nombre de mucoviscidosis (6, 7, 37).

La fibrosis quística es una enfermedad sistémica hereditaria que involucra las glándulas exócrinas del organismo, principalmente el páncreas, tubo digestivo y aparato respiratorio, aunque también afecta glándulas salivales y sudoríparas; promoviendo la producción de secreciones viscosas anormales que pueden conducir a numerosas complicaciones como neumopatías crónicas, insuficiencia pancreática, elevación de electrolitos en sudor y ocasionalmente cirrosis hepática (8-10,37) .

La fibrosis quística fue considerada inicialmente como una enfermedad de mortalidad pediátrica, sin embargo, en la actualidad, se ha observado que aumenta el número de pacientes que

sobreviven y son diagnosticados en edad adulta (2-5, 19, 37).

La incidencia de ésta patología en los Estados Unidos de Norte América se ha estimado en 1:2000 recién nacidos vivos de la raza caucásica, mientras que en la raza negra americana, la incidencia es menor [Tabla 1] (6, 11, 14, 15, 37).

Hasta hace unos años se creía que en México esta enfermedad era rara pero actualmente, existe en el país una sociedad llamada Asociación de Fibrosis Quística que en colaboración con centros hospitalarios como el Instituto Nacional de Pediatría y el Hospital Infantil de México, proporcionan nuevos datos sobre el padecimiento (16- 19). En el Instituto Nacional de Pediatría, durante 10 años, se realizaron 3200 autopsias pediátricas, de las cuales, se reportó 0.98 % de mucoviscidosis (2, 16).

La falta de conocimiento, la patología interrecurrente y las condiciones socioeconómicas, así como la temprana mortalidad de los niños afectados, son probablemente las razones de su escasa identificación en latinoamérica (17, 18, 20). No hay predominio de sexo, afecta por igual a hombres y mujeres. La edad es variable y sus manifestaciones pueden ser antes o desde el nacimiento, durante el primer año de edad o presentarse en edades posteriores.

La fibrosis quística es transmitida en forma autosómica recesiva. Se desconoce la ubicación cromosómica exacta del gen afectado y sólo se sabe que los cromosomas son morfológicamente normales (21-28,37). Desafortunadamente el gen anormal de la fibrosis

quística es muy estable y es poco probable que desaparezca del cromosoma, permaneciendo como una amenaza de generación en generación (6).

Los pacientes heterocigóticos o portadores del gen afectado son asintomáticos, aunque señalan anomalías químicas en sus líquidos corporales (7, 8, 28).

La composición química de las secreciones de las glándulas es anormal. Las secreciones son espesas y obstruyen los conductos de diversos órganos, llevando en la mayor parte de los casos a enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia pancreática, con menor frecuencia cirrosis hepática, obstrucción intestinales, alteración a nivel de senos paranasales, cuello uterino y quizás del aparato genital masculino. La excesiva viscosidad de las secreciones es posiblemente la causa de estos eventos obstructivos, atribuyéndose en forma secundaria a la escases de líquido que lleva a una alteración en la concentración de electrolitos, la presencia de constituyentes orgánicos anormales y alteraciones en el control autónomo del proceso secretorio (9, 29, 30, 33, 36, 47).

La fibrosis quística puede empezar temprano en la vida fetal, con una gestación de duración normal y un peso promedio al nacimiento ligeramente disminuido (21, 22).

En general la enfermedad no se manifiesta antes del nacimiento, aunque en casos donde hay procesos patológicos como íleo meconial,

vólvulos y atresia intestinal, el feto continua su vida intrauterina normalmente. Por lo que la fibrosis quística es una enfermedad de la vida posnatal, sin embargo algunos cambios patológicos y manifestaciones pueden estar presentes desde el nacimiento y llevar incluso a la muerte, como lo señalamos anteriormente (37).

La fibrosis quística es una condición compleja que resulta en anormalidades a nivel pancreático, gastrointestinal, hepático, respiratorio y genital. Se manifiesta en diferentes edades y grados. La triada de la insuficiencia pancreática, enfermedad pulmonar obstructiva y pruebas del sudor positivo, han sido bien reconocidos, como elementos diagnósticos para ésta enfermedad (16, 18, 28-32, 37).

La afección pancreática radica en la obstrucción del drenaje de las enzimas pancreáticas hacia el duodeno, lo que dificulta la digestión y absorción de proteínas, vitaminas y lípidos, dando lugar a una distensión abdominal y flatulencia, acompañada de evacuaciones abundantes, fétidas, grasosas y espumosas (37, 38, 47, 48). El paciente a pesar del aporte adecuado de calorías, presenta desnutrición y retraso en el crecimiento; asimismo, una deficiencia en la absorción de vitaminas liposolubles, con los correspondientes síntomas carenciales para cada una de ellas (34, 35, 37).

Los problemas gastrointestinales varían de leves a severos. La manifestación temprana es el íleo meconial y la tardía la

obstrucción intestinal. El íleo meconial ocurre en 7 y 25 % de recién nacidos con fibrosis quística, siendo la causa de obstrucción más frecuente en éstos. Esta lesión obstructiva generalmente se presenta a nivel de las válvulas íleo-cecal y es producida por el espesamiento del meconio. La sospecha de íleo meconial se establece entre las 24 y 48 h de vida, cuando el paciente presenta distensión abdominal, vómito y ausencia de deposiciones (28, 37-39).

La enfermedad pulmonar asociada a fibrosis quística fue reconocida desde 1938, cuando se habló por primera vez de su naturaleza obstructiva (30-33, 40, 42, 43). Si bien los pulmones son normales en el recién nacido, la lesión se torna severa y progresiva en el periodo posnatal; siendo el defecto más temprano la elaboración de moco viscoso que lleva la obstrucción total o parcial de bronquiolos. El curso de la enfermedad pulmonar es variable, dependiendo del tratamiento. Algunos pacientes sólo presentan tos o tienen un curso asintomático, mientras que otros, llegan a desarrollar enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Así, la enfermedad pulmonar aparece semanas, meses o años después del nacimiento (16, 34, 44, 45, 73, 80). El síntoma más prominente y constante que sugiere el compromiso pulmonar es la tos, que al principio es seca, pero a medida que se presentan infecciones respiratorias recurrentes, la tos se hace productiva, crónica y paroxística semejante a inducida por Bordetella pertussis (38, 73, 74).

La mucosa pulmonar de estos pacientes se coloniza fácilmente con microorganismos oportunistas. Hace algunos años, el microorganismo más aislado era Staphylococcus aureus, seguido de P. aeruginosa, Haemophilus influenzae, Proteus sp., Escherichia coli, Candida sp. sin embargo, últimamente P. aeruginosa ha sido reportado con más frecuencia que S. aureus, quizás debido al incremento en su resistencia a antimicrobianos (38, 44, 46, 73, 74, 113).

En pacientes con fibrosis quística Pseudomonas aeruginosa, es el microorganismo más asociado a complicaciones y a la mortalidad; aunque se cuestiona su papel en el daño pulmonar que se presenta, ya que, en algunos casos es un contaminante transitorio. Este microorganismo tiene la capacidad de desarrollarse en diferentes ambientes y la temperatura corporal le permite un fácil crecimiento y forma microcolonias, cuya característica fundamental en pacientes con fibrosis quística es su consistencia altamente mucóide, lo cual dificulta la limpieza de vías respiratorias e incrementa la viscosidad de las secreciones bronquiales. Bajo estas condiciones el microorganismo, puede elaborar una serie de productos entre los cuales algunos manifiestan un efecto ciliotóxico, que interfiere aún más con la limpieza de esta zona. También se ha demostrado la participación de toxinas y exoenzimas con actividad proteolítica, como importantes factores de daño en el paciente (64, 73, 74, 80, 113).

El género Pseudomonas pertenece a la familia Pseudomonadaceae, cuyas características son: bacilos gramnegativos, móviles con flagelos polares, aeróbios estrictos, no presentan metabolismo

fermentativo, utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones y bajo ciertas circunstancias crecen en anaerobiosis en presencia de nitrato y arginina, los cuales son utilizados como aceptor final de electrones. Son quimioorganotróficos y capaces de usar un compuesto orgánico con un solo carbono como fuente de energía. Son catalasa y oxidasa positivos y presentan una relación G-C del DNA de 58-71 %. Pseudomonas no son exigentes en cuanto a su requerimiento nutricional, crecen en temperaturas de 4 hasta 43 °C con un pH óptimo de 7.0 a 8.5 en una variedad de medios, algunas especies producen ácidos a partir de la oxidación de alcoholes y aldosas, especialmente si se encuentran en concentraciones altas, pueden acumular poli β -hidroxibutirato como reserva intracelular, bajo condiciones de privación de nitrógeno (53, 58, 59).

La pigmentación de algunas especies de Pseudomonas es muy característica y se han usado medios especiales para evidenciar o incrementar la producción de pigmentos. Entre los pigmentos tenemos: la pteridina que es hidrosoluble, fluorescente, pudiendo observarse en una gran variedad de medios de cultivo, pero particularmente aquellos con bajo contenido de hierro; la fenacina conocida como piocianina, que es de color azul, amarillo ó verde, se sintetiza por la vía de los aminoácidos aromáticos; finalmente los pigmentos carotenoides, pueden ser producidos en 4 especies bien definidas, a saber: P. vesicularis, P. mendocina, P. flava y P. palleroni (59).

La especie más importante desde el punto de vista clínico es

P. aeruginosa. La pared celular de P. aeruginosa está formado por

diferentes capas que son: la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico, la capa de mucopéptido y membrana externa.

La membrana citoplasmática está compuesta de una bicapa de fosfolípidos y proteínas. El fosfolípido más abundante es la fosfatidil-etanolamina y la función de la membrana citoplasmática es la del transporte activo, fosforilación oxidativa, síntesis de pequeños polímeros de aminoácidos, replicación del DNA, así como llevar a cabo un gran número de reacciones enzimáticas (54, 57).

En el espacio periplásmico se encuentra una variedad de enzimas, como las degradativas, por ejemplo la beta-lactamasa, acetilasa, adenilasa y fosforilasas que son producidas en la membrana citoplasmática. El espacio periplásmico contiene además un número variable de proteínas de unión, asociadas con el transporte de aminoácidos y otros nutrimentos (54, 56).

El mucopéptido está constituido por 2 azúcares aminados, el N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico que se encuentran unidos por enlaces β 1-4. La dureza y rigidez de éste peptidoglicano se debe en parte a los enlaces glucosídicos. La pared celular da a la bacteria, forma y rigidez mecánica, ya que su pérdida, causa formación de esferoplastos el cual presenta inestabilidad osmótica (53, 54, 55).

La membrana externa está constituida por fosfolípidos, proteínas y un lipopolisacárido de mayor densidad que el resto de los componentes de dicha membrana. Contiene dos componentes proteicos

mayores, uno designado como proteína A y el otro como proteína B, los cuales funcionan como enzimas en la síntesis del lipopolisacárido (54).

