



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 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.

TESIS 1978

AS M. 147 ~~147~~ 140
DE _____
POMA _____
POMA _____
POMA _____



	PRESIDENTE , Prof.	<u>OSCAR AMOR DODERO</u>
	VOCAL "	<u>LEONOR MARTINEZ SOTO</u>
Jurado asignado originalmente según el tema.	SECRETARIO "	<u>ELDA PENICHE QUINTANA</u>
	1er. SUPLENTE "	<u>BISERKA SVESHTAROVA P.</u>
	2do. SUPLENTE "	<u>MARISOL LOPEZ LOPEZ</u>

Sitio donde se desarrolló el tema :

Bibliotecas de : Fac. de Química, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Dpto. de Fisiología de la Fac. de Medicina, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del - I.P.N. y Biblioteca Central del I.M.S.S.

SUSTENTANTE : MARTHA ESQUIVEL GRANADOS.

ASESOR DEL TEMA : Profra. ELDA PENICHE QUINTANA.

A MIS PADRES :

Alberto Esquivel Arellano.
Adela Granados de Esquivel.
Por el apoyo, la confianza
y el cariño que siempre me
han tenido.

A MIS HERMANOS :

Alberto, Lety, Oscar y Enrique.

A MIS MAESTROS, en especial a la-
QFB. Elda Peniche Quintana-
por su acertada supervisión
y gufa en la elaboración de
este trabajo.

Y a todas las personas que de una
manera directa o indirecta me ayu-
darón y siguen ayudando.

I N D I C E

INTRODUCCION	A
Capítulo 1. CARACTERES UTILES EN LA DIFERENCIACION DE ESPECIES DEL GENERO <u>PSEUDOMONAS</u>	1
Morfología	2
Pigmentación	4
Caracteres fisiológicos	5
Sistemas de hibridización de ácidos nu_ cléicos	7
Capítulo 2. LA GENETICA EN EL GENERO <u>PSEUDOMONAS</u>	13
Estructura del genoma bacteriano	15
Análisis de Recombinación	15
Transformación	15
Transducción	15
Conjugación	16
Plásmidos identificados en <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	16
Factores sexuales	16
Factores RP	17
Compatibilidad	17
Origen de los factores R	19
Bacteriocinas	19
Bacteriofagos	20
Capítulo 3. LA BIOQUIMICA EN EL GENERO <u>PSEUDOMONAS</u>	24
Reacciones oxidativas	24
Nitrato y nitrito	25

Oxigenasas	25
Vías catabólicas y su regulación	26
Análisis fisiológico de mecanismos inductores	26
Adaptación simultánea e inductores específicos	27
Represión por sustratos alternativos y productos metabólicos	28
Regulación por inhibición de enzimas	29
Regulación por sistemas de captación	29
Vías convergentes	29
Vías divergentes	30
Genes acoplados para enzimas catabólicas	30
Vías biosintéticas y su regulación	32
Arreglos de genes para las vías biosintéticas	32
Mutantes reguladoras y el uso de metabolitos análogos	32
Regulación de la actividad enzimática	33
Regulación de la síntesis de enzimas	33

Capítulo 4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PSEUDOMONAS

<u>aeruginosa</u> DE FUENTES CLINICAS	35
Métodos de Aislamiento y detección	36
Identificación	37
Tipificación de cepas	38
Tipificación por fagos	39
Tipificación serológica	39
Tipificación por bacteriocinas	40

Capítulo 5. INFECCIONES CAUSADAS POR PSEUDOMONAS aeruginosa . 43

Patogénesis	44
Infecciones en animales	44
Virulencia	46
Factores tóxicos	47
Patología	52
Quemaduras y heridas	52
Piel	54
Aparato Urinario	54
Aparato Respiratorio	55
Infecciones en los ojos	56
Infecciones en los oídos	57
Endocarditis	58
Infecciones del sistema nervioso central	58
Otros sitios	58
Infecciones en la infancia	59

Obstetricia	60
Septicemias	60
Mecanismos de transmisión	61
Fuentes	62
Inmunidad	62
Anticuerpos	63
Fagocitos	64
Profilaxis	65
Capítulo 6. RESUMEN Y COMENTARIOS	69
Capítulo 7. BIBLIOGRAFIA	73

I N T R O D U C C I O N

Las especies microbianas son clasificadas para propósitos médicos en: patógenas y no patógenas.

Esta subdivisión es conveniente para distinguir a los organismos que causan enfermedades específicas, de los saprofitos y de la mayoría de comensales que se desarrollan inofensivamente sobre la superficie del cuerpo humano.

Saprofitos y comensales pueden sin embargo, causar severos efectos patológicos cuando tienen acceso a tejidos con pobres defensas antimicrobianas o en pacientes en los cuales su resistencia ésta deteriorada por enfermedad o por ciertas formas de tratamiento médico. Tales microorganismos son comunmente llamados " Oportunistas " .

Todos los microorganismos pueden implícitamente bajo ciertas circunstancias, crecer en el tejido humano pudiendo actuar como oportunistas; pero hay ciertas especies de bacterias, virus, hongos y protozoos los cuales están particularmente asociados con este tipo de infección.

Tales organismos están caracterizados por su resistencia a un gran número de antibióticos, los cuales son usualmente activos contra la mayoría de las bacterias patógenas. Con esta ventaja biológica, este tipo de microorganismos surgen por selección, donde son muy empleados los antibióticos (hospitales).

De las bacterias que presentan estas propiedades, tiene una particular importancia Pseudomonas aeruginosa.

Aún cuando es inofensiva en sujetos sanos y no heridos (excepto en la infancia), es más peligrosa que Staphylococcus aureus en la cámara anterior del ojo, en el oído y es capaz de

causar infecciones fatales en pacientes con severas quemaduras. — Especial riesgo se presenta en pacientes que requieren instrumentación (cateterismo) con lo cual se pueden introducir bacterias a tejidos susceptibles; también en lesiones que contienen tejido necrótico (quemaduras) o fluidos (orina o L.C.R.), en donde pueden crecer rápidamente estos organismos de un pequeño inóculo, a un número potencialmente invasivo.

Pseudomonas aeruginosa produce una variedad de toxinas y enzimas que la hacen ser un invasor potencialmente peligroso, si las defensas naturales son deficientes. Su capacidad para crecer como saprofito en agua, con un mínimo de nutrientes, la hace un contaminante importante en soluciones " estériles ".

De acuerdo con las razones anteriormente expuestas, la importancia médica de Pseudomonas aeruginosa, microorganismo oportunista, merece ser ampliamente considerada.

C A P I T U L O 1

CARACTERES UTILES EN LA DIFERENCIACION DE ESPECIES DEL GENERO
PSEUDOMONAS .

Con el propósito de entender la situación taxonómica actual del género Pseudomonas donde se encuentra incluida como especie tipo Pseudomonas aeruginosa, iniciaremos el análisis de los caracteres útiles en la diferenciación de las especies de este grupo basados en la definición general propuesta en 1966 por Stainer , - Palleroni y Duodoroff (276), la cual dice:

Las bacterias poseen las siguientes características fenotípicas: Bacilos unicelulares rectos o curvos pero no helicoidales. Dimensiones, ancho de 0.5 a 1 μ y largo de 1.5 a 4 μ . Móviles por medio de uno o más flagelos polares, un miembro del grupo es inmóvil, otros producen flagelo lateral en adición al flagelo polar. - Gram negativo. No forman endosporas, ni hifas, ni cápsula.

La producción de energía se debe a su metabolismo respiratorio, nunca fermentativo o fotosintético. El oxígeno molecular es utilizado como oxidante terminal, pero algunos miembros del grupo pueden vivir anaeróbicamente en medios que contienen nitrato. Todos los miembros son quimiorganotróficos, pero algunos son quimio-litotróficos facultativos capaces de utilizar hidrógeno gaseoso como única fuente de energía. El contenido de G + C del DNA está considerado en un rango de 58 a 69 moles % .

Los caracteres morfológicos y fisiológicos agrupados en la definición, aunque generales, son aplicables a las especies que se han asignado a este grupo. Sin embargo, hay que hacer notar que los caracteres morfológicos de la definición son compartidos por -

otros grupos de bacterias, las cuales son excluidas por poseer alguna propiedad fisiológica que varía con las ya enunciadas; tal es el caso de las especies fermentativas pertenecientes a: Aeromonas, Zymomonas, Photobacterium y Vibrio. Podemos incluir también los grupos fisiológicamente especializados pertenecientes a los géneros: Nitrosomonas, Thiobacillus, Ferrobacillus, Gluconobacter, --- Methylomonas (Methanomonas), Halobacterium y Xanthomonas.

Con esto podemos tener una idea de la relación que guarda el género Pseudomonas con otros géneros de bacterias.

Morfología .-

Los atributos morfológicos son muy importantes en la taxonomía; pero es un hecho que las bacterias no ofrecen abundante información morfológica, lo cual es la principal razón del estado insatisfactorio de la taxonomía bacteriana basada únicamente en este carácter.

Las células de Pseudomonas son típicamente bacilos rectos aunque en una población es posible, casi invariablemente, encontrar un número de células curvas.

En algunas cepas, la longitud de las células excede grandemente al máximo de 4 μ indicado en la definición. Esto ha sido reportado para cepas de Pseudomonas fluorescentes patógenas de --- plantas y en algunas cepas de Pseudomonas putida.

Las células no presentan factores particulares al microscopio óptico, excepto en aquellas especies capaces de acumular cantidades del polímero poli β hidroxibutirato (PH β). La acumulación de este compuesto se incrementa por el crecimiento de células en medios con un contenido bajo de nitrógeno y normalmente los gránulos pueden verse claramente cuando el microscopio cuenta con un equipo para contraste de fases. Algunas especies sin embargo, acumulan muy poco PH β y su presencia solamente puede ser demostrada -

sin duda, mediante un aislamiento y caracterización química .

Yamamoto (311) ha reportado la presencia de estructuras - microtubulares conocidas como rapidosomas en muchas de las especies incluidas en su estudio al ser examinadas al microscopio electrónico después de aplicarles la técnica del sombreado metálico, - los rapidosomas muestran estar en asociación íntima con el núcleo plasma y su función biológica no es clara todavía, sin embargo hay evidencias que favorecen la identidad de los rapidosomas con la cubierta de bacteriocinas polimerizadas en Pseudomonas fluorescens - (3).

En secciones delgadas de células de Pseudomonas aeruginosa se han observado, estructuras similares a mesosomas que están también presentes en Pseudomonas saccharophila (45, 120 y 315).

Las células de Pseudomonas muestran una activa movilidad, especialmente cuando se trata de cultivos juvenes. Esta movilidad es debida al flagelo polar. El número y la longitud de onda del - flagelo son caracteres taxonómicamente importantes (174). El flagelo es descubierto en la mayoría de las especies (91).

En algunas especies ha sido observado flagelo polar y lateral. El flagelo lateral tiene una corta longitud de onda con respecto al flagelo polar y es fácil de desprender cuando los cultivos se vuelven viejos, quedando las células flageladas polarmente (223). La inserción del flagelo en algunas especies no es exactamente polar sino un poco lateral o subpolar. Estos casos de flagelación anormal han reducido la significancia taxonómica de uno de los pocos caracteres morfológicos, quizá el más impresionante, el cual hasta ahora era considerado absolutamente típico de Pseudomonas

La movilidad, manifestada por ondas concéntricas sobre la superficie del medio sólido, se ha reportado en cepas de Pseudomonas aeruginosa no flageladas. Este fenómeno ha sido también observado en especies diferentes de Pseudomonas no fluorescentes fla

geladas y puede ser distinguido de la movilidad flagelar (116) .

Se han observado fimbria o pili en 8 de las 50 especies - de Pseudomonas examinadas en el microscopio electrónico (90). El - pili polar de Pseudomonas aeruginosa ha sido estudiado por Bradley (30) quien encontró que algunos de los apéndices son receptores de fagos que contienen RNA, mientras que otros son probablemente receptores de fagos filamentosos. El pili no es funcional para la transferencia del factor sexual F P₂ de Pseudomonas aeruginosa.

El pili de Pseudomonas echinoides (una especie de incierta posición taxonómica) está claramente involucrado en la formación de agregados celulares (117).

Pigmentación .-

La pigmentación de algunas especies de Pseudomonas es muy característica. Se han usado generalmente medios especiales para evidenciar o incrementar la producción de pigmentos. La pureza de los productos químicos y del agar empleados es muy importante, pero muchas veces no es garantía de buenos resultados.

Este carácter es el más errático de todas las propiedades fenotípicas. La producción de color puede perderse después de --- transferencias repetidas en medios de cultivo usados en el laboratorio y ocasionalmente se aíslan cepas apigmentadas de especies --- normalmente pigmentadas de la naturaleza .

Se producen diversos tipos de pigmento por especies de --- Pseudomonas: un tipo es fluorescente y soluble en agua y es característico de las llamadas Pseudomonas fluorescentes, es producido en muchos medios de cultivo, particularmente en aquellos con bajo contenido de hierro (92 y 168). Otro tipo de pigmentos pertenecen a la familia de los compuestos fenazina.

Piocianina, uno de los pigmentos fenazina de Pseudomonas aeruginosa es sintetizado vía aminoácidos aromáticos (40).

Algunos miembros del grupo fluorescente y especies de Pseudomonas cepacia producen varios otros pigmentos fenazina. Este último grupo de organismos pueden producir pigmentos que difunden dentro del medio de cultivo y semejan pigmentos fluorescentes cuando se examinan bajo una fuente de luz normal. Pueden ser diferenciados cuando se exponen a una fuente de luz ultravioleta de longitud de onda corta (254nm), donde solamente son capaces de fluorescer los pigmentos fluorescentes. Hay otros pigmentos carotenoides producidos por cuatro especies bien caracterizadas en este género que permanecen asociados con las células y son responsables del color amarillo o naranja de las colonias de estos organismos .

Varios otros pigmentos han sido reportados (274 y 222)

Caracteres fisiológicos.-

La escasez de datos morfológicos en las bacterias está compensada en una gran parte por la información fisiológica fácilmente obtenible. Las bacterias pertenecientes a este género, son particularmente susceptibles para efectuar observaciones fisiológicas. Para crecer, sus requerimientos son simples, el tiempo de generación es relativamente corto y su diversidad fisiológica es muy marcada (71).

Varias propiedades fisiológicas usadas para la caracterización de las especies se mencionan a continuación:

Relaciones de temperatura, reacciones de oxidación y citocromos con espectros diferentes, producción de ácido a partir de azúcares y alcoholes azúcares (pruebas limitadas a un número de casos), producción de la capa viscosa extracelular a partir de sacarosa, desnitrificación, reacción de hidrolasa de arginina, forma de incorporación de compuestos intermediarios en la degradación de compuestos aromáticos, detección de actividad enzimática extracelular tal como hidrólisis de gelatina, hidrólisis de almidón, hidró-

lisis de poliβ hidroxibutirato, acción de lecitinasa por la reacción llamada de yema de huevo y acción de lipasa determinada por hidrólisis de Tween 80.

Debe ser comentado que la marcada versatilidad bioquímica de Pseudomonas da como consecuencia que estos organismos produzcan relativamente pocas enzimas extracelulares, capaces de degradar grandes moléculas. En el análisis nutricional de las especies, la mayoría de los sustratos utilizados son compuestos solubles de bajo peso molecular.

Un número de caracteres de cultivo y fisiológicos considerados de significancia en la Bacteriología sistemática se han dejado fuera por varias razones. Entre estos caracteres están:

La producción de H_2S , la prueba de ureasa, la acción sobre leche tornasolada, el crecimiento en rebanadas de papa y varias pruebas de rutina útiles en el estudio de bacterias entéricas, algunas de estas pruebas están destinadas a revelar propiedades que están ausentes en los grupos del género Pseudomonas o aparecen erróneamente e incorrelacionadas con otros importantes caracteres.

Destacando entre los atributos de las especies están sus caracteres nutricionales. Den Dooren de Jong (1927) fué el primer bacteriólogo que mostró que especies de Pseudomonas podían utilizar un gran número de compuestos para crecer en diferentes soluciones puramente minerales, conteniendo una sal de amonio como única fuente de nitrógeno. Una de las especies estudiadas, P. putida, — mostró ser excepcionalmente versátil a este respecto, en cerca de 200 compuestos probados 80 pudieron ser utilizados como sustratos. Los compuestos utilizados por estas cepas pertenecen a varias familias químicas (carbohidratos, alcoholes, ácidos grasos saturados y no saturados, aminas, amidas y aminoácidos).

Los datos obtenidos de los productos de degradación nutricional son heterogéneos. En algunos casos la utilización de un sus

trato nos da información sobre la constitución enzimática de una cepa pero no es una regla, generalmente pueden utilizarse vías alternativas en la degradación de compuestos orgánicos (para una mayor información sobre esta sección en particular, ver el Cap. 3).

Sistemas de hibridización de ácidos nucleicos .-

En las investigaciones efectuadas en los sistemas DNA/DNA y rRNA/DNA para Pseudomonas, se ha producido una interesante información que puede ser usada como base para la construcción de un sistema taxonómico.

La homología entre pares de cepas se mide por la eficiencia con la cual el ácido nucleico de una de las cepas, compete por la reasociación o el enlace del ácido nucleico de la otra cepa.

La hibridización DNA/DNA es efectiva puesto que revela relaciones estrechas entre los organismos, pudiéndose correlacionar de una manera efectiva con las diferencias fenotípicas generales de las cepas, con lo cual obviamente la composición del DNA está directamente relacionada. Un número de complejos homólogos DNA fue establecido (222) en 1972, los miembros de un complejo dado están relacionados directa o indirectamente a uno o varios niveles de homología de DNA y no muestran una homología detectable con los miembros de otros complejos.

El resultado de los experimentos llevados a cabo con rRNA en Pseudomonas permiten la agrupación de las especies del género dentro de 5 grupos llamados " Grupos homólogos RNA " (224). La composición de estos grupos concuerda muy bien con los grupos homólogos DNA, previamente establecidos. Los resultados obtenidos con los dos tipos de ácidos nucleicos concuerdan bien cuando son comparados convenientemente, no hay caso en el cual un nivel detectable de homología DNA/DNA sea acompañado por un alto valor en experimentos rRNA/DNA.

Subdivisión interna del género Pseudomonas , en base a los grupos homólogos RNA .

Grupo homólogo RNA I , Pseudomonas fluorescens.

La posición central la ocupa en este grupo la especie — Pseudomonas fluorescens, ésta es la razón para la designación aplicada a este grupo. El grupo es muy heterogéneo en propiedades fenotípicas, pero algunas de estas propiedades pueden ser usadas en — combinaciones particulares para la subdivisión interna de este — gran grupo dentro del género. Las especies incluidas en este grupo son las mismas que constituyen el grupo definido previamente " Complejo homólogo DNA, Pseudomonas fluorescens ". Un grado variable — de homología DNA conecta directa o indirectamente a las especies — constitutivas; además un alto grado de homología rRNA/DNA es com — partido por todos los miembros del grupo que han sido analizados.

Este grupo incluye especies fluorescentes y no fluorescentes.

Entre las especies fluorescentes: Pseudomonas aeruginosa (especie tipo del género), Pseudomonas fluorescens (subdividida en biotipos), Pseudomonas putida (subdividida en dos biotipos) y muchas especies de Pseudomonas fluorescentes patógenas de plantas.

Las especies no fluorescentes están subdivididas dentro — de dos subgrupos: Subgrupo stutzeri (Pseudomonas stutzeri y Pseudomonas mendocina) y Subgrupo alcaligenes (Pseudomonas alcaligenes y Pseudomonas pseudoalcaligenes).