La capa más externa, también conocida como glicocálix o falsa cápsula, esta constituida de lipopolisacáridos, cuya función es adherirse a las células eucarióticas o de bacterias, estas uniones, pueden establecerse por la atracción de glicoproteínas de tipo de lectinas, así como por cationes divalentes que existen en el medio ambiente. El glicocálix posee las características de un factor de virulencia, actúa como un antígeno protector, resiste a la fagocitosis por macrófagos y polimorfonucleares y tiene actividad tóxica sobre leucocitos y macrófagos. P.aeruginosa produce también un exopolisacárido mucosoide (MEP) llamado alginato, por su similitud química con el ácido alginico que es producido por las variedades mucosoides. Este exopolisacárido interviene en la adherencia de la bacteria a las células traqueales, uniéndose a la mucina, producida en abundancia en pacientes con fibrosis quística (70, 76, 90, 105, 108, 109, 116).

P.aeruginosa es un microorganismo con un amplio potencial enzimático, productor de toxinas y exopolisacáridos de superficie, cuya participación en la patogenicidad de la bacteria ha sido ampliamente fundamentada. Entre sus factores de virulencia se encuentran productos extracelulares como: hemolisinas, lecitinasa, toxina letal A, exoencima S, elastasa, gelatinasa, lipasa, DNasa, coagulasa, fibrinolisisina y otras proteasas. Además presenta una endotoxina que parece ser poco relevante en la patogenia de este

microorganismo. De estos componentes las enzimas proteolíticas se destacan por su importancia (61, 63-67, 71, 74, 78, 99).

La producción de enzimas proteolíticas por P.aeruginosa se favorece en medios que contienen glucosa y su actividad aumenta en presencia de ácido láctico, el cual tiende a acumularse en los tejidos infectados o dañados (71, 72, 113).

La bacteria produce tres tipos de proteasas: la proteasa neutra I, la proteasa semialcalina II (elastasa) y la proteasa alcalina III; activas a diferentes pH: pH 6.5 para la fracción I, pH 8.0 para la fracción II y pH 10 para la fracción III (72).

Las cepas elastasa positivas producen dos proteasas que son las fracciones II y III (elastasa y proteasa alcalina). Las cepas elastasa negativas producen una sola proteasa, la alcalina que corresponde a la fracción III. La proteasa neutra es producida tanto por cepas elastasa positivas como elastasa negativas; aunque la actividad de esta proteasa considerada insignificante (113, 114, 124).

La proteasa semialcalina o fracción II difiere de las otras porque posee además actividad elastolítica, pudiendo destruir las fibras elásticas de los vasos sanguíneos, causando hemorragias severas en diferentes partes del organismo, como pleura y diafragma. La proteasa alcalina fracción III, no muestra ninguna actividad elastolítica y es dependiente de calcio y algunos metales pesados (113, 114).

Cuando se inocula a nivel experimental proteasa alcalina y elastasa por vía intraperitoneal, intravenosa, intrapleural e intranasal se observan hemorragias en pleura, diafragma, peritoneo y mucosa del tracto intestinal. En la piel causa lesiones ulcerativas y hemorragias en el tejido subcutáneo y lesiones semejantes a gangrena en asa ligada del intestino. Estas proteasas causan inflamación y atrofia de los plexos de Auerbach y hemorragia en los capilares de submucosas (79, 80, 99). En la córnea, estas enzimas son responsables de la opacidad y formación de úlceras, necrosis y destrucción total (100, 115).

Las proteasas semialcalina y alcalina difieren en su peso molecular 39000 y 48000 respectivamente, especificidad, punto isoelectrico y pH óptimo. Ambas son metal-proteasas, inmunológicamente distintas (68, 75, 77, 82, 83, 84).

Estudios realizados en pacientes con fibrosis quística infectados por P. aeruginosa, muestran que las proteasas contribuyen a la persistencia del microorganismo, alterando el sistema inmunológico del hospedero de varias maneras (94, 96).

- 1.- Actúan rompiendo algunos componentes del complemento como C3, también C1, C5 y C9 (72, 73, 78, 91, 93, 94, 96, 107).
- 2.- Tienen acción sobre las inmunoglobulinas presentes en las secreciones bronquiales como la IgA secretoria y la IgG (73, 78, 96, 105, 111).
- 3.- Interfieren en la acción fagocítica de los polimorfonucleares

por inhibición de la quimiotaxis (62, 78, 94, 125).

Por lo tanto, la actividad de las proteasas, particularmente la semialcalina y la alcalina, constituye, de cierto modo, un indicador de infección. La detección de la respuesta del hospedero frente a la presencia de estas enzimas puede ser usada en el diagnóstico y pronóstico del síndrome de fibrosis quística asociado a P. aeruginosa.

PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La causa más frecuente de complicaciones y de mortalidad en pacientes con fibrosis quística es la infección pulmonar, principalmente, por P. aeruginosa. La cual una vez establecida es difícil de erradicar, a pesar de la terapia administrada (73).

En la actualidad, no existen medidas específicas para detener la severidad y el progreso de la infección en estadios iniciales. La actividad proteolítica de estas bacterias favorece su invasividad, que se puede poner de manifiesto, a través de la detección de la propia bacteria, de sus productos o de inmunoglobulinas específicas contra éstos elementos (69, 71, 72, 74, 80, 84, 123).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La determinación de anticuerpos antiproteasa en pacientes con fibrosis quística, permite el diagnóstico más certero de una patología por P. aeruginosa asociado a esta enfermedad.

OBJETIVOS

1.- GENERALES

Determinar anticuerpos antiproteasa en pacientes con fibrosis quística.

2.- PARTICULARES

- 2.1. Aislar e identificar P. aeruginosa a partir de expectoración, obtenida de pacientes con fibrosis quística.
- 2.2. Determinar la producción de exoenzimas por cepas de P. aeruginosa aisladas de expectoración.
- 2.3. Cristalizar y purificar la proteasa de P. aeruginosa para utilizarla como antígeno.
- 2.4. Determinar la presencia de anticuerpos antiproteasa por la técnica de ELISA en sueros de pacientes con fibrosis quística.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1.- INDIVIDUOS ESTUDIADOS

Se trabajó con 19 pacientes con diagnóstico clínico de fibrosis quística, del Instituto Nacional de Pediatría, cuyos datos generales se encuentran en la tabla 2. Veinticinco individuos sanos fungieron como testigos en las diferentes pruebas.

2.- CEPA TESTIGO

Se empleó P. aeruginosa ATCC 27853, perteneciente al cepario del Departamento de Ecología Humana.

3.- MEDIOS DE CULTIVO

a) Medios para transporte.-

Caldo nutritivo (Difco).

Caldo BHI (Difco).

b) Medios para aislamiento.-

Agar Mac Conkey (Merck).

Agar Pseudomonas (Difco).

Agar Mueller Hinton (Merck) complementado con 5 % de sangre de carnero.

Agar leche descremada (Merck).

c) Medios para identificación bioquímica.-

Agar Kliger (Merck).

Medio de citrato de Simmons (BBL).

Medio de nitratos (Difco).

Medio de urea de Christensen (Merck).

Medio de SIM (BBL).

Base oxidación fermentación (O/F) (BBL).

Base descarboxilasa de Moeller (BBL).

Adiciones.-

Carbohidratos: glucosa, maltosa y xilosa (Merck)

L-aminoácidos al 1 % para descarboxilasa base de Moeller:
lisina, ornitina y arginina.

d) Medios para determinar perfil enzimático.-

Medio para determinar la actividad de la desoxiribonucleasa:
agar DNasa (BBL).

Medio para observar la producción de hemolisina: agar base
(Merck), complementado con sangre de carnero al 5%.

Medio para observar la lecitinasa: agar base (Merck), yema de
huevo y solución salina isotónica en proporción de 1:9.

Medio para determinar lipasa: base agar complementado con
tween 80.

Medio para determinar la producción de proteasas: agar leche
descremada (Merck).

Medio de producción de elastasa: agar elastina (Sigma).

Medio para determinación de colagenasa: gelatina nutritiva (Merck).

Medio para la determinación de fibrinolisis: plasma citratado y Ca Cl_2 al 0.25%.

f) Medio semisintético para la producción de la proteasa.-

Glucosa	7 %	Difco
$(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	1 %	J. T. Backer
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	0.5 %	J. T. Backer
Extracto de levadura	2 %	Difco
Ca CO_3	2.5 %	J. T. Backer
$\text{K H}_2\text{PO}_4$	0.2 %	J. T. Backer
Mg SO_4	0.05 %	Merck

MÉTODOS

1.- TOMA DE MUESTRA

De los pacientes con fibrosis quística, se tomaron muestras de esputo en frascos estériles y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento.

2.- AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO

La siembra de los mismos, se realizó en los medios antes referidos, efectuando un estriado con el asa bacteriológica con el fin de lograr el aislamiento adecuado de las colonias.

La incubación se llevó a cabo durante 18 a 24 h a 35-37°C de temperatura.

3.- IDENTIFICACION BIOQUÍMICA

Las colonias lactosa negativas, se sembraron en el medio de Kligler y se incubaron a 37 °C por 24 h. Se seleccionaron aquellas colonias que respondieron negativamente a las pruebas características del Kligler.

Se realizaron otra serie de pruebas bioquímicas como: la prueba del SIM y utilización del citrato; determinación de O/F de la glucosa, maltosa y xilosa; crecimiento en agar SS; crecimiento en BHI a 42°C; producción de L-arginina dehidrolasa, L-lisina

descarboxilasa, L-ornitina descarboxilasa y oxidasa.

4.- DETERMINACIÓN DEL PERFIL ENZIMÁTICO

Las cepas de P. aeruginosa fueron sembradas en 3 ml de caldo nutritivo y se incubaron durante 4-6 h a 37 °C en agitación. Luego se inoculó cada cepa en agar DNasa, el cual fue incubado a 37 °C durante 24 h. Al término de la incubación, se añadieron unas gotas de ácido clorhídrico al 10 % para revelar la presencia de DNasa, la cual se evidenció por la presencia de un halo de decoloración del medio, alrededor de la colonia.

Para la determinación de fibrinolisisina, se emplearon 0.5 ml de plasma citratado, al cual se le añadieron 5 gotas de CaCl₂ al 0.25 %, la mezcla fue incubada por 10 min a 37 °C, para favorecer la formación de coágulo. Una vez formado éste, se añadieron 0.5 ml de un cultivo en BHI o caldo nutritivo de la cepa a estudiar. Después de un período de incubación de 18 h a 37 °C, se observó la destrucción del coágulo.

Para la determinación de lipasa se empleó un medio con el detergente tween 80. El tiempo de incubación para esta prueba fue hasta 72 h a 37 °C. La presencia de la lipasa se observó cuando se presentó una aureola turbia alrededor de la colonia.

La determinación de la capacidad para producir elastasa, se efectuó en agar elastina y el inóculo fue depositado, en pequeños pozos de 4 mm de diámetro. La incubación se efectuó a 37 °C

durante 24 a 72 h. El aclaramiento del medio de cultivo alrededor del pozo indicó la presencia de elastasa.

Para la determinación de la colagenasa, se utilizó gelatina nutritiva. Se inoculó la muestra en 0.5 ml del medio de cultivo y se incubó a 37 °C durante toda la noche, pasando posteriormente el cultivo a la temperatura ambiente durante 5 días. La prueba positiva se determinó por la licuefacción del sustrato.

5.- PRECIPITACIÓN DE LA PROTEASA (113, 114).

Se sembró P. aeruginosa en 100 ml de medio semisintético. Se incubó en agitación 130 rpm durante 4 días a 28 °C . Después de este período se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. Se separó el sobrenadante y se saturó con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a 0.6 gr/ml y se incubó durante toda la noche a una temperatura de 4°C. Se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. Se disolvió el precipitado, en 10 ml de agua destilada. Se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min. Se determinó la actividad proteolítica al precipitado, en agar leche descremada. En seguida se recolectó el sobrenadante y se reprecipitó con $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$. Se incubó toda la noche a 4 °C. Se centrifugó para obtener el precipitado, el cual se disolvió en 10 ml de agua destilada y se añadió acetona al 65 %. Se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min y se disolvió el precipitado con amortiguador de fosfatos pH 7.2. Se dializó, contra el mismo amortiguador. Se determinó proteínas totales por el método de Lowry y cols (88). Por último, se determinó la actividad proteolítica y se realizó cromatografía por intercambio iónico.

6.- CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO (113, 114).

Se preparó una columna de 10 ml x 70 mm de DEAE Sephacel. Se lavó la columna con Na OH y se equilibró con amortiguador de fosfatos pH 8. Se colocó 10 ml de proteína diluida en amortiguador de fosfatos pH 7.2.

La velocidad de elución fue ajustada a 0.1 ml por min y el volúmen de cada fracción colectada fue de 2.5 ml. La elución de la proteína se llevó a cabo sucesivamente :

Amortiguador de fosfatos 0.02 M (pH 8.0) tubos 1-10; que corresponde a la fracción I.

Amortiguador de fosfatos 0.02 M (pH 7.0) tubos 11-20; que corresponde a la fracción I.

NaCl 0.05 M en amortiguador 0.002 M (pH 7.0) tubos 21-30; que corresponde a la fracción II.

NaCl 0.10 M en amortiguador 0.002 M (pH 7.0) tubos 31-40; que corresponde a la fracción II.

NaCl 0.15 M en amortiguador 0.002 M (pH 7.0) tubos 41-50; que corresponde a la fracción II.

NaCl 0.20 M en amortiguador 0.002 M (pH 7.0) tubos 51-60; que corresponde a la fracción III.

NaCl 0.40 M en amortiguador 0.002 M (pH 7.0) tubo 61-70; que corresponde a la fracción III.

Los tubos recolectados fueron leídos en un espectrofotómetro a 280

nm y se graficó las lecturas de densidad óptica (DO). Una vez recolectados las fracciones, se determinó actividad de proteasas de las fracciones en agar leche descremada y agar elastina y posteriormente se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.- PURIFICACIÓN DE LA FRACCIÓN II

La fracción II, fue reprecipitada con sulfato de amonio. Después de centrifugar a 5000 rpm durante 20 min, se recolectó el precipitado y se disolvió en agua destilada. Se añadió al sobrenadante nuevamente sulfato de amonio en saturación, hasta que apareciera ligera turbidez. Se dejó precipitar a temperatura ambiente por 12 h hasta la formación de cristales. Se dializaron los cristales para eliminar el sulfato de amonio y se determinó la actividad proteolítica y elastolítica.

8.- ELISA

Se utilizó el método de ELISA indirecto según Voller y cols (121). Y se emplearon placas de 96 pozos (Nunc) fondo plano, conteniendo por pozo 200 ul de proteasa semialcalina o elastasa, diluida en amortiguador de recubrimiento (carbonato-bicarbonato). Se aplicó a cada pozo 100 ul de cada dilución 1:10, 1:100, 1:1000 del suero problema en amortiguador salino de fosfatos (PBS-TWEEN 20 pH 7.4). Para revelar se utilizó 200 ul del conjugado anti-IgG humana acoplada a peroxidasa, añadiéndose posteriormente 200 ul de la solución de sustrato. Se incubó a temperatura ambiente en la obscuridad durante 90 min. Se detuvo la reacción adicionando 50 ul

de ácido sulfúrico 1 N a cada pozo y se procedió a la lectura visual considerando positividad en los pozos donde se desarrolló color.

RESULTADOS

Se realizaron 19 exudados faríngeos y/o expectoraciones de menores con fibrosis quística, de los cuales se aislaron 9 cepas de P. aeruginosa, además de otros gérmenes (Tabla 3). Las 9 cepas aisladas presentaron colonias mucoides y fueron positivas en las siguientes pruebas: movilidad, oxidasa, crecimiento en agar SS y en BHI a 42 °C, utilización del citrato Simmons, producción de L-arginina dehidrolasa y determinación de la oxidación-fermentación de la glucosa y de la xilosa en tubo abierto.

Las pruebas realizadas en las cepas de P. aeruginosa, para determinar la capacidad de producción "in vitro" de exoenzimas, indicaron que ésta fue muy alta (Tabla 4). De las 9 cepas de P. aeruginosa, se seleccionaron 6 como las mejores productoras de proteasas. A partir de 100 ml de medio semisintético, para cada cepa, se procedió a la purificación parcial de proteasas, probando su actividad proteolítica y elastolítica, en agar leche descremada y agar elastina, respectivamente (Figs. 1 y 2). Se determinó la cantidad de proteínas en las fracciones precipitadas con sulfato de amonio, para cada cepa y los valores se observan en la tabla 5. La cantidad de proteínas en las 6 cepas estudiadas varió de 293 ug/ml para la cepa 1 a 484.9 ug/ml para la cepa 4. Con base en la cantidad de proteínas, se prepararon las cromatografías de intercambio iónico, realizando el perfil de elución de las proteasas y obteniéndose los datos de densidad óptica expresados en las tablas 6 los cuales fueron graficados, permitiendo

Ilustrarse los diferentes perfiles de elución (Figs. 3-8). Tales figuras, correspondientes a las 6 cepas, muestran que la producción, de las diferentes fracciones de proteasas, varió de una cepa a otra. La cepa 1 sólo produjo las fracciones II y III que corresponden a las proteasas semialcalina y alcalina (Fig. 3). La cepa 2 produjo en pequeñas cantidades las 3 proteasas que corresponden a las fracciones I, II y III que son las proteasas neutra, semialcalina y alcalina respectivamente (Fig. 4). La cepa 3 produjo en mayor proporción la fracción I que corresponde a la proteasa neutra y en menor cantidad las fracciones II y III que corresponden a las proteasas semialcalina y alcalina (Fig. 5). Las cepas 4 y 6 fueron las mejores productoras de la fracción II o proteasa semialcalina (Figs. 6 y 8) y finalmente la cepa 5 produjo en pequeñas cantidades las fracciones II y III que son las proteasas semialcalina y alcalina (Fig. 7).

Los tubos correspondientes a las fracciones II de todas las cepas fueron recolectados y la enzima fue recrystalizada con sulfato de amonio hasta la formación de cristales (Figs. 9, 10 A y B). Por último, se determinó "in vitro" la actividad proteolítica y elastolítica de los cristales recién obtenidos. Al utilizar el sustrato de agar leche descremada, se observó en su entorno un "halo" blanquecino, originado por la degradación de la caseína (Fig. 11). De igual modo se observó otro "halo" blanquecino en agar elastina (Fig. 12), por la actividad de la enzima elastasa sobre el sustrato elastina. Una vez obtenida la proteasa parcialmente purificada con actividad proteolítica y elastolítica, ésta sirvió como antígeno para la determinación de la actividad

antiproteasa en suero de pacientes con diagnóstico de fibrosis quística y en suero de individuos sanos que fungieron como testigos en la prueba de ELISA. Los resultados se observan en la figura 13, donde se muestran que el 45.83 % de los sueros tuvo reactividad a una dilución de 1:1000, 25 % a una dilución de 1:100, 20.83 % a una dilución de 1:10 y el 8.34 % resultó negativo. De los testigos negativos, sólo el 4 % reaccionó a una dilución de 1:10.

DISCUSIÓN

La fibrosis quística es considerada como una enfermedad frecuente en menores de edad, es hereditaria y llega a causar la muerte por insuficiencia respiratoria. Los pacientes presentan una historia prolongada de bronquitis purulenta que conduce a la destrucción de bronquiolos, así como otras áreas del aparato respiratorio (34, 44, 73).

Los sujetos con fibrosis quística son susceptibles a adquirir infecciones crónicas por varios microorganismos, en particular por P. aeruginosa, debido a que tienen factores de predisposición que permiten la colonización con las formas mucoides de este organismo (82). Se sabe que las variantes no mucoides preceden a las mucoides, pero que éstas últimas son seleccionadas por los mecanismos de inmunidad del hospedero. Las cepas mucoides son inestables "in vitro", aunque Govan y cols (93) demostraron que en medio de agar citrato-desoxicolato, es posible incrementar su estabilidad (72, 89). En el presente trabajo, del 50 % de pacientes estudiados, se aisló P. aeruginosa a partir de exudado faríngeo y espectoración, como el principal microorganismo asociado a fibrosis quística. Todas las cepas de P. aeruginosa aisladas presentaron predominio de la forma mucóide, observación que corrobora con la literatura (72, 82, 112). La patogenicidad de este microorganismo, está relacionada con la producción de exoenzimas, toxina y exopolisacáridos. Este potencial agresor del que es portador las cepas de Pseudomonas, produce una destrucción progresiva de proteínas estructurales de las células del hospedero

y además capacita al microorganismo a la evasión de los mecanismos de defensa (72, 82, 112). El estudio del perfil enzimático de las cepas aisladas en pacientes con fibrosis quística, demostró que ellas fueron capaces de producir proteasas "in vitro", con un 100 % de actividad sobre la caseína y un 80 % sobre la elastina (Tabla 4). La alta producción de exoenzima con actividad proteolítica (proteasa) y la posibilidad de su obtención "in vitro", nos permitió llevar a cabo su purificación por precipitación en sulfato de amonio y cromatografía de intercambio iónico. De acuerdo a los gradientes de concentración de NaCl, con diferentes molaridades, logramos identificar la presencia de tres tipos de proteasas (Figs. 3-8), referidas por Morihara y otros autores (113, 114) como proteasa neutra, proteasa semialcalina y proteasa alcalina. Tomando en cuenta la antigenicidad de estas sustancias, además de que esta capacidad antigénica ha sido referida y utilizada por otros autores (123, 124, 127), se planteó que el hospedero podría formar niveles de anticuerpo antiproteasa, los cuales serían herramienta útil en el estudio de pacientes con fibrosis quística asociada a Pseudomonas. La determinación de la presencia de estos anticuerpos serían un fuerte apoyo en el diagnóstico y pronóstico de infecciones por P.aeruginosa, en diferentes centros hospitalarios donde la fibrosis quística es observada con frecuencia. La técnica de ELISA fue la metodología utilizada para evidenciar la producción de estos anticuerpo (123). La finalidad de este estudio fue valorar por el método de ELISA la presencia de IgG contra las proteasas P.aeruginosa en procesos pulmonares de pacientes con fibrosis quística; ya que los títulos de anticuerpos antiproteasa varían según el desarrollo del

microorganismo, sea en forma intermitente o continuo, dependiendo del estado clínico del paciente. En otras condiciones se ha visto que pacientes con fibrosis quística, en las cuales, se desarrolla frecuentemente P. aeruginosa, tienen títulos altos de anticuerpos antiproteasa determinados por pruebas de hemaglutinación y precipitación, mientras que en aquellos con desarrollo transitorio o intermitente de Pseudomonas, los títulos de anticuerpos antiproteasa son bajos (84, 123, 127).