El contenido de G + C del DNA de todos los organismos del grupo, que han sido analizados se encuentran en un intervalo de 58 a 68 moles % , una extensión tan amplia como para el género mismo. Antes del nombramiento de Pseudomonas alcaligenes (242) todos los miembros tenían en común una importante propiedad negativa, la capacidad para acumular poli β hidroxibutirato como material de reser

va para carbón.

A continuación será descrita únicamente, la especie objeto de este trabajo que además es considerada como la especie tipo del género Pseudomonas.

Pseudomonas aeruginosa .- En la mayoría de los casos puede ser rápidamente reconocida por un número limitado de caracteres. El nombre de la especie se refiere al carácter más llamativo en el cultivo, un color que puede ser de naranja cobrizo a verde claro o verde (71).

Las células son bacilos, sus dimensiones promedio son: ancho de 0.5μ y su longitud está determinada en un intervalo de 1.4 a 3μ , la mayoría de las cepas son móviles y poseen típicamente un flagelo polar por célula; sin embargo, existe una cepa con una alta proporción (15%) no usual, que presenta dos flagelos. Esta proporción se encuentra fuera del máximo (10%) determinado (174) para cepas típicamente monotricas.

La producción de piocianina y de pigmentos fluorescentes son característicos de la especie, pero algunas cepas pueden carecer de uno o ambos tipos de pigmento. Algunos otros pigmentos han sido reportados por ejemplo: ácido l carboxi fenazina, ácido l carboxi dihidroxifenazina, clorafina, oxiclorafina, el pigmento rojo-aeruginocina A y B, melanina y la clorina conteniendo pioluterina. Algunos de estos pigmentos pueden ser también producidos por especies de los biotipos de Pseudomonas fluorescens.

Jenssen (149), ha enlistado los siguientes caracteres como importantes para el diagnóstico de las especies de Pseudomonas aeruginosa: Tendencia a la localización de ondulamiento en el borde de la colonia (debido al crecimiento en forma de ondas concéntricas, sobre la superficie del medio de cultivo), pigmentación, color característico (descrito por algunos bacteriólogos como dul-

zón) y presencia de placas metálicas brillantes sobre la superficie de las colonias.

Esta combinación de caracteres está presente en la mayoría de los cultivos examinados. Las colonias frecuentemente se extienden sobre la superficie del agar a partir del punto de inoculación, fenómeno que depende de la composición del medio de cultivo, (la extensión es sorprendente en medios que contienen Tween 80) muchas colonias son convexas, todas las cepas crecen a 37°C un carácter que diferencia a esta especie de otras Pseudomonas fluorescentes, algunas cepas no crecen a 42°C, pero 44°C es la temperatura máxima en la que crecen muchas cepas. No hay crecimiento a 5°C.

Todas las cepas pueden crecer con amonio, valina, lisina o urea como fuente de nitrógeno; nitrato y creatinina (pero no creatina) pueden ser usados por la mayoría de las cepas.

Una concentración de NaCl del 3%, es bien tolerada en el medio de cultivo y muchas cepas crecen en concentraciones de 6% de NaCl, lo cual quizá está cercano al máximo de concentración tolerada por esta especie.

Cepas de Pseudomonas aeruginosa se aíslan comúnmente, de muestras clínicas y su capacidad patógena potencial provoca preocupación en el ambiente hospitalario, debido a su resistencia frente a los antibióticos más comunes.

El nombre de Pseudomonas polycolor, ha sido aplicado a la cepa que tiene como origen las plantas, sin embargo el sinónimo con Pseudomonas aeruginosa es ahora generalmente aceptado.

El aislamiento para cepas del suelo es fácil, usando cultivos enriquecidos bajo condiciones de desnitrificación con una variedad de fuentes de carbono. Las cepas son marcadamente uniformes en propiedades fenotípicas generales y en homología de ácidos nucleicos. El contenido de G + C del DNA es de 67 moles %, considerado alto para algunas otras Pseudomonas fluorescentes.

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa son capaces de producir bacteriocinas específicas (aeruginocinas).

En la tabla 1.1 se muestra la clasificación de las especies de Pseudomonas dentro de los grupos homólogos RNA; para mayor información a cerca de estos grupos consultar (13, 223, 248 y 257)

Nota:

Explicación de las letras (a, b y c) marcadas en la tabla 1.1 de la página siguiente.

- ^a Los números en el paréntesis, corresponden a la cepa usada como referencia en los experimentos de hibridización-rRNA/DNA.
- ^b Calculado de acuerdo a la fórmula dada por Ballard (13). Cada vial contenía 1 μ g de DNA o rRNA marcado, 100 μ g de rRNA o 150 μ g de DNA no marcado (competidor) en un vol. final de 0.25 ml de 0.3 M de NaCl y 0.03 de citrato de Na; un filtro de nitrocelulosa por vial con cerca de 20 μ g de DNA inmobilizado no cortado.
- ^c No incluidos en experimentos rRNA/DNA .

Tabla 1.1 . Clasificación de las especies de Pseudomonas
dentro de los grupos homólogos RNA .

Grupos homólogos rRNA.	% de G+C en DNA	Especies ^a	% de competición ^b	
			rRNA/DNA	DNA/DNA

1	67	<u>P. aeruginosa</u> (131)	} 87 - 101	} 4-87
	59-63	<u>P. fluorescens</u> (D-31)		
	61-62	<u>P. putida</u>		
	58-61	fluorescentes patógenas de plantas.		
	61-66	<u>P. stutzeri</u>		
	63-64	<u>P. mendocina</u>		
	66	<u>P. alcaligenes</u>		
	63	<u>P. Pseudoalcaligenes</u>		
2	67-68	<u>P. cepacia</u> (383)	} 87 - 101	} 23-79
	68	<u>P. marginata</u>		
	65	<u>P. caryophylli</u>		
	69	<u>P. pseudomallei</u> ^c		} 29-56
	69	<u>P. mallei</u>		
	64	<u>P. pickettii</u>		
	66-67	<u>P. solanacearum</u>		
3	67	<u>P. acidovorans</u> (14)	} 79-92	} 33
	62	<u>P. testosteroni</u>		
	65-66	<u>P. delafieldii</u> (134)		} 42-100
	62-64	<u>P. facilis</u>		
	69	<u>P. saccharophila</u>		
4	66-67	<u>P. diminuta</u> (501)	} 96	} 27
	66	<u>P. vesicularis</u>		
5	67	<u>P. maltophilia</u> (67)	} 95	-----
	66-68	<u>Xanthomonas</u> spp (Xc-1)		

LA GENETICA EN EL GENERO PSEUDOMONAS .

Son dos especies dentro del género Pseudomonas (Pseudo--monas aeruginosa y Pseudomonas putida) las que han atraído la atención de los genetistas principalmente; para ambas especies se han desarrollado sistemas de análisis de recombinación y se han establecido una gran variedad de técnicas para el aislamiento de mutantes.

" Ha sido mostrado que los plásmidos, tienen un papel --- esencial en la resistencia a las drogas y en la versátil bioquímica de estas bacterias ".

Indudablemente queda mucho por aprender de la organización de Pseudomonas, pero una manera de incrementar nuestro conocimiento es mediante el empleo del Análisis Genético.

Hay tres aspectos del Análisis Genético que deben tenerse en cuenta:

- a).- La identificación de las variaciones genéticas naturales del organismo escogido.
- b).- La selección de variantes genéticas inducidas (mutantes), las cuales son el punto de partida para muchos experimentos.
- c).- Algunos sistemas de recombinación genética, por los cuales puede ser mapeado el genoma y llevada a cabo la recombinación de componentes del genoma.

La mayoría de los trabajos con Pseudomonas aeruginosa, -- han sido hechos con dos cepas originariamente descritas en 1955 -- (122). Estas cepas son: la PAO (originariamente cepa I) aislada de un paciente en Australia en 1954 y la PAT (formalmente cepa 2-), la cual fué aislada por Don y Van der Ende (1950) en el sur de-

Africa como cepa L- III, 3bi.

Ambas son protótrofas y aeruginocinogénicas. La cepa PAO - produce aeruginocinas tipo R y tipo S y la cepa PAT produce aeruginocina tipo R solamente (144). Casualmente estas dos cepas han mostrado, propiedades diferentes genéticamente y su investigación ha permitido establecer un amplio panorama de la Genética del género Pseudomonas (129 y 124).

Entre las variaciones genéticas naturales de Pseudomonas aeruginosa, la presencia de patrones alterados en la producción de pigmento es probablemente la variante más común (149); pero cualquiera que haya cultivado frecuentemente a este microorganismo, está conciente de la gama de variantes que se pueden presentar en un medio de cultivo artificial .

Los cambios ocurridos en muchas propiedades reconocibles - de estos organismos incluyen: morfología colonial, producción de pigmento, resistencia frente a agentes deletéreos, fagos, susceptibilidad a aeruginocina y propiedades antigénicas(133 y 268).

Aún cuando todavía no hay un completo entendimiento de la biosíntesis de compuestos de pequeño peso molecular y macromoléculas, mucho es entendido acerca del mecanismo y control de estos procesos particularmente en las bacterias. Lo mismo puede decirse para la morfogénesis y el ensamblaje de estructuras celulares y subcelulares. Una proposición genética para la solución de este problema - involucra el desarrollo de técnicas para el aislamiento de mutantes, las cuales tengan componentes estructurales alterados o carezcan de la capacidad para ensamblar dichos componentes. Una proposición eminentemente útil es el Análisis de la Morfogénesis con bacteriofagos

Trabajos sobre este aspecto, han sido realizados en Pseudomonas aeruginosa (125, 131 y 306).

Estructura del genoma bacteriano.-

La información de muy variadas fuentes, indica que el genoma bacteriano consiste de un cromosoma adherido a la membrana bacteriana. Generalmente mide de 2 a 3×10^9 daltons con uno o más plásmidos. Cada uno con un peso molecular de 10 a 70×10^6 daltons también probablemente adherido a la membrana (131 y 243).