El método usado en este estudio muestra un incremento en el título de IgG antiproteasa por encima de los testigos sanos, lo que apoya la utilización y selección del método de ELISA en lugar de las otras técnicas, como herramienta para la búsqueda de anticuerpos antiproteasa y su aplicación al diagnóstico de fibrosis quística asociado a P. aeruginosa. Nuestros resultados con ELISA confirman una alta frecuencia de este síndrome asociado a Pseudomonas en el Instituto Nacional de Pediatría.

CONCLUSIONES

- 1.- Se realizaron 19 exudados faringeos a pacientes con fibrosis quística, de los cuales el 50 % fue positivo a P. aeruginosa.
- 2.- La producción de exoenzimas con actividad proteolítica por P. aeruginosa fue del 77 al 100 % dependiendo del sustrato.
- 3.- La producción total de proteínas con actividad proteolítica, varió de; 293 ug/ml a 484.9 ugr/ml.
- 4.- Por cromatografía de intercambio iónico se determinó el perfil de elución, mostrando variación en la producción de diferentes fracciones de proteasas; neutra, semialcalina y alcalina (I, II, III):
 - a.- La cepa 1 produjo únicamente las fracciones II y III.
 - b.- La cepa 2 produjo las fracciones I, II y III.
 - c.- La cepa 3 produjo en mayor proporción la fracción I con respecto a la II y III.
 - d.- La cepa 4 y 6 fueron los mejores productores de la fracción II
 - e.- La cepa 5 produjo únicamente pequeñas cantidades de fracción II y III.
- 5.- Dependiendo de la cepa empleada será el tipo de fracción y la cantidad de exoenzima que se produzca.
- 6.- Se evidenció por pruebas in vitro la actividad proteolítica.
- 7.- La exoenzima purificada y cristalizada se utilizó como

antígeno para detectar actividad antiproteasa en 24 sueros estudiados por la técnica de ELISA.

8.- El 91 % de los sueros estudiados presentaron actividad antiproteasas.

9.- La dilución con mayor porcentaje de positividad correspondió a 1:1000 (45,3 %).

10.- La dilución con menor reactividad fue 1:10

11.- Tomando en cuenta la alta producción de proteasas, la técnica empleada puede evidenciar la invasividad de P. aeruginosa a nivel orgánico.

SUMMARY

Pseudomonas aeruginosa is a microorganism with a wide enzymatic potential, producer of toxins and surface exopolysaccharides. These components are involved in the pathogenesis of P. aeruginosa, particularly in immunocompromised patients, as those with cystic fibrosis. Different authors have pointed out the action of immunoglobulins toward extracellular products of Pseudomonas as an important mechanism of host defence against this bacteria. The aim of this study was to identify antiprotease antibodies with specific activities for proteases of P. aeruginosa, which is associated with cystic fibrosis complications. The procedure used in this study permitted the isolation of this bacteria from expectoration of patients with cystic fibrosis. Its identification was achieved by colony morphology, biochemical tests and proteases production. Proteases were obtained by cristalization as described by Morihara, and its further separation by ionic exchange chromatography. Six P. aeruginosa strains were randomly selected and processed with a reference strain, to determine and isolate material with proteolytical activity as described above. Two of all strains studied presented a high elastase or somialkaline protease activity. All strains showed hydrolysis when tested in skim milk and elastine agar. The protease, obtained from the best producer strains, was assayed as antigen for the ELISA technique, which was used for antiprotease antibodies determination in 24 sera of patients with cystic fibrosis. Results with cystic

fibrosis patients sera, using anti human IgG peroxidase conjugate, showed, that 45.83 % gave a positive reaction with a 1:1000 dilution, 25 % with a 1:100 dilution and a negative reaction was observed in 8.34 %. Negative control sera presented a 4 % of positivity in a 1:10 dilution.

TABLA 1. INCIDENCIA DE FIBROSIS QUÍSTICA EN LA POBLACIÓN

POBLACIÓN	INCIDENCIA EN RECIÉN NACIDOS
Raza caucásica de E.E.U.U.	1 : 2000
Raza negra americana	1 : 7000
Raza blanca de sud África	1 : 5000-6000
Holandeses en sud África	1 : 620
Italia	1 : 15000
Suecia	1 : 90000

TABLA 2. DATOS GENERALES DE LOS PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA Y TESTIGOS

GRUPO	No.	AISLAMIENTO <u>P.aeruginosa</u>	SEXO
Sanos	25	-	15/10 F/M
Fibrosis quística	19	9	9/10 F/M

TABLA 3. GÉRMENTES AISLADOS DE 19 PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

MICROORGANISMO	#	%
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	9	50.0
<u>Staphylococcus aureus</u>	9	50.0
<u>Candida sp</u>	9	36.8
<u>Streptococcus pneumoniae</u>	5	26.3
<u>Escherichia coli</u>	3	16.0

TABLA 4. PRODUCCIÓN DE EXOENZIMAS POR 9 CEPAS P.aeruginosa AISLADOS DE PACIENTES CON FIBROSIS QUÍSTICA

EXOENZIMAS	#	%
Proteasa	9	100.0
Colagenasa	9	100.0
Lecitinasa	8	100.0
Elastasa	7	77.0
Lipasa	8	88.0
Hemolisina	6	67.0
DNasa	3	34.0

TABLA 5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES POR EL MÉTODO DE LOWRY

CEPA	RESULTADOS
1	293.00 ug/ml
2	386.88 ug/ml
3	367.27 ug/ml
4	484.90 ug/ml
5	337.60 ug/ml

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

LECTURA DE REFERENCIA

Primera		Segunda		Tercera	
1	-0.075 pH 6	1	0.261 pH 6	1	0.636 pH 8
2	-0.039	2	0.050	2	0.482
3	-0.040	3	0.001	3	0.285
4	-0.035	4	0.309	4	0.181
5	-0.030	5	0.000	5	0.074
6	-0.007 pH 7	6	0.005	6	0.054
7	-0.011	7	0.063 pH 7	7	0.050
8	-0.005	8	0.031	8	0.119
9	-0.006	9	0.024	9	0.050
10	-0.010 0.05 N NaCl	10	0.015	10	0.036
11	-0.010	11	0.017	11	0.018
12	-0.002	12	0.000	12	0.037
13	-0.005	13	0.006	13	0.019
14	-0.005 0.10 N NaCl	14	0.000	14	0.000
15	-0.001	15	0.012 0.05 N NaCl	15	0.009
16	0.010	16	0.013	16	0.001
17	0.010	17	0.007	17	0.002
18	0.022 0.15 N NaCl	18	0.012	18	0.013 pH 7
19	0.039	19	0.019	19	0.014
20	0.038	20	0.014	20	0.005
21	0.017	21	0.105	21	0.004
22	0.000 0.20 N NaCl	22	0.047	22	0.040
23	0.009	23	0.047 0.10 N NaCl	23	0.020
24	0.014	24	0.025	24	0.001
25	0.033 0.40 N NaCl	25	0.043	25	0.005 0.05 N NaCl
26	0.042	26	0.036	26	0.004
27	0.051	27	0.040	27	0.010
28	0.040	28	0.001	28	0.192
29	0.230	29	0.055	29	0.019
30	0.130	30	0.057	30	0.030
31	0.010	31	0.071	31	0.035
32	0.015	32	0.070 0.15 N NaCl	32	0.013
33	0.010	33	0.055	33	0.010 0.10 N NaCl
		34	0.054	34	0.010
		35	0.050	35	0.013
		36	0.074	36	0.039
		37	0.073	37	0.022
		38	0.073	38	0.039
		39	0.060	39	0.255
		40	0.067	40	0.016 0.15 N NaCl
		41	0.000 0.20 N NaCl	41	0.142
		42	0.007	42	0.136
		43	0.057	43	0.049
		44	0.004	44	0.030
		45	0.060	45	0.020
		46	0.073	46	0.021 0.20 N NaCl
		47	0.065	47	0.046
		48	0.063	48	0.039
		49	0.049	49	0.004
		50	0.047 0.40 N NaCl	50	0.046
		51	0.046	51	0.025
		52	0.046	52	0.010 0.40 N NaCl
		53	0.071	53	0.010
		54	0.072	54	0.011
		55	0.070	55	0.020
		56	0.056	56	0.020
		57	0.052	57	0.035

TABLA 6 (Continuación).- DATOS DE ELUCIÓN DE LAS PROTEASAS

LECTURA DE DENSIDAD ÓPTICA								
Cuarta			Quinta			Sexta		
1	0.133	pH 6	1	0.010	pH 6	1	0.064	
2	0.099		2	-0.091		2	0.023	
3	0.026		3	-0.007		3	0.020	
4	0.025		4	-0.011		4	0.250	
5	0.023		5	-0.013		5	0.016	
6	0.023		6	-0.020		6	0.014	
7	0.006		7	-0.023		7	0.290	
8	0.004		8	-0.029	pH 7	8	0.028	
9	0.005	pH 7	9	-0.034		9	0.002	
10	0.011		10	-0.028		10	-0.003	
11	0.011		11	-0.031		11	-0.034	
12	0.003		12	-0.026		12	-0.010	
13	0.039		13	-0.033		13	-0.011	
14	0.011		14	-0.026		14	-0.010	
15	0.008		15	-0.210 0.05 N NaCl		15	0.007	
16	0.009		16	-0.037		16	0.009	
17	0.004 0.05 N NaCl		17	-0.210		17	0.009	
18	0.013		18	-0.026		18	0.005	
19	0.003		19	-0.027		19	0.004	
20	0.014		20	-0.024		20	0.000	
21	0.022		21	-0.016		21	-0.005	
22	0.022		22	-0.021 0.10 N NaCl		22	-0.003	
23	0.027		23	-0.017		23	0.002	
24	0.021		24	-0.009		24	0.005	
25	0.036 0.10 N NaCl		25	0.001		25	0.772	
26	0.046		26	0.001		26	0.016	
27	0.044		27	0.023		27	0.012	
28	0.046		28	0.019		28	0.007	
29	0.107		29	0.017 0.15 N NaCl		29	0.016	
30	0.004		30	0.026		30	0.019	
31	0.092		31	0.050		31	0.019	
32	0.002		32	0.000		32	0.008	
33	0.092 0.15 N NaCl		33	0.051		33	0.003	
34	0.104		34	0.037		34	0.006	
35	0.102		35	0.020		35	0.001	
36	0.114		36	0.022 0.20 N NaCl		36	0.063	
37	0.135		37	0.011		37	0.102	
38	0.102		38	0.024		38	0.109	
39	0.083		39	0.020		39	0.157	
40	0.070		40	0.006		40	0.126	
41	0.084 0.20 N NaCl		41	0.035		41	0.082	
42	0.085		42	0.052		42	0.068	
43	0.048		43	0.024 0.40 N NaCl		43	0.106	
44	0.044		44	-0.004		44	0.300	
45	0.052		45	0.001		45	0.060	
46	0.048		46	0.001		46	0.110	
47	0.029		47	-0.003		47	0.106	
48	0.022					48	0.023	
49	0.018 0.40 N NaCl					49	0.049	
50	0.050					50	0.021	
51	0.028					51	0.020	
52	0.051					52	0.040	
53	0.053					53	0.040	
54	0.107							
55	0.087							
56	0.041							

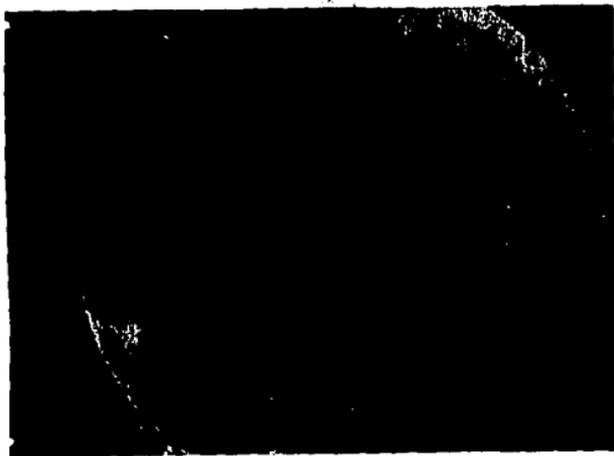


FIG. 1. ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE P.aeruginosa SOBRE LA CASEINA



FIG. 2. ACTIVIDAD ELASTOLITICA DE P.aeruginosa SOBRE LA ELASTINA

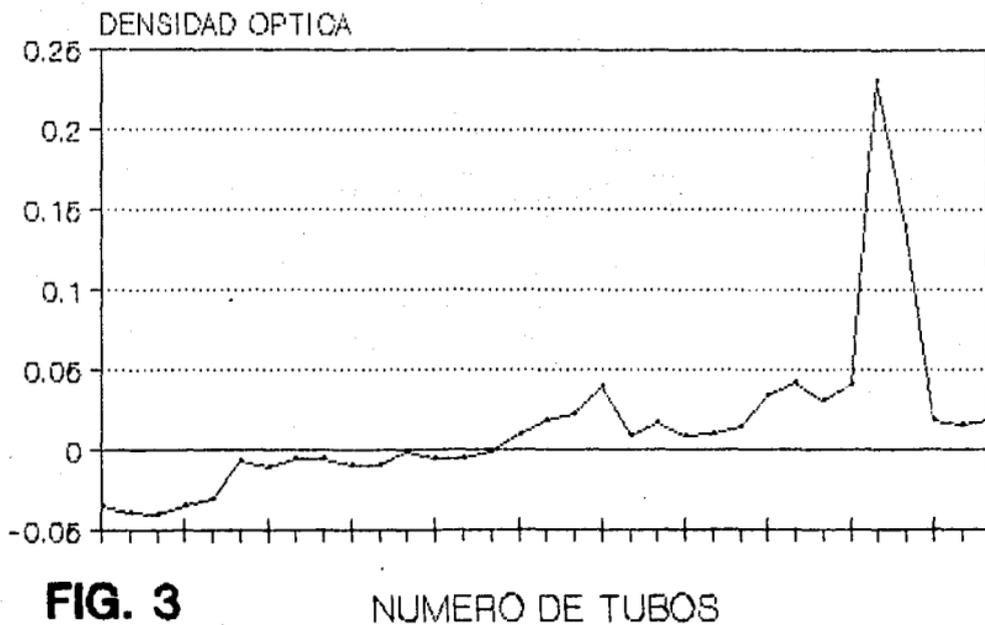


FIG. 3

**PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEASAS POR CROMATOGRAFIA DE
INTERCAMBIO IONICO PARA LA CEPA 1**

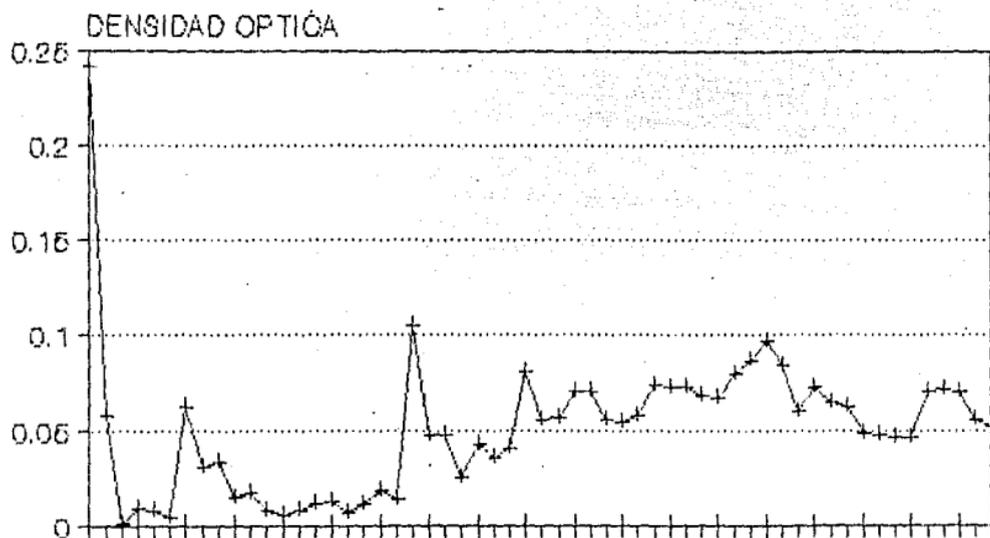


FIG. 4

NUMERO DE TUBOS

PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEASAS POR CROMATOGRAFIA DE
INTERCAMBIO IONICO PARA LA CEPA 2

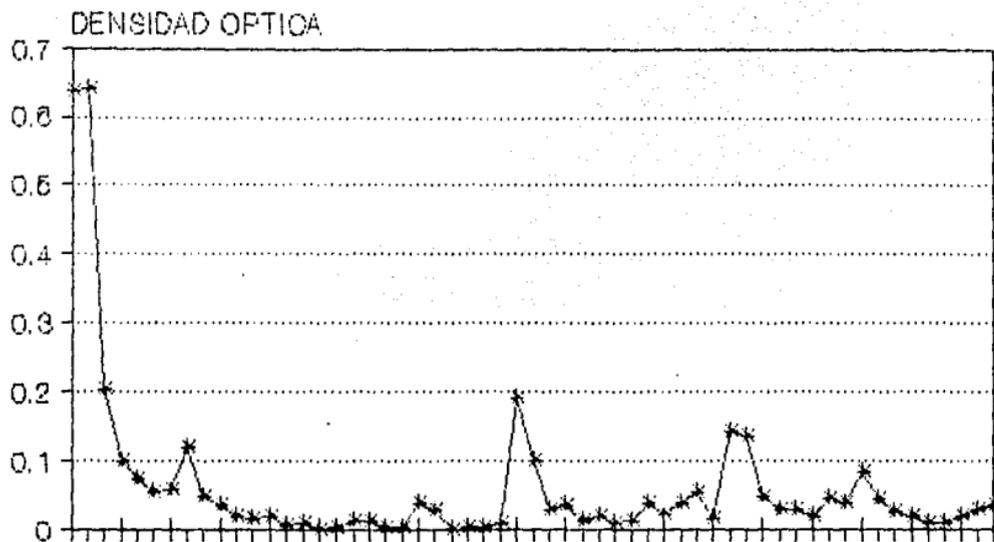


FIG. 5

NUMERO DE TUBOS

PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEASAS POR CROMATOGRAFIA DE
INTERCAMBIO IONICO PARA LA CEFA 3

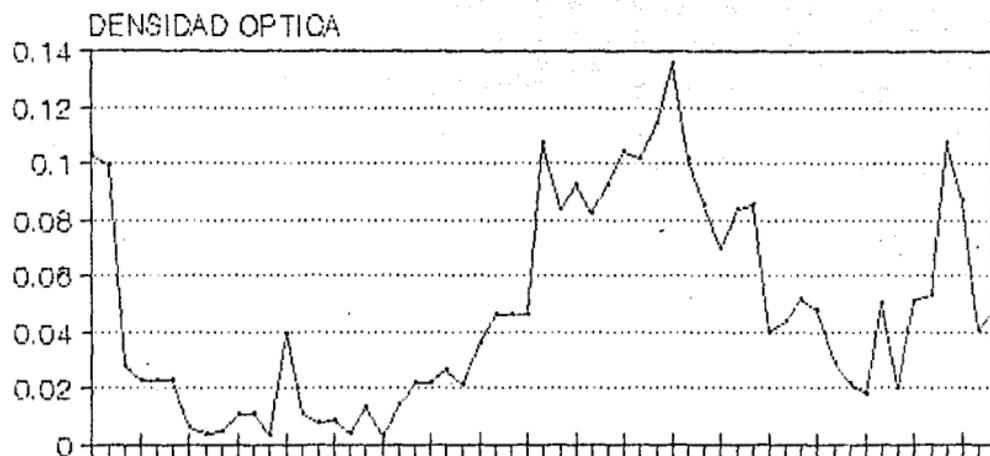


FIG. 6 NUMERO DE TUBOS
PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEASAS POR CROMATOGRAFIA DE
INTERCAMBIO IONICO PARA LA CEFA 4