El cromosoma es una estructura estable, pero los plásmidos tienen variados grados de estabilidad, debiendo tener algún control que asegure estrictamente la replicación sincronizada tal, que la proporción entre el número de plásmidos y el cromosoma permanezca razonablemente constante en la mayoría de los casos, uno o dos (11 y 214).

Análisis de Recombinación .-

En Pseudomonas aeruginosa , hay procesos de reclasificación del material genético, los cuales pueden ser usados provechosamente en investigaciones genéticas de estos organismos. Estos procesos son: Conjugación (promovida por una variedad de plásmidos) , Transducción y Transformación .

Transformación .-

Kahn y Sen, 1967 (158) describen la recombinación genética por transformación, en varias especies de Pseudomonas incluyendo combinaciones intra e interespecificas de Pseudomonas aeruginosa

Transducción .-

La frecuencia de lisogenia en cepas de Pseudomonas aeruginosa es cercana al 100% , en contraste con lo dicho para E. coli donde solamente cerca del 10% de las cepas son lisogénicas (82 y 109). La polilisogenia (más de un tipo de profagos en la célula) - también parece ser común en Pseudomonas aeruginosa (81, 123 y 127)

La lisogenia entre otras especies de Pseudomonas es muy rara o no detectable (109).

Se ha mostrado que la conversión de fagos o conversión lisogénica ocurre en un gran número de cepas de P. aeruginosa serotípicamente diferentes, efectuando cambios en los componentes de la superficie, la síntesis de aeruginocinas, los pigmentos melanogénicos, las fluoresceinas y proteasas (184).

Se han caracterizado los siguientes fagos como transductores de la especie en estudio: F 116, D 3, G 101, F 126, F 130 y B 3. Todos ellos muestran una transducción general (126, 127, 132 y 172).

Conjugación .-

Este es un proceso de contacto directo entre células bacterianas, con la transferencia de material genético, de una célula donadora a una célula receptora.

Una de las células (donadora) lleva la información genética necesaria que facilita el contacto. Este grupo de genes es comúnmente llamado " Factor de Transferencia " y cuando está genéticamente unido a los determinantes para la resistencia a antibióticos, el término es ampliado a: Factor de Transferencia resistente- o RTF (199).

El mecanismo por el cual se lleva a cabo la transferencia genética por conjugación en Pseudomonas aeruginosa, todavía no es claramente descrito en todos sus aspectos.

Plásmidos identificados en Pseudomonas aeruginosa .-

Factores sexuales .-

Históricamente, estos son los primeros tipos de plásmidos que fueron identificados en esta especie. La descripción de FP 2

por Holloway y Jennings, 1958 (128) es la primera referencia con - que se cuenta.

El término factor sexual, se refiere a la capacidad de es - tos plásmidos para promover la transferencia del cromosoma bacteria - no en la conjugación.

Factores RP.-

La alta resistencia natural, de Pseudomonas aeruginosa a una gran variedad de antibióticos, ha sido una fuente interesante - de investigación. En 1969, Lowbury y col. (195) describieron el ais - lamiento de una cepa, altamente resistente a carbenicilina.

La naturaleza de su aspecto, sugiere que un factor R es - responsable y ésto fue subsecuentemente confirmado con el trabajo - de Sykey, 1970 (286).

Es obvio que factores R de Pseudomonas, son ahora un aspec - to importante de la genética epidemiológica de estas bacterias.

Varios factores R han sido aislados (28, 36, 49, 141, 160, 195 y 310) (ver tabla 2.1).

En cuanto a sus propiedades biológicas, algunos factores R pueden promover la transferencia del cromosoma bacteriano, algunos - son reprimibles, otros confieren resistencia a sales de mercurio, - algunos otros pueden impedir la multiplicación de fagos en Pseudo - monas aeruginosa y algunos más pueden limitar la producción de - - - aeruginocina o pueden conferir tolerancia a la aeruginocina. (278 y 36) .

Compatibilidad.-

La identificación y diferenciación de plásmidos, es difi - cil y todavía un problema no solucionado en la taxonomía genética.

La opinión común, pone a la capacidad para replicarse, co - mo un importante factor taxonómico. Y se mide por la capacidad de -

dos plásmidos, para existir y replicarse en la misma célula bacteriana, tales plásmidos son llamados COMPATIBLES (62 y 63).

Tabla 2.1 . Plásmidos que confieren resistencia a drogas en
Pseudomonas aeruginosa .

Lugar donde fue aislado .	Nombre del plásmido.	Nombre común.	Patrón de resistencia a drogas .
Inglaterra	RP 1	R 1822	C, K/N , T
Inglaterra	RP 1-1	R 18-1	C
Inglaterra	R 9169	R 91	C, K/N , T
Inglaterra	R 6886	R 68	C, K/N , T
Inglaterra	RP 8		C, K/N , T
Japón	R 2-72		C, S, K
Japón	R 38-72		T, S
Japón	R 39-72		T, S
Canadá	R 931		S, T
Canadá	R 679		S, Su
Canadá	R 1162		S, Su
Canadá	R 3108		S, T, Su
Canadá	R 209		S, Su, G
Canadá	R 130		S, Su, G
Canadá	R 716		S
Canadá	R 503		S
Canadá	R 5265		S, Su
París	R 64		A, C, Su, G, K
París	R 40a		A, K/P , Su

Abreviaciones :

C, carbenicilina ; K/N , Kanamicina y Neomicina ; T , Tetraciclina ; S , Estreptomycin ; A , Ampicilina ; K/P , Kanamicina y - Paromomicina ; Su , Sulfonamida ; G , Gentamicina.

Origen de los factores R .-

La capacidad de los plásmidos RP para ser residentes de una gran gama de géneros bacterianos, hace que su origen sea de interés.

Estos plásmidos RP fueron detectados por primera vez en infecciones con bacterias entéricas , asociadas a quemaduras en humanos .

La información hasta ahora disponible (192y 219) no logra todavía determinar claramente el origen de estos factores.

Bacteriocinas .-

Las bacteriocinas, son proteínas producidas por bacterias que tienen efecto letal sobre otras bacterias.

Sustancias de este tipo producidas por Pseudomonas aeruginosa , fueron identificadas primeramente por Jacob (1954) quien les dió el nombre de piocina (por lo que la especie llevó el nombre de Pseudomonas pyocyanea) . El término aeruginocina es más correcto y ambos términos son aceptados ahora como sinónimos.

Las cepas de esta especie son muy aeruginocinogénicas, la alta frecuencia de esta propiedad, ha permitido que las aeruginocinas sean usadas en la tipificación de las cepas .

La producción de aeruginocina, puede ser afectada por la temperatura de incubación de la cepa, por la irradiación de luz ultra violeta y por el tratamiento con Mitomicina C (118 y 156).

Bradley en 1967 (29), propuso la clasificación de estas bacteriocinas dentro de dos tipos (R y S).

Las tipo S, caracterizadas por su sensibilidad a enzimas proteolíticas y por la falta de una estructura al ser examinadas en el microscopio electrónico.

Las tipo R, no son sensibles a enzimas proteolíticas y —

muestran una estructura al ser examinadas en el microscopio electrónico; la estructura de este tipo de bacteriocinas tiene la apariencia característica de los componentes de bacteriofagos.

Las aeruginocinas tipo R han sido más extensamente estudiadas. Kageyama y col. (144, 145, 156 y 157), mostraron que esta variedad de aeruginocinas son partículas similares a las fibras de la cola de los bacteriofagos, con un tipo de proteína particular que tiene un peso molecular de cerca de 1×10^7 daltons. Ishii y col. (143) mostraron que la morfología de estas aeruginocinas corresponde a un doble cilindro hueco, con 1200 \AA de longitud y 150 \AA de diámetro, con un núcleo (core) y una cubierta contráctil alrededor del núcleo, la placa basal y las fibras de la cola pudieron observarse. El análisis de las subunidades de la cubierta, ha mostrado que son capaces de polimerizarse (318).

Estudios sobre la forma de acción de las aeruginocinas tipo R, han mostrado que hay una rápida inhibición en la síntesis de RNA, DNA y proteínas; similar a lo que ocurre con la colicina K en Escherichia coli y con la megacina C en Bacillus megaterium (121, 164, 165 y 211).

Ambos tipos de aeruginocinas pueden ser derivados de la misma cepa bacteriana, la cepa PAO de Pseudomonas aeruginosa puede producir ambos tipos de aeruginocinas (144).

Es poco lo que se conoce a cerca de las aeruginocinas tipo S (217).

Bacteriofagos .-

Casi todas las cepas de Pseudomonas aeruginosa son lisogénicas y proporcionan una buena fuente para el aislamiento de fagos temperados.

Las propiedades de algunos fagos de Pseudomonas aeruginosa se muestran en la tabla 2.2

Morfológicamente, la estructura de estos fagos es variada- (63, 73, 82, 127, 130, 216, 219, 266, 272, 287, 306 y 312) , así te-
nemos dos tipos de fagos que utilizan como receptores de adsorción-
al pili bacteriano: fagos filamentosos de morfología icosaedral (es-
férica), con una cola muy corta y poco RNA (PP7) y el fago con cabe-
za hexagonal (58nm de diámetro), con cola no contráctil (con 186 nm
de largo), el cual parece ser único, por lo característico de su es-
tructura.

El ácido nucléico de los fagos DNA de Pseudomonas, es usual-
mente una doble hélice, que mide de 6 a 120×10^6 daltons.

Un importante aspecto en la clasificación de los bacterio-
fagos es la propiedad que tienen ciertos fagos para integrarse gené-
ticamente en el genoma bacteriano, estableciendo la lisogenia en la
bacteria.

Los fagos que no tienen esta propiedad son llamados: intem-
perados, virulentos o no lisogénicos.

Tabla 2.2 . Características de algunos fagos de Pseudomonas aeruginosa .

Fago	Morfología	ácido nucléico	% de G + C	Virulento o Temperado	Periodo latente (min)	P.M. del - ác. nucléi- co	Características .
Ø-MC	Icosaedral (55nm. diám. de cabeza) cola corta.	doble hélice DNA	46	Temperado	45		fago adsorbido, en los extremos terminales de la bacteria.
SD1	Cabeza hexagonal - diám. 50nm y cola 188nm x 6.2nm	doble hélice DNA	53.2	Virulento			
B 3	Octaedral (52nm. diám. de cabeza), cola 163 x 8 nm con 3 fibras cortas	doble hélice DNA		Temperado		20 - 25 X 10 ⁶ dal- tons.	No inducible por U.V., DNA en do- ble hélice y no tiene extremida- des cohesivas.
F 116	Octaedral (58nm. - diám. de cabeza, con estructura y cola frágil (79x8 nm)	doble hélice DNA		Temperado		38 X 10 ⁶ dal- tons.	No inducible por U.V., DNA en do- ble hélice y no tiene extremida- des cohesivas.
G 101		doble hélice DNA		Temperado		38 - 41 X 10 ⁶ dal- tons.	No inducible por U.V., DNA en do- ble hélice y no tiene extremida- des cohesivas.
D 3				Temperado			La recombinación por fagos ha si- do demostrada y fago mediador de la conversión antigénica de la superfi- cie bacteriana.

Continuación de la tabla 2.2 .

23

Fago	Morfología	ácido nucleíco	% de G + C	Virulento o Temperado	Periodo latente (min)	P.M. del ác. nucleíco.	Características .
E 79	Octaedral, 66 nm - diám.de cabeza, cola contráctil 150 x 17 nm con 6 fibras.	doble hélice DNA		Virulento		Estimado en 120 X 10 ⁶ daltons.	No Transductor.
Pf1, Pf2	Filamentosos	una hélice DNA		Virulento			Factor sexual no específico, (Fp2) de <u>P. aeruginosa</u> .
W-14	Icosaedral, 85 nm diám. de cabeza con cola contráctil, -- 140 nm.			Virulento	60		Parece mostrar inhibición de la lisis cuando hay superinfección.
7 S	Esférica (25 nm de diámetro)	una Hélice RNA		Virulento			No es usual el aislamiento de fagos RNA de una cepa lisogénica de <u>P. aeruginosa</u> y sensibilidad de fagos libres a RNA-asa no es usual.
PP 7	Esférica (25 nm de diámetro)	una hélice RNA		Virulento			La multiplicación del fago en el huésped bacteriano favorece la lisis antes que el fago sea liberado.
PRR1		RNA		Virulento			Contiene el factor R y R 1822 .

C A P I T U L O 3

LA BIOQUIMICA EN EL GENERO PSEUDOMONAS .

Reacciones oxidativas .-

Citocromos .- Pseudomonas son organismos aerobios, que derivan su energía de reacciones oxidativas; aunque el nitrato puede reemplazar al oxígeno (como aceptor terminal de electrones) en las especies denitrificadoras (15, 135 y 159).

Los citocromos han sido reconocidos, principalmente por su espectro de absorción, en todos los extractos de células o en preparaciones de membrana (276).

Se han identificado dos citocromo oxidasas, en Pseudomonas aeruginosa.

Horio y col. en 1961 (134), purificaron y cristalizaron una citocromo oxidasa de cultivos que crecieron anaerobiamente, en presencia de nitrato; la cual mostró tener una actividad de nitrato reductasa, por estar unida a la membrana y contener citocromos de los tipos c y d (313 y 314).

A las enzimas con actividades de nitrato reductasa y citocromo oxidasa presentes en preparaciones purificadas, se les llamó citocromo c.- 551. El nitrito es reducido a óxido nitroso con el citocromo c.- 551, bajo condiciones anaeróbicas.

Una citocromo oxidasa, parcialmente purificada de una fracción particular de extractos de Pseudomonas aeruginosa, que creció de manera aerobia mostró tener una actividad completamente localizada en una pequeña partícula de la fracción obtenida por el rompimiento de la membrana bacteriana. Esta citocromo oxidasa, contiene un citocromo tipo a.1 y se asoció con el citocromo c.- 552.

Fue de particular interés que la citocromo oxidasa aerobia era severamente reprimida por glucosa, mientras que la citocromo

mo oxidasa anaerobia no fue afectada por la presencia de glucosa - en el medio. Estas dos citocromo oxidasas, pudieron ser claramente distinguidas por sus diferentes propiedades regulatorias.

Muy poco se conoce acerca del arreglo estructural de los citocromos de Pseudomonas en la membrana, de la composición y el - arreglo espacial de la cadena de transporte de electrones. Hay al- gunos reportes (150 y 267) del aislamiento de complejos enzimáti- cos asociados con varios citocromos de Pseudomonas. Entre las pro- teínas asociadas con citocromos, está la azurina una proteína que- contiene cobre, fue purificada de Pseudomonas fluorescens y se su- giere que actúa como un acarreador, entre el citocromo c.- 551 y - la citocromo oxidasa. La secuencia de aminoácidos de esta proteína fue determinada por Ambler y Brown en 1967 (4).

Nitrato y nitrito .-

Pseudomonas aeruginosa, puede usar nitrato como única --- fuente de nitrógeno para crecer (asimilación de nitrato), y puede- también crecer bajo condiciones anaerobias con ciertos compuestos- de carbono usando aparte nitrato como el aceptor de electrones ter- minal, a condición de que una vía actúe como fosforilación oxidati- va (respiración con nitrato).

Para la asimilación de nitrato, el nitrato se reduce a -- amonio para ser asimilado dentro de compuestos orgánicos (233); pe- ro en la respiración con nitrato, es reducido a nitrito y subsecuente- mente a nitrógeno o a óxidos de nitrógeno (86).

La pérdida del nitrógeno fijado en el suelo y en los mares por denitrificación, ha sido atribuida a la acción bacteriana y -- Pseudomonas ha sido implicada (208).

Oxigenasas .-

La primera etapa en la oxidación de muchos compuestos pa-

raffínicos y aromáticos, es conducida por la acción de enzimas oxigenasas, las cuales incorporan directamente oxígeno molecular dentro de la estructura química de los sustratos orgánicos.

Las reacciones de oxigenasas son altamente exergónicas y nada de la energía libre liberada, es conservada por formación de enlaces pirofosfato en ATP. Las especies de Pseudomonas usan oxigenasas para bajar la energía de estabilización de los sustratos que emplean para crecer y para que el catabolismo de estos compuestos sea termodinámicamente irreversible. El oxígeno es un requerimiento absoluto para el metabolismo de estos compuestos y no puede ser reemplazado por nitrato (93, 106, 114 y 244).

Vías catabólicas y su regulación .-

En lo relativo a las vías catabólicas y su regulación, como se indicó en el capítulo 1, la mayoría de las especies de Pseudomonas son capaces de usar una gran variedad de compuestos orgánicos como sustratos para su crecimiento. No es probable que todos estos compuestos estén constantemente en el medio ambiente natural

Los compuestos útiles en su crecimiento, son diferentes a los metabolitos intermediarios comunes de las enzimas inducibles.

La versátil nutrición de Pseudomonas, refleja la presencia de una cantidad importante de información genética especializada, que solo ocasionalmente es expresada.

Análisis fisiológico de mecanismos inductores .-

La mayoría de los sustratos útiles en el crecimiento de este género de bacterias, se usan en series complejas de reacciones catabólicas; la adición de un sustrato potencial para el crecimiento en el medio de cultivo, genera una serie de eventos inductivos, por ejemplo son expresados los genes estructurales de las enzimas catabólicas necesarias para metabolizar dichos sustratos.

Frecuentemente algunas enzimas son inducidas por un solo-metabolito, tales enzimas están bajo un control " inductivo coincidente ". Controles regulatorios similares participan al lado de las enzimas cuya síntesis es dirigida por " inducción coordinada " con la diferencia de que las velocidades relativas de síntesis de estas enzimas permanecen constantes en todas las condiciones de inducción, las enzimas sujetas a este tipo de control forman unidades de función fisiológica. El grado de inducción de una enzima de una unidad de función fisiológica, es una medida precisa del grado de inducción de cualquier otra enzima de la misma unidad.

El análisis de la secuencia catabólica para L - triptofano en diversas especies de Pseudomonas fluorescentes, ha revelado diversos intermediarios bioquímicos, así como también diferentes tipos de controles regulatorios y mecanismos inductivos que gobiernan la vía (26, 166 y 225).

Adaptación simultánea e inductores específicos .-

El principio de adaptación simultánea se basa en la suposición de que las enzimas catabólicas son inducidas en presencia de su sustrato y consecuentemente, que un organismo adaptado a la oxidación de un sustrato dado podría oxidar todos los metabolitos formados por su catabolismo.

Aunque este principio se ha encontrado con limitaciones, las evidencias promovidas por los experimentos basados en él son considerados como una alta tentativa en la elucidación de los esquemas generales de muchas vías catabólicas.

La síntesis gratuita de enzimas, no es debida a la carencia de un inductor específico. Más bien productos metabólicos específicos, están dotados de una función extensa que incluye la inducción de enzimas.

Se ha mostrado que hay enzimas que son inducidas por un -

número de metabolitos diferentes (115).

Una poca especificidad en la inducción y en la catálisis permite una flexibilidad metabólica, con la cual se logra que una gran gama de compuestos, sean catabolizados por este tipo de enzimas (105 y 113).

Represión por sustratos alternativos y productos metabólicos.

Un descenso en la velocidad de síntesis de una enzima (o grupo de enzimas), es denominado represión y como mínimo existen dos diferentes tipos de control represivo.

Uno de estos es la represión catabólica, que en Pseudomonas no ha sido completamente elucidado; pero se han llevado a cabo algunos estudios detallados sobre la represión de la síntesis de amidasa (52 y 273).

La velocidad de síntesis es fuertemente influenciada por la velocidad de dilución y ésta a su vez es también incrementada por la velocidad de síntesis de amidasa; pero a velocidades de dilución muy altas, la velocidad de síntesis de amidasa cae a un bajo nivel. Por lo que se concluye que una rápida velocidad de crecimiento como ocurre con una velocidad de dilución alta, está directamente relacionada con una severa represión catabólica (53).