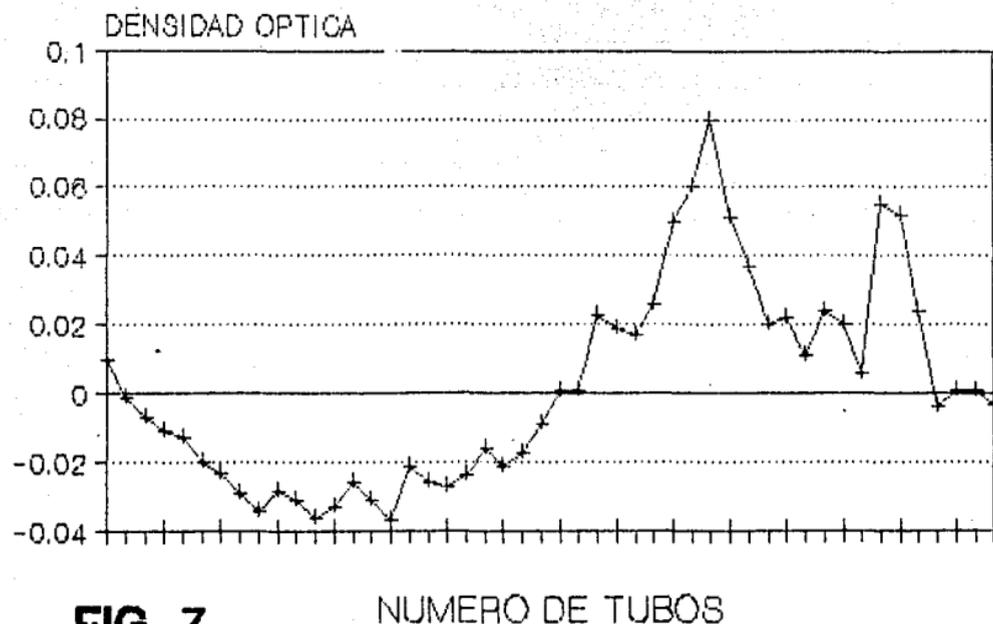


FIG. 7 NUMERO DE TUBOS

PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEASAS POR CROMATOGRAFIA DE

INTERCAMBIO IONICO PARA CEPA 6

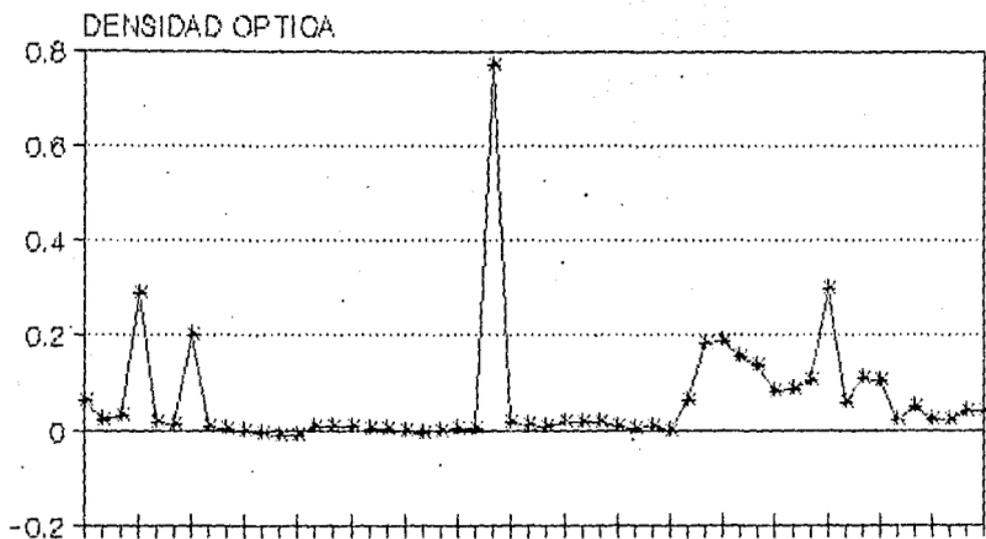
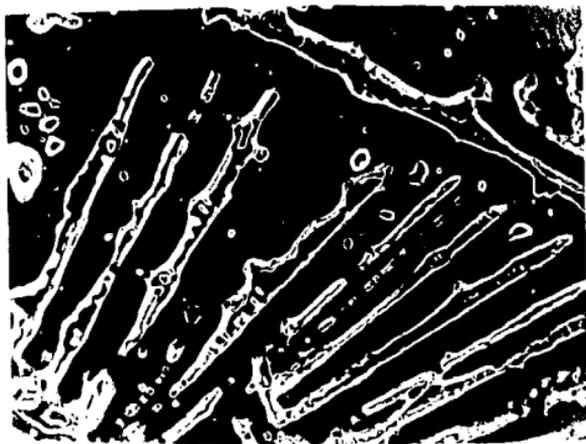


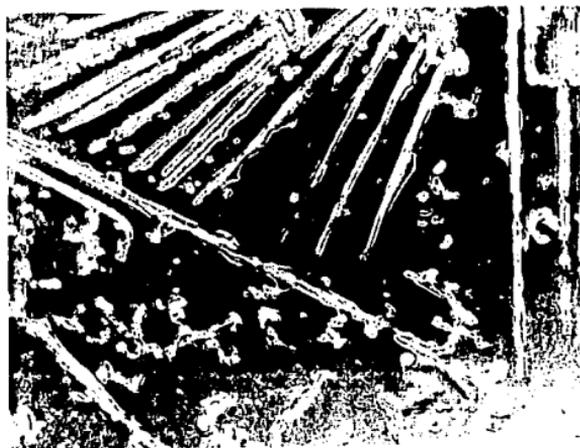
FIG. 8 NUMERO DE TUBOS
PERFIL DE ELUCION DE LAS PROTEASAS POR CROMATOGRAFIA DE
INTERCAMBIO IONICO PARA LA CEPA 6



FIG. 9. FOTOGRAFIA MACROSCÓPICA DE LOS CRISTALES DE LA PRUTEASA
SEMIALCALINA.



A



B

FIG. 10. MICROFOTOGRAFIA DE CRISTALES DE PROTEASA SEMIALCALINA:

A) MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASE AUMENTO 215X.

B) MICROSCOPIO DE POLARIZACION AUMENTO 134X.



FIG. 11. EFECTO " in vitro" DE LOS CRISTALES DE PROTEASA SEMIALCALINA DE P.aeruginosa SOBRE LA CASEINA.

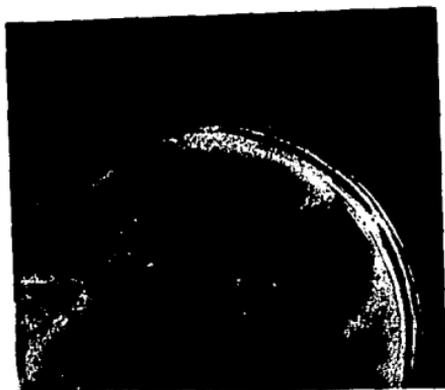


FIG. 12. EFECTO " in vitro " DE LOS CRISTALES DE PROTEASA SEMIALCALINA DE P.aeruginosa SOBRE LA ELASTINA

LECTURA DE ELISA

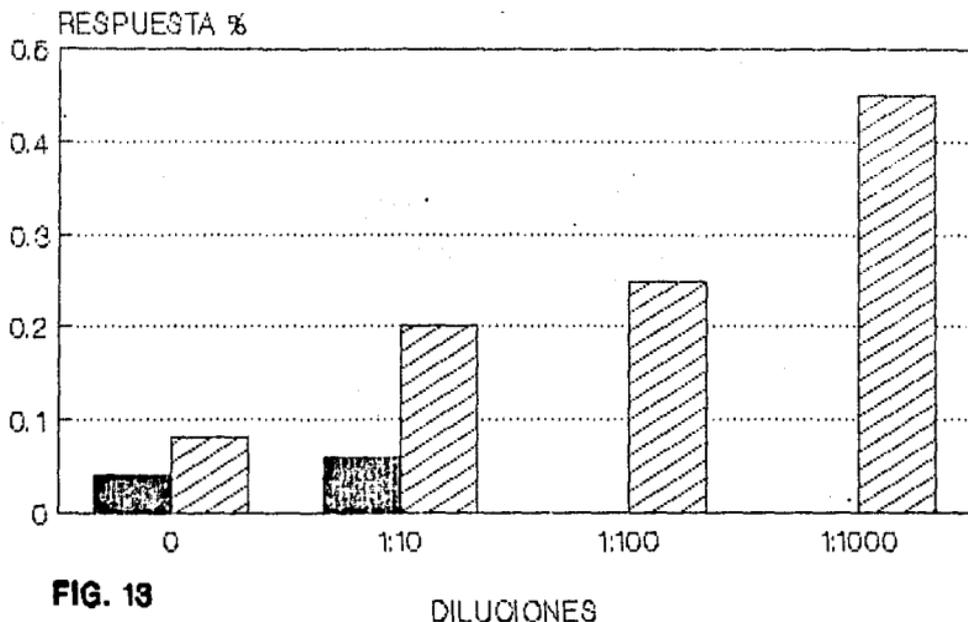


FIG. 13

RESULTADOS DE LA TÉCNICA DE ELISA PARA DETERMINAR ANTICUERPOS ANTIPROTEASA EN SUERO DE PACIENTES CON FIBROSIS QUISTICA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Le Roy W. 1984 . Fibrosis quística enfermedad crónica desafiante a largo plazo. *Clín. Pediát. N. Amer.* 1: 135-153.
- 2.- Cortina W. J. Fibrosis quística (mucoviscidosis) Folleto de la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística.
- 3.- Croizer T. 1978. Fibrosis quística, una enfermedad que no es tan mortal. IN: *Clínica Médica Norteamericana*. 1 Ed. Interamericana México D.F. P.93-95.
- 4.- Matseshe J.W. 1977. Meconium ileus equivalent complicating cystic fibrosis in postneonatal children and young adult; report of 12 cases. *Gastroenterology* 72: 732-735 .
- 5.- Shwachman H. , Kulczycki L.L. and Khaw K.T. 1965. Studies in cystic fibrosis. A report on sixty-five patients over 17 year of age. *Pediatrics* 36:689-699.
- 6.- Nelson W.E., Behrman R.E. and Vaughan III V.C. 1983. Diseases of the respiratory system. In: *Textbook of pediatrics*. 12 th. Ed.; W.B. Saunders Company. Philadelphia, p.1086-1099.
- 7.- Frydman M.I. 1979 . Epidemiology of cystic fibrosis. A Review. *J. Chronic. Dis.* 32: 211-219.
- 8.- Di Sant' Agnese P. A. and Davis P. B. 1976. Research in cystic fibrosis (First of three parts). *N. Engl. J. Med.* 295: 481-485. .

- 9.- Davis P.B. and Di Sant'Agnese P.A. 1984. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis . An Update. Chest 85:802-809.
- 10.- Bechara J. K. 1986. Enfermedades de las vías respiratorias. In. Isaac Subich. Neumología pediátrica. 2a. Ed. Mendez Cervantes. México p.212.
- 11.- Honeyman M.S. and Siker E. 1965. Cystic fibrosis of the pancreas: An estimate of the incidence of cystic fibrosis. Am. J. Hum. Genet. 17: 461-465.
- 12.- Wright S. W. and Morton N. E. 1963. Genetic studies on cystic fibrosis in Hawaii. Am J. Hum. Genet. 20: 157-160.
- 13.- Rojo C. M. 1980. Comisión cubana de fibrosis quística. Registro de pacientes hasta 1977. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx . 37: 803-810.
- 14.- Harris R.L. and Riley H.D. 1968 . Cystic fibrosis in the American Indian. Pediatrics 41: 733-738 .
- 15.- Gerdes J.S. and Murphy S. 1985. Cystic fibrosis in pueblo indian children. Clin. Pediatr. 24: 104-106 .
- 16.- Ramirez J.A., Pedroza A. y Lopez C.E. 1982. Manifestaciones gastrointestinales de fibrosis quística del páncreas en niños. Acta Pediatr. 3:24-32 .
- 17.- Lopez C.E., Sanz R. and Lopez C.G. 1980. Cystic fibrosis in Mexican children: report of 32 cases in 3260 consecutive pediatric autopsies. Patología. 18 : 167-181.
- 18.- Rodríguez S.R., Zapata C.R. y Bolnes D. 1982. Sesión clínicopatológica: Enteritis necrosante y mucoviscidosis. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 39: 221-231.
- 19.- Martín J.P. 1968. Mucoviscidosis y su interés para el pediatra y alergista: Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 25:

673-683.

- 20.- Aristazábal D.G., Leal F.J., Ruiz V.E. y Franco R.G. 1978. Actualización sobre mucoviscidosis. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 35: 65-77.
- 21.- Armendares S., Cortés R. y De la Rosa L. 1974. El componente genético en la mortalidad infantil. Rev. Invest. Clin. 26: 3-18.
- 22.- Symon D.N.K., Russell G., Couzin D.A. and Stewar l. 1984. Cystic fibrosis and chromosomal abnormalities. Lancet 12: 1070.
- 23.- Cystic fibrosis and the new genetics. 1985. Lancet 3: 249-250.
- 24.- Danks D.M., Allan J. and Anderson C.M. 1965. A genetic study of fibrocystic disease of pancreas. Am. Genet. 28: 323-340 .
- 25.- Edward J.H., Jonasson J.A. and Blackwell N.L. 1984. Locus for cystic fibrosis. Lancet 5: 1020 .
- 26.- Smith D.W., Docter J.M., Ferrer P.E. and Frias J.L. 1968. Possible localization of the gene for cystic fibrosis of the pancreas to the short arm of chromosome 5. Lancet 10: 309-310 .
- 27.- Russell N.J. 1989. Mucoid Pseudomonas and the cystic fibrosis lug. Biochen. Soc. Trans. 17:469-471.
- 28.- Silverman A. 1983. Exocrine pancreatic insufficiency. In: Karen Berger. Pediatric clinical gastroentelogy. C.V.Company Mosby 3a. Ed. London p.814-835 .
- 29.- Colon A.R. 1985. Pediatric pathophysiology; exocrine pancreatic insufficiency in cystic fibrosis. 1a. Ed.

- Little Brown. Philadelphia p.244- 247.
- 30.- Cosío I.V. 1980. respiratorio ; Fibrosis quística. 9a. Ed. Mendez Oteo México. p.455-459 .
 - 31.- Vazquez G.V. 1986. Manifestaciones pulmonares de padecimientos genéticos en edad pediátrica. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 42: 8.
 - 32.- Gibson L. E and Cooke R.E. 1959. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. Pediatrics 23:5-45
 - 33.- Kendig E.L. 1980. Transtornos pulmonares de fibrosis quística. Ed. Salvat. México D.F. p. 546- 570.
 - 34.- Wood R.G., Boat T.F. and Doershuk C.G. 1976. Cystic fibrosis. Am. Rev. Respir. Dis. 113: 833-878.
 - 35.- Hugh J.G. 1980. Synopsis of pediatrics.5th. Ed.S.T.: In C.V.Company Mosby. Missouri p. 615-622.
 - 36.- Boucher R.C., Quinton P., Beall R.J. and Mangos J.A.. 1984. Cystic fibrosis linked to chloride ions' inatibility to cross certain cells. J.A.M.A 252:2519-2527.
 - 37.- Matthews M.D. and Drotar D. 1984. Cystic fibrosis a challenging longterm chronic disease. Pediatr.Clin. North. Am. 31: 133-152.
 - 38.- Oppenheimer E.H. and Esterly J.R. 1975. Pathology of cystic fibrosis. Review of the literature and comparison with 146 autopsies cases. Perspect Pediatr. Path. 2: 241-278.
 - 39.- Di Sant'Agnese P.A. and Davis P.B. 1979. Cystic fibrosis in adults. Am. J. Med. 66:121-132.
 - 40.- Coates A.L. 1981. Relationship between the chest radiograph, regional lung function studies, exercise

- tolerance and clinical condition in cystic fibrosis. Arch. Child. 5: 106-111.
- 41.- Marka M.L. 1981. The pathogenesis and treatment of pulmonary infection in patients with fibrosis. J. Pediatr. 98: 173-179.
- 42.- Quiek C. A. 1978. Bronchoscopy and lavage in management of pulmonary complications of cystic fibrosis. Chest 72: 755-758.
- 43.- Shardonofsky F. R. 1986. Crecimiento pulmonar radiológico en niños con enfermedad fibroquística del páncreas. Bol. Méd. Inv. Med. 43: 504-509.
- 44.- Shwachman H. (ed). 1978. Cystic fibrosis: Philadelphia. p. 1233-1244
- 45.- Brock D.J., Barron L., Bedgood D. and Hayward C. 1985. Prospective prenatal diagnosis of cystic fibrosis. Lancet 25: 1175-1178.
- 46.- Graef J.W. and Cone T.E. 1985. Manual of pediatric therapeutics 3th. Ed. Little Brown and company. Boston. p. 271-273.
- 47.- Lowe C.U., May C.D. and Reed S.C. 1969. Fibrosis of the pancreas in infants and children. Am. J. Dis. Child. 78: 349-374.
- 48.- Sturgger F.M. 1984. Structural and developmental abnormalities of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 3: 555-566.
- 49.- Mearns K.W. and Broshear R.E. 1985. Cystic fibrosis. Arch. Dis. Child. 60: 272-277.
- 50.- C'Connr K. W. and Broshear R. E. 1985. Cystic fibrosis, an

- adult perspective. Arch. Intern. Med. 145: 153-154.
- 51.- Readon N.C., Hammona K.B. and Accurso F.J.Z. 1984.
Nutritional deficit exist before 2 month of age in some
infants with cystic fibrosis identified by screening test.
J. Pediatr. 105: 271-274.
- 52.- Littlewood J.M. and Miller M.G. 1984. Survival in cystic
fibrosis. Lancet 6:816.
- 53.- Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginberg H.S. and Wood
B.W. 1984. Tratado de microbiologia ; 3a Ed . Salvat.
Editores S.A México D.F. pp. 808-810.
- 54.- Holloway B.W. Krishnapillai V. and Morgan A. F. 1979.
Chromosomal Genetics of Pseudomonas. Microbiol. Rev 43:
73-102.
- 55.- Sutherland I. 1977. Surface carbohydrates of the
prokaryotic cell. Academic Press. New York. p. 230-242.
- 56.- Bradley D. E.. 1975. The occurrence of pill asso ciated with
a plasmid of the compatibility group. Biochem. Biophys.
Res. Commun. 64: 918- 925.
- 57.- Bailey Scott. (1982). Bacilos gramnegativos no
fermentativos. Diagnóstico microbiológico. 6a. ed.
Panamericana. México pp. 267-281.
- 58.- Krieg. N. R. and Hoit J. G. editores. 1984. Bergey's manual
of sistematic bacteriology, Editores, Williams & Wilkins
co. Baltimore. p. 140-108.
- 59.- Lennette E.H. 1987. Pseudomonas. In Bajlows A., Hausler W.
L., Saldomy H.J. Manual de microbiologia clinica. 4a ed.
Panamericana. Buenos Aires. p. 442-469.
- 60.- Eagon R. G. 1974. Ultrastructure of the cell envelope of

- Pseudomonas aeruginosa: Electron microscopic and chemical observations. J. Infect. Dis. 130 : S65-S78.
- 61.- Janda J.M. and Battone E.J. 1981 : Pseudomonas aeruginosa enzyme profiling: Predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. J. Clin. Microbiol. 14: 55-60.
- 62.- Kharazmi A., Hoiby N., Doring G. and Valerius N.H. 1984. Pseudomonas aeruginosa exoproteases inhibit human neutrophil chemiluminescence. Infect. Immun. 44:587-591.
- 63.- Bjorn M.J., Pavlovskis O.R., Thompson M.R. and Iglewski B.H. 1985. Production of exoenzyme S during Pseudomonas aeruginosa infections of burned mice. Infect. Immun. 24:837-842.
- 64.- Doring G., Goldstein W., Roll A., Schiotez P.O. and Hoiby N. 1985 : Role of Pseudomonas aeruginosa exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. Infect. Immun. 49:557-562.
- 65.- Berka R.M., Gray G.L. and Vasel M.L. 1981. Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 34: 1071-1074.
- 66.- Sokol P. A., JR., Iglewski B. H., Hager T. A., Sadoff J.C. and Cross A.S. 1981. : Production of exoenzyme S by clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 34: 147-153.
- 67.- Cryz S. J., J. R., Friedman R. L., Pavlovskis O.R. and Iglewski B. H. 1981. Effect of formalin toxoiding on Pseudomonas aeruginosa toxin A: Biological, chemical, and immunochemical studies. Infect. Immun. 32:759-768.