La amidasa de Pseudomonas aeruginosa está sujeta a represión por varias amidas, las cuales no apoyan el crecimiento. Este tipo de represión fue llamada represión por amidas análogas y es un efecto de especificidad particular de la proteína reguladora de amidasa (31).

Un control regulatorio más específico es el de producto final o represión de metabolitos, en los cuales los productos de las vías, directamente reducen la velocidad de síntesis de las enzimas que dan acceso a ellos (196).

Los procedimientos requeridos para la identificación de productos represores no ambiguos, son muy similares a los usados para la identificación de inductores: por modificaciones químicas del supuesto compuesto represor o por aislamiento de cepas mutantes que no puedan metabolizar el metabolito represor (119 y 280).

Es requisito indispensable para que un metabolito sea considerado como represor, que no sea metabolizable.

Regulación por inhibición de enzimas .-

Hasta ahora habíamos considerado solamente la regulación a nivel de síntesis de enzimas; pero se ha ido adicionando considerable evidencia para apoyar la opinión de que el flujo catabólico, está fuertemente influenciado por la regulación de la actividad enzimática en Pseudomonas .

Un ejemplo lo constituye la enzima catabólica glucosa 6 - fosfato deshidrogenasa, la cual inicia la vía catabólica de Entner - Doudoroff. Esta enzima es inhibida por altas concentraciones de ATP o GTP (177).

Regulación por sistemas de captación .-

El metabolismo de Pseudomonas frecuentemente es regulado por un control en la captación de los sustratos potenciales para el crecimiento de estos organismos. No es sorprendente que muchos de los sistemas de transporte para compuestos que son metabolizados por enzimas inducibles, sean también inducibles.

En Pseudomonas aeruginosa se han estudiado sistemas de captación para diversos compuestos, algunos de los cuales son inducibles (161, 162, 163, 201, 209 y 232).

Vías convergentes.-

Las vías convergentes en el metabolismo de un organismo, permiten a un solo gen estructural participar en la utilización de

una gama de sustratos diferentes, lo que refleja un eficiente uso de la información genética.

Muchos ejemplos de tales vías convergentes en el catabolismo de Pseudomonas son conocidos: Alcanfor y valina, son utilizados vía Isobutiril - CoA; Cuatro diferentes carbohidratos y L - hidroxiprolina, son utilizados vía α Cetoglutarato. Dos difenoles: - protocatequato y catecol, representan los intermediarios aromáticos finales en el catabolismo de un gran número de sustratos; estos -- compuestos a nivel del β - ceto adipato enol - lactona de la vía -- del β Ceto adipato, constituyen el principal sitio de convergencia metabólica en este género de bacterias (60, 103 y 104).

Vías divergentes .-

El catecol puede ser metabolizado por alguna de las tres vías metabólicas de Pseudomonas (Fig. 3.1).

Algunos investigadores han reportado evidencias convincentes, de que estas tres vías pueden coexistir en la misma cepa bacteriana (39, 83 y 254 ¶).

La vía "orto", es altamente específica en catálisis e inducción. El catecol debe ser convertido a muconato para disparar la inducción de la oxigenasa "orto", este mecanismo parece aumentar la especificidad de inducción porque derivados metilados de catecol no inducen la síntesis de las enzimas "orto". En contraste con la oxigenasa "meta", en donde una gama de derivados alquil de catecol y el mismo catecol pueden inducir su síntesis.

La especificidad catabólica tolerante de la oxigenasa "meta" se refleja en la gran gama de compuestos que median su inducción.

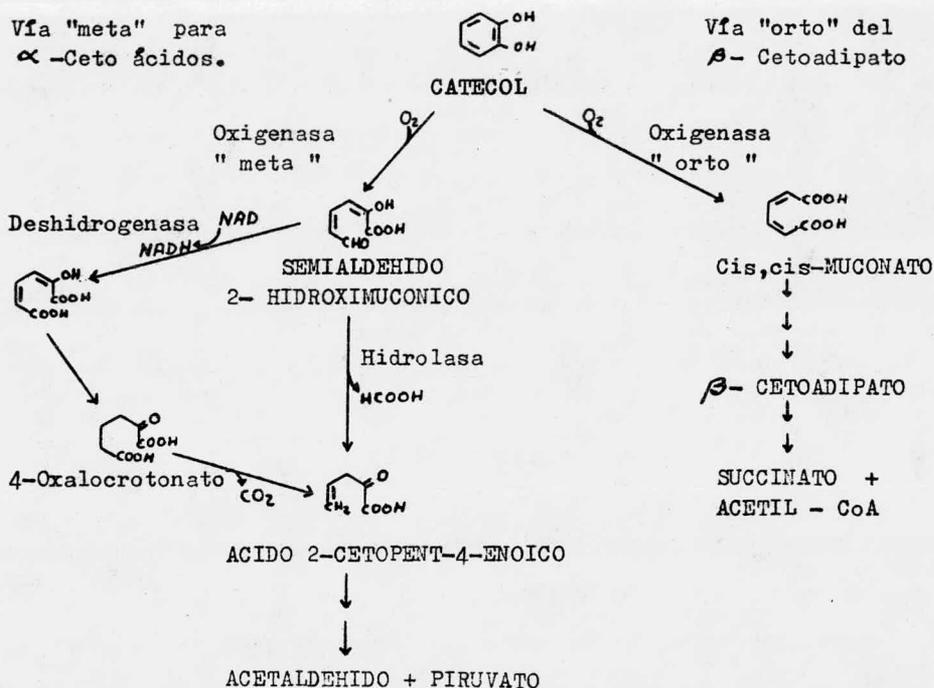
Genes acoplados para enzimas catabólicas .-

La evolución y el mantenimiento de las secuencias catabó-

licas de Pseudomonas, requieren mecanismos para el desenvolvimien_ to y conservación de muchos genes diferentes en la población natu_ ral. Se tiene una considerable cantidad de evidencias que mues_ tran que mucha de la información genética, para el vasto catabolis_ mo de estos organismos es poseída sólamente por una fracción de -- las cepas representativas; esta información puede ser transferida_ de un organismo a otro por transducción o conjugación.

Las translocaciones que favorecen el agrupamiento de genes estructurales, relacionados estrechamente con funciones catabólicas operan como unidades de función fisiológica (sujetos a inducción - coincidente). En algunas ocasiones, los genes para funciones cata_ bélicas estn contenidos en plásmidos, que pueden ser transferidos (70 y 247).

Fig. 3.1 Reacciones divergentes, en el catabolismo de - catecol en especies de Pseudomonas .



Vías biosintéticas y su regulación .-

Casi todas las especies de Pseudomonas, son no exigentes- y capaces de crecer en medios de cultivo con sales simples que con- tengan sales de amonio como fuente de nitrógeno y alguno de los mu- chos compuestos orgánicos, que pueden utilizar como fuente de car- bono.

Estos organismos están capacitados para sintetizar amino- ácidos, nucleótidos purina y pirimidina y todos los componentes ce- lulares esenciales.

Arreglos de genes para las vías biosintéticas .-

En lo relativo a las vías biosintéticas, pueden reconocer- se dos tipos de control: regulación de la actividad enzimática me- diante una inhibición por retroalimentación y regulación de la sín- tesis enzimática por represión del producto final.

En Pseudomonas aeruginosa y Pseudomonas putida, se ha en- contrado que los genes para cada una de las enzimas de las vías -- biosintéticas investigadas, están más esparcidos que los correspon- dientes para las enzimas de Escherichia coli (78 y 197).

Es ahora aceptado que el arreglo esparcido de genes bio- sintéticos que fueron encontrados en las especies de Pseudomonas - ya mencionadas, también ocurre en otras bacterias tales como ---- Acinetobacter por lo que no debe ser considerado como excepcional (258).

Mutantes reguladoras y uso de metabolitos análogos .-

Las mayores diferencias entre las especies de Pseudomonas y Enterobacteriaceae, fueron encontradas en los patrones de regula- ción de la actividad enzimática y en la síntesis de enzimas.

Los métodos clásicos para estudiar la regulación enzimáti- ca, dependen de la comparación de cepas naturales tipo con mutan__

tes reguladoras seleccionadas por su resistencia a la inhibición - del crecimiento por el empleo de metabolitos análogos. Esto no ha tenido un éxito completo con las especies de Pseudomonas, las cuales son notoriamente resistentes a metabolitos análogos, drogas y antibióticos (161, 162 y 303).

En algunos casos pueden encontrarse diferencias en la sensibilidad a análogos entre las especies de Pseudomonas (41).

Regulación de la actividad enzimática .-

La regulación de la actividad enzimática, normalmente se lleva a cabo por un control de inhibición por retroalimentación de una o más enzimas de la vía biosintética y puede reconocerse rápidamente por la cesación del crecimiento, cuando un análogo no metabolizable se adiciona al cultivo disminuyendo la acción del producto final. La importancia fisiológica de la inhibición del crecimiento por un análogo, se demuestra porque la inhibición lograda por el análogo puede ser llevada a cabo por el producto final, el análogo no debe ser capaz de sustituir la síntesis del producto final. Estudios en Pseudomonas indican que patrones de inhibición por retroalimentación en las vías biosintéticas, han demostrado que son efectivos para la economía celular y característicos del género (54, 64, 147 y 148).

Regulación de la síntesis de enzimas .-

En Escherichia coli la síntesis de enzimas biosintéticas, es normalmente reprimida en presencia del producto final y puede ser considerada como un control que tiene efectos en la economía celular por la conservación de energía y sustratos que pueden ser necesarios para la fabricación de enzimas; mientras que la inhibición por retroalimentación promueve un control fino, el cual responde rápidamente a cambios en la concentración de los productos -

finales .

Pocos de estos efectos han sido observados en Pseudomonas, esto podría deberse a alguno de estos puntos:

a).- Porque las enzimas biosintéticas de Pseudomonas no son regulables por represión.

b).- Porque la regulación de la represión, es tan eficiente que no puede ser interrumpida por los métodos aplicados a Escherichia coli .

c).- Porque la regulación muestra diferentes patrones.

Una diferencia en las actividades enzimáticas de cepas naturales tipo que crecieron en medios diferentes, puede interpretarse como represión o derrepresión de síntesis enzimática en presencia y ausencia del producto final de la vía (142).

C A P I T U L O 4

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE PSEUDOMONAS aeruginosa
DE FUENTES CLINICAS.

Pseudomonas aeruginosa, se multiplica rápidamente en los medios de cultivo, produciendo generalmente colonias, pigmentos y olor característicos.

Es una de las especies bacterianas más fácilmente aislada e identificada en especímenes clínicos, tales como: heridas, exudados, pus, orina, etc. . En estas situaciones, otras especies de Pseudomonas son raramente encontradas.

El muestreo bacteriológico del medio ambiente inanimado - (superficies, soluciones, etc.) se requiere a veces para estudios epidemiológicos, por ejemplo cuando se intenta rastrear la fuente de un brote de infección. De estos sitios también es generalmente fácil su aislamiento, aunque es probable que otras especies de Pseudomonas fluorescentes estén presentes y puedan ser confundidas a menos que se realicen pruebas confirmativas cuidadosas.

Una pequeña proporción de cepas de Pseudomonas aeruginosa son atípicas en la forma de las colonias o en la producción de los pigmentos característicos. Son por lo tanto apropiados métodos especiales para el aislamiento de fuentes clínicas, donde estos organismos presentan un especial riesgo infectivo para el paciente.

En la Bacteriología clínica es usual la inoculación de especímenes de heridas y de diversas fuentes, en agar sangre y en medio líquido, con la adición de medios selectivos o enriquecidos para la detección de organismos particulares.

Sin embargo, si Pseudomonas aeruginosa es típica y abundante, en forma normal es identificada sin dificultad en medios simples .

Métodos de aislamiento y detección .-

El aislamiento del microorganismo de fuentes clínicas, ha sido facilitado por el uso de medios selectivos que contienen cetrimida en una concentración de 0.03 % (193). Un criterio útil para su detección, es el reconocimiento de la fluorescencia característica, amarilla - verdosa ó azul - verde que presentan estos organismos cuando se examinan los cultivos en agar sangre o en medios selectivos con una lámpara de luz ultravioleta (190).

Estos métodos han sido mejorados por el uso del medio B - de King (168), el cual realiza la producción de fluoresceína con la base de agar cetrimida (35), por el reconocimiento de la fluorescencia de los cultivos bajo una lámpara de luz ultravioleta en un gabinete adecuado (194) y por el desarrollo de un medio que contiene 0.2 mg. de cetrimida y 15 mg. de ácido nalidíxico por mililitro de base (97 y 179) el cual es más selectivo y menos inhibitorio para Pseudomonas aeruginosa que el medio que contiene 0.03 % de cetrimida. El cloroxilenol, ha sido usado también en los medios de cultivo como un agente selectivo (99).

Se llevó a cabo un estudio comparativo de cuatro medios selectivos para el aislamiento de Pseudomonas, con los siguientes medios: agar Dettol (cloroxilenol), agar ácido nalidíxico - cetrimida y dos agares que contienen cetrimida recomendados por British Pharmacopoeia 1973 y por United States Pharmacopoeia, 19th ed. 1975

Los dos primeros medios de cultivo sirven para el aislamiento de pequeños números de bacterias.

El resultado de este estudio mostró que el agar Dettol, es mejor que los agares que contienen cetrimida para el aislamiento de Pseudomonas aeruginosa, puesto que los resultados indican -- que en este agar fueron detectadas más cepas (112).

Ha sido desarrollada como técnica de detección inmediata en infecciones severas de quemaduras expuestas, la fluorescencia - bajo irradiación con luz ultravioleta (236).

En un cultivo mixto, colonias altamente fluorescentes no deben ser asignadas a Pseudomonas, porque la fluoresceína difundirá rápidamente a través del medio y puede ser absorbida por las colonias vecinas, las cuales quedan brillantemente fluorescentes, por ejemplo este fenómeno se presenta con cultivos mixtos en los que se encuentran Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Proteus sp y otras especies (137). La detección de Pseudomonas aeruginosa en cultivos mixtos, también se ha llevado a cabo en base a la producción de piocianina en agar leche (32).

Identificación .-

El crecimiento bacteriano a partir de fuentes clínicas, muestra fluorescencia azul - verde ó amarillo - verdosa después de 18 - 24 horas de incubación a 37°C. en agar cetrimida ó en agar ácido nalidixico - cetrimida; casi todas las cepas de Pseudomonas aeruginosa presentan en estos medios fluorescencia.

Es a menudo necesario confirmar, que una cepa de Pseudomonas fluorescentes es Pseudomonas aeruginosa, especialmente en estudios epidemiológicos de las cepas aisladas del medio ambiente inanimado, una gama relativamente pequeña de pruebas para la caracterización taxonómica del microorganismo en estudio son las apropiadas para este propósito y son discutidas por Colwell R.R. (57) y Liston y col. (180).

Quizá las más útiles son:

1.- Producción de piocianina en el medio modificado de Sierra (301), en el medio A de King (168) ó en el agar leche (32) en el cual también se muestra la hidrólisis de caseína llevada a cabo por este microorganismo. Cerca del 90 % de las cepas producen un pigmento no fluorescente azul, soluble en cloroformo cuando crecen en estos medios especiales, otras especies de Pseudomonas no producen este pigmento.

2.- Oxidación de gluconato y producción de la capa viscosa extracelular en un medio líquido que contiene gluconato de potasio.

3.- Crecimiento a 42°C.

4.- Reducción de nitrato a nitrógeno gaseoso.

5.- Crecimiento con producción de colonias rojas en agar-cloruro de tetrazolio al 1% (263).

En adición a estas pruebas específicas, existen otras --- pruebas para todo el género Pseudomonas que son apropiadas para estudios detallados, especialmente la reacción de oxidasa (170), el metabolismo oxidativo de glucosa (136) y la reacción dihidrolasa de arginina (296).

Phillips (231) ideó un esquema para el aislamiento e identificación de Pseudomonas aeruginosa, dentro de 24 a 48 hrs. la -- gran mayoría de las cepas son identificadas por producción de piocianina.

Tipificación de cepas .-

Pseudomonas aeruginosa puede ser subdividida por métodos de tipificación serológica, tipificación por fagos ó tipificación por bacteriocinas (piocina ó aeruginocina) .

La tipificación de cepas es esencial en estudios epidemiológicos, un solo método no da mucha información como la que se puede obtener por combinaciones de por lo menos dos métodos; la combinación entre los métodos de tipificación por fagos y la tipificación serológica ó la tipificación por bacteriocinas resulta más -- conveniente que la combinación entre los métodos de tipificación serológica y tipificación por bacteriocinas; debido a la estrecha correlación que muestran estos métodos (59).

Tipificación por fagos .-

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa pueden ser tipificadas en base a su capacidad lisogénica ó a su sensibilidad frente a un equipo de fagos.

Los métodos para tipificación por fagos con propósitos -- epidemiológicos fueron iniciados hacia 1960 (99, 100 y 238).

A partir de esta fecha, muchos han sido los investigadores que han tratado de constituir equipos de fagos (líticos ó lisogénicos) con el fin de obtener un mayor porcentaje de cepas tipificables (19, 20, 21, 22, 198, 226, 271 y 283).

Hay que hacer notar que el mayor porcentaje de cepas tipificables (95.5 %), fue reportado en Noruega por Bergan (22). Quién con el objeto de establecer condiciones de estandarización en la tipificación y reducir al máximo la proporción de cepas no tipificables, seleccionó de 113 fagos disponibles internacionalmente y que han sido usados por otros investigadores, un equipo de 24 fagos tipificadores (19 de los cuales constituyen el equipo primario y 5 el equipo auxiliar). La eficiencia del nuevo equipo sobre los equipos previos, indicó algunos incrementos en la proporción de cepas tipificables (95.5 %) y arriba de 240 espectros líticos fueron encontrados con el primer equipo.

Hay una falta de reproducibilidad en patrones líticos de fagos cuando las cepas son probadas en varias ocasiones, en unos pocos días ó después de un almacenamiento de unos cuantos meses ó cuando es tipificada por diferentes observadores (23, 25, 271 y -- 283).

Cuando se probaron cultivos de cepas liofilizadas, las variaciones en la tipificación por fagos fueron más extensas (25).

Tipificación serológica .-

Algunos investigadores han desarrollado esquemas para la-

serotipificación del microorganismo en estudio, lo cual permite — una diferenciación entre las cepas de la especie.

Los esquemas más frecuentemente usados son el de Verder y Evans (299) y el de Habs (107), en los que se emplean técnicas de aglutinación - absorción respectivamente.

Muraschi y col. (206) correlacionaron estos dos esquemas. Fisher (87) publicó todavía otro esquema para la diferenciación de estos organismos a nivel de subespecies, sobre la base de los también llamados antígenos protectores. Hanessian y col. (111) reportaron que estos antígenos protectores, preparados por extracción - con ácido tricloroacético y precipitados con alcohol, consistían - de un gran polisacárido y proteína. La parte de los polisacáridos - responsable de la especificidad del antígeno " O " está localizada en la fracción del alto peso molecular del polisacárido, obtenida - después de una hidrólisis con ácido acético (50).

Tipificación por bacteriocinas .-

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa pueden ser tipificadas por su capacidad piocinogénica ó por su sensibilidad a piocinas.

Una importante ventaja de la tipificación por piocinas es su simplicidad con respecto a la tipificación por fagos y a la serología, en las cuales se requiere mantener una adecuada gama de - fagos ó de antisueros, respectivamente.

Gillies y Govan (95) desarrollaron un método para evidenciar la piocinogenicidad, el cual requería que la cepa a probar se inoculara mediante un rayado en la placa de agar nutritivo, a las 14 - 18 hrs. de incubación a 32°C. , el crecimiento bacteriano se eliminaba y la superficie del agar se exponía a cloroformo para matar a las bacterias residuales. Posteriormente, se inocularon cepas indicadoras (para detectar la producción de piocina) mediante-

un rayado sobre la superficie de la placa de agar nutritivo, en ángulos rectos a la inoculación original continuándose la incubación durante 8 - 18 hrs. a 37°C. .

Si son producidas piocinas por la cepa de prueba se difunden en el medio durante el primer periodo de incubación y ejercen su actividad inhibitoria sobre la cepa indicadora durante el subsecuente periodo de incubación. El tipo de piocina de la cepa probada se reconoce por los patrones inhibitorios producidos en los indicadores.

Se han hecho modificaciones a este método básico, una ventaja es el hecho que el antibiótico Mitomicina C, induce la producción de piocina (156).

Ha sido reportado (79 y 297) que el periodo de incubación cuando se induce la producción de piocina, puede ser considerablemente acortado (6 hrs. a 32°C.) con respecto al periodo correspondiente (14 - 18 hrs. a 32°C.) del método anterior.

Se encontró también que la inducción con Mitomicina C permite la tipificación de cepas que no fueron tipificables por los - procedimientos de Gilles y Govan. Esto tiene una considerable ventaja en los procedimientos rutinarios de tipificación con própositos epidemiológicos.

Con el fin de poder llegar a tipificar el mayor porcentaje de cepas, algunos autores han empleado diferente número de cepas indicadoras, con las que se ha obtenido al mismo tiempo diferencias en los tipos de piocinas que se han reportado (18, 61, 95, 300 y 319). A este respecto Gilles y Govan usando 8 cepas indicadoras para tipificar 3227 cepas, encontraron que el 88 % de las cepas son tipificables dentro de 36 tipos de piocinas. La reproducibilidad de los patrones de piocinogenicidad por los procedimientos de estos autores, es buena. Un hecho que confirma esta aseveración es el siguiente: cepas que estuvieron almacenadas durante dos años,

dieron el mismo patrón de piocinogenicidad que el que se obtuvo antes de su almacenamiento.

Govan y Gillies (100) desarrollaron un esquema de tipificación, que es útil al buscar las fuentes de infección en el medio ambiente hospitalario (295).

Se ha investigado también una técnica de utilización simultánea de piocinogenicidad y sensibilidad a piocina para la tipificación (79).

La tipificación por piocinas, ha sido extendida a cepas mucoides de Pseudomonas aeruginosa (309). Estas cepas tienen una importancia particular, porque son comunmente asociadas con la fibrosis quística del páncreas en los niños. Aunque inicialmente no pudieron tipificarse por los métodos estandar (95), las cepas mucoides pueden ser tipificadas ahora después de la inducción con Mitomicina C; en medios de cultivo líquido se requiere que el cultivo sea lisado, para poder ser probado frente a indicadores estandar.

La importancia de las cepas mucoides, se sitúa en el hecho de que se encontraron simultáneamente cepas mucoides y no mucoides en el mismo paciente, en algunos casos ambas cepas tienen el mismo tipo de piocinas, lo que sugiere que son variantes de la misma cepa y que el derivado mucosido tiene propiedades patógenas particulares relacionadas con los factores clínicos de la fibrosis quística.

C A P I T U L O 5

INFECCIONES CAUSADAS POR Pseudomonas aeruginosa.

Las infecciones clínicas causadas por Pseudomonas aeruginosa incluyen: infecciones locales de heridas (especialmente que maduras), del aparato urinario, del aparato respiratorio, del intestino, de los ojos y de los oídos, e infecciones generalizadas (septicemia), que aparecen primero como infecciones locales en pacientes con un mecanismo de resistencia deteriorado lo que permite el desarrollo de focos metastásicos.

En algunos pacientes con infecciones locales, la enfermedad general puede ocurrir sin evidencias de una toxemia. Se han descrito las características clínicas y los factores patológicos de infecciones invasivas (241, 275 y 291).

Los organismos invaden las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, produciendo arteritis inflamatoria y trombosis con oclusión arterial desarrollando pequeñas áreas de necrosis (infartos).

A veces ocurre que la infección generalizada (septicemia) permite el desarrollo de focos característicos de lesiones embólicas, apareciendo primero como máculas o pápulas que incrementan su tamaño, endureciéndose y desarrollando un centro negro necrótico y hemorrágico del cual puede obtenerse un crecimiento abundante de Pseudomonas aeruginosa en un cultivo. Cuando estas lesiones son superficiales, comúnmente terminan por ulcerar la piel.

Los focos hemorrágicos y las úlceras profundas "ectimas" son muy características de septicemias por Pseudomonas, sin embargo no se encuentran en todos los casos de tales infecciones.

La leucocitosis neutrofilica y la pirexia están típicamente asociadas con infecciones piógenas y a menudo se encuentran en-

pacientes con sepsis por Pseudomonas, en algunos casos quizá es debido a la coexistencia de infecciones estafilocóccicas.

Las sepsis por Pseudomonas son mejor caracterizadas por una reducción en la cantidad de leucocitos, la cual puede manifestarse por una leucocitosis neutrofilica inicial, otros factores característicos son: hipotermia que se presenta después de una pueria inicial, caídas súbitas de la presión sanguínea, anuria e fleo paraltico.

Mientras que algunas infecciones por cocos, se asocian comúnmente con confusión mental, el estado mental de los pacientes con septicemias por Pseudomonas es generalmente claro (235).

El pronóstico para pacientes que desarrollan septicemia por Pseudomonas es malo. Algunos autores han reportado una muy alta mortalidad, algunas veces el 100 % (178), otros han reportado proporciones variables de supervivientes (154).

Es invariable que cuando se emplean antibióticos con una alta actividad contra bacterias, en casos en los que no se justifica un espectro tan amplio y posteriormente se diagnostica una septicemia por Pseudomonas, el tratamiento puede fracasar si se emplean antibióticos con el mismo espectro que los utilizados primeramente (154). Un signo característico, que puede aparecer en infecciones invasivas severas por Pseudomonas aeruginosa es verdoglobinuria, la cual consiste en la excreción de un pigmento fluorescente verde derivado de la hemoglobina en la orina, que puede ser claramente diferenciado de los pigmentos fluoresceína y piocianina (281).

Patogénesis

Infecciones en animales .-

Cambios patológicos similares a los encontrados en infecciones invasivas humanas, pueden obtenerse por la inoculación de -

cultivos de Pseudomonas aeruginosa en animales, las inyecciones intravenosas e intraperitoneales de cepas virulentas en ratones, --- muestran un rápido desarrollo de septicemia, debido a lo cual los animales mueren entre las 24 a 48 horas siguientes a la inyección. Con pequeñas dosis intravenosas, se puede lograr una infección progresiva, la cual está caracterizada por abscesos múltiples en los riñones de los ratones sujetos a estos experimentos (96).

Se obtuvo una infección progresiva con un desarrollo gradual de los signos característicos (pérdida de peso, pirexia seguida de una hipotermia, lesiones locales en riñones, hígado, bazo y por último septicemia) que permitió la muerte en un período de 3 a 10 días, después de la inoculación en quemaduras hechas en ratones y ratas, con una cepa virulenta de Pseudomonas aeruginosa (154, --- 291, 292, 293 y 302).

En conejos la inyección intradérmica, permite el desarrollo de una gran lesión papular o pustular con cambios histológicos característicos pero sin producir la muerte a los animales (89).

Teplitz (291) inoculó cepas de Pseudomonas aeruginosa en las quemaduras que ocupaban el 20 % de la superficie total del cuerpo de unas ratas; cerca del 90 % de los animales murieron durante los 15 días posteriores a la inoculación. Las autopsias ejecutadas inmediatamente después de la muerte mostraron al microorganismo en los cultivos hechos de sangre, bazo e hígado; el 85 % de las ratas desarrollaron lesiones sépticas metastásicas, además de lesiones hemorrágicas y necróticas en los pulmones, hígado, riñones y bazo.

Los cambios histopatológicos incluyeron una infiltración densa y adventicia del medio, con bacilos Gram negativos en arterias y venas (vasculitis por Pseudomonas) y dobleces perivasculares de arterias y venas debidos a agrupamientos estrechos de bacilos.

La perivasculitis bacilar. En las grandes arterias se -- presenta una barrera a la penetración bacteriana, debido al fuerte

confinamiento que ejerce la membrana elástica externa y la membrana basal del vaso, pero la mayoría de los vasos con los que está involucrada la perivascularitis bacilar, son pequeños y sin membrana elástica externa. La colonización de las paredes de los vasos, es una etapa preliminar hacia la invasión del torrente sanguíneo.

Virulencia .-

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa varían grandemente en su virulencia para los ratones como lo muestran las diferentes LD₅₀ para las inyecciones intraperitoneales ó por la mortalidad de los ratones, en los que se inocularon cultivos a una pequeña quemadura reciente.

Por técnicas recientes se ha mostrado que algunas cepas (en dosis de cerca de 7×10^8 bacterias), causan la mortalidad del 70 al 80 % de los animales de un lote, por septicemia; mientras que otras cepas no incrementan la mortalidad anterior cuando se encuentran en quemaduras en ratones no infectados con la cepa anterior (154). Cepas reportadas como avirulentas cuando se inocularon en quemaduras, fueron capaces de causar la muerte de los ratones cuando se desarrollaron abundantemente en las heridas (151).

Cepas aisladas del moco bronquial de pacientes con fibrosis quística del páncreas ó con bronquiectasia, a menudo producen colonias mucoides que pueden ser capsuladas (48 y 65). Las variantes mucoides usualmente emergen de los bronquios de pacientes que primeramente fueron colonizados por colonias rugosas típicas de Pseudomonas aeruginosa (67).

La virulencia bacteriana es realizada por la posesión de una envoltura mucóide, la cual