- 68.- Howe T.R., Wretling B. and Iglewski B.H. 1983. Comparison of two methods of genetic exchange in determination of the genetic locus of the structural gene for Pseudomonas aeruginosa elastase. J. Bacteriol. 156:58-61.
- 69.- Fick R.B., Baltimore R.S., Squier S.U. and Reynolds H.Y. 1985. Ig G proteolytic activity of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 151: 589-598.
- 70.- Zierdt C.H. and Schmidt P.J. 1964. Dissociation in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 87: 1003-1010.
- 71.- Woods D.E., Schaffer M.S., Rabin H.R., Campbell G.D. and Sokol P.A. 1986. Phenotypic comparison of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a variety of clinical sites. J. Clin. Microbiol. 24: 260-264.
- 72.- Jagger K.S., Bahner D.R. and Warren R.L. 1983. Protease phenotypes of Pseudomonas aeruginosa isolated from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 17:55-59.
- 73.- Suter S., Schaad U. B., Roux L., Nydegger U.E. and Waldvogel F.A. 1984. Granulocyte neutral protease and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 149:523-530.
- 74.- Baker N.R. 1981. Role of exotoxin A and proteases of Pseudomonas aeruginosa in respiratory tract infections. Can. J. Microbiol. 28:248-255.
- 75.- Nicas T.I. and Iglewski B.H. 1986. Production of elastase and other exoproducts by environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 23:967-969.
- 76.- Pier G. B. 1988. Polysaccharide antigens of Pseudomonas aeruginosa. Rev. Infect. Dis. 10:S337-S340.

- 77.- Elsheikh L. E., Bergman R., Cryz S. J. and Wretling B. 1986. A comparison of different methods for determining elastase activity of Pseudomonas aeruginosa strains from mink. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect B, 94: 135-138.
- 78.- Holder I. A. and Wheeler R. 1984. Experimental studies of the pathogenesis of infections owing to Pseudomonas aeruginosa : Elastase, an Ig G protease. Can. J. Microbiol. 30: 1118-1124.
- 79.- Shinozaki, T., Fujii R., Sanai Y. and Homma Y. 1981. Development of antibodies to OEP, exotoxin A and exoenzymes of Pseudomonas aeruginosa in man. Japan. J. Exp. Med. 51:165-170.
- 80.- Gray L. and Kreger A. 1979. Microscopic characterization of rabbit lung damage produced by Pseudomonas aeruginosa proteases. Infect. Immun. 23: 150-159.
- 81.- CHO Y.J., OH Y.H., ABE C. and USUI M. 1978. IgE antibody production to exoenzymes and common antigen (OEP) of Pseudomonas aeruginosa in mice. Japan J. Exp. Med. 48: 491-498.
- 82.- Reynolds H. Y., Levine A. S., Wood R. E., Zierdt C. H. and Dale D.C. 1975. Pseudomonas aeruginosa infections: Persisting problems and current research to find new therapies. Ann. Int. Med. 82:819-831.
- 83.- Cicmanec J. F. and Holder I.A. 1979. Growth of Pseudomonas aeruginosa in normal and burned skin extract: Role of extracellular proteases. Infect. Immun. 25:477-483.
- 84.- Young L.S. 1974. The host: Humoral and cellular factors.

- Role of antibody in infections due to Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 130: S111-S113.
- 85.- Bjornson A.B. and Michael J.G. 1974. Factors in human serum promoting phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa. I. Interaction of opsonins with the bacterium. J. Infect. Dis. 130: S119-S125.
- 86.- Blackwood L.L., Stone R.M., Iglewski B.H. and Pennington J. E. 1983. Evaluation of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A and elastase as virulence factors in acute lung infection. Infect. Immun. 39: 198-201.
- 87.- Wood D.E., Gryz S.J., Friedman R.L. and Iglewski B.H. 1982. Contribution of toxin A and elastase to virulence of Pseudomonas aeruginosa in chronic lung infections of rats. Infect. Immun. 36:1223-1228.
- 88.- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- 89.- Bergon B. and Holby S. 1975. Epidemiological markers for Pseudomonas aeruginosa. Acta Path. Microbiol. Scand. 83:553-556.
- 90.- Sokol P.A. and Woods D.E. 1986. Characterization of antibody to the ferripyochelin binding protein of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 51:896-900.
- 91.- Schultz D.R. and Miller K.D. 1974. Elastase of Pseudomonas aeruginosa; Inactivation of complement components and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. Infect. Immun. 10:128-135
- 92.- Morihara K., Tsuzuki H. and Oda K. 1979. Protease and

- elastase of Pseudomonas aeruginosa: Inactivation of human plasma alpha-1 proteinase inhibitor. *Infect. Immun.* 24: 188-193 (1979).
- 93.- Thomassen M. J., Demko C.A., Boxerbaum B. and Stern R.C. 1979. Multiple isolates of Pseudomonas aeruginosa with differing antimicrobial susceptibility patterns from patients with cystic fibrosis. *J. Infect. Dis.* 140: 873-880 (1979).
- 94.- Kharazmi A., Doring G., Hoiby N. and Valerius N. 1984. Interaction of Pseudomonas aeruginosa alkaline protease and elastase with human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Infect. Immun.* 43: 161-165.
- 95.- Jacquot J., Tournier J.N. and Puchelle E. 1985. In vitro evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by Pseudomonas aeruginosa elastase and not by human leukocyte elastase. *Infect. Immun.* 47:555-560.
- 96.- Lew D.P., Despont J.P., Perrin L.H. and Aguado M.T. 1980. Demonstration of a local exhaustion of complement components and of an enzymatic degradation of immunoglobulins in pleural empyema: a possible factor favouring the persistence of local bacterial infections. *Clin. Exp. Immunol.* 42:506-514.
- 97.- Baltimore R.S., Dobek A.S. and Stark F.R. 1974. Clinical and epidemiological correlates of Pseudomonas typing. *J. Infect. Dis.* 130:S53-S59.
- 98.- Reynolds H.Y. 1974. Pulmonary host defenses in rabbits after immunization with Pseudomonas antigens: The interaction of bacteria, antibodies, macrophages, and

- lymphocytes. J. Infect. Dis. 130:S134-S141.
- 99.- Pavlovskis O.R. and Wretling B. 1979. Assessment of protease (elastase) as a Pseudomonas aeruginosa virulence factor in experimental mouse burn infection. Infect Immun. 24: 181-187.
- 100.- Ohman D.E., Burns R.P. and Iglewski B.H. 1980. Corneal infections in mice with toxin A and elastase mutants of Pseudomonas aeruginosa. J. Infect. Dis. 142: 547-555.
- 101.- Hancock R.E. and Cham L. 1981. Outer membranes of environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 26:2423-2424.
- 102.- Morihara K. and Homma Y. 1986. New method of preparing elastase toxoid from Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 23:53-55
- 103.- Pier G.B., Desjardins D. and Aguilar T. 1986. Polysaccharide surface antigens expressed by nonmucoid isolates of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients. J. Clin. Microbiol. 24:189-196.
- 104.- Morihara K. and Sanai Y. 1981. Effects of proteases on the structure and activity of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A. Infect. Immun. 34: 435-440.
- 105.- Fomsgaard A., Dinesen B. and Shand G.H. 1989. Antilipopolysaccharide antibodies and differential diagnosis of chronic P. aeruginosa lung infection in cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 27: 1222-1229.
- 106.- Heck L.W., Morihara K., McRae W.B. and Miller E.J. 1986. Specific cleavage of human type III and IV collagens by Pseudomonas aeruginosa elastase. Infect. Immun. 51:115-118.

- 107.- Schiller N.L., Hatch R.A. and Joiner K.A. 1989. Complement activation and C3 binding by serum-sensitive and serum resistant strains of Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 57: 1707-1713.
- 108.- Krieg D.P., Bass J.A. and Mattingly S.J. 1988. Phosphorylcholine stimulates capsule formation of phosphate-limited mucoid Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 56:864-873.
- 109.- Pedersen S. S., Espersen P. F. and Hoiby N. 1989. Purification, characterization, and immunological cross-reactivity of alginates produced by mucoid Pseudomonas aeruginosa from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 27: 691-699.
- 110.- Fomsgaard A., Conrad R. S. and Galanos C. 1988. Comparative immunochemistry of lipopolysaccharides from typable and polyagglutinable Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 26: 821-826.
- 111.- Heck L. W., Morihara K. and Abrahamson D.R. 1980. Degradation of soluble laminin and depletion of tissue associated basement membrane laminin by Pseudomonas aeruginosa elastase and alkaline protease. Infect. Immun. 54: 149-153.
- 112.- Suter S., Schaad U.B. and Roux L. 1984. Granulocyte neutral proteases and Pseudomonas elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 149:523-530.
- 113.- Morihara K. 1964. Production of elastase and proteinase by

Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 88:745-757.

- 114.- Morihara K., Tsuzuki H., Oka T. and Inoue H. 1965.
Pseudomonas aeruginosa elastase: Isolation,
crystallization, and preliminary characterization. J. Biol.
Chemist. 240: 3295-3303.
- 115.- Doring G., Dalhoff A. and Vogel O. 1984. In vivo activity
of proteases of Pseudomonas aeruginosa in rat model. J.
Infect. Dis. 149: 532-537.
- 116.- Baltch A.L., Griffin P.E. and Hammer M. 1979. Pseudomonas
aeruginosa bacteremia: Relationship of bacterial enzyme
production and pyocine types with clinical prognosis in 100
patients. J. Lab. Clin. Med. 93: 600-605.
- 117.- Brett M.M., Ghoneim A.T.M. and Littlewood J.M. 1988.
Prediction and diagnosis of early Pseudomonas aeruginosa
infection in cystic fibrosis: a follow-up study. J. Clin.
Microbiol. 26: 1565-1570.
- 118.- Gilmore D.S., Aeilts D. and Alldis B.A. 1981. Effect of
bathing on Pseudomonas and Klebsiella colonization in
patients with spinal cord injuries. J. Clin. Microbiol.
14: 404-407.
- 119.- Liu Pinghui D.J. 1974. Extracellular toxins of Pseudomonas
aeruginosa. J. Infect. Dis. 130: S94-S99.
- 120.- Scher F.M., Klopper J.W. and Singleton C.A. 1985.
Chemotaxis of fluorescent Pseudomonas spp to soybean seed
exudates in vitro and in soil. Can. J. Microbiol. 31:
570-574.
- 121.- Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Bartlett. 1979. The enzyme
linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts

- of microplate applications. Dynatech Europe Laboratories Inc., London. p. 37-40.
- 122.- Holder I.A. and Haidaris C.G. 1979: Experimental studies of the pathogenesis of infections due to Pseudomonas aeruginosa: Extracellular protease and elastase as in vivo virulence factors. Can. J. Microbiol. 25: 593-599.
- 123.- Brett M.M., Ghoneim A.M. and Littlewood J.M. 1986. Serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis. Arch. Dis. Child. 61: 1114-1120.
- 124.- Sokol P.R., Dhman D.E. and Iglewski B.H. 1979. A more sensitive plate assay for detection of protease production by Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Microbiol. 9: 538-540.
- 125.- Erwin N. 1974. Pseudomonas aeruginosa infection and humoral antibody response of patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 130: S132-S133.
- 126.- Hollsing A.E., Granstr.O.M. and Vasil M.I. 1987. Prospective study of serum antibodies to Pseudomonas aeruginosa exoproteins in cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 25: 1868-1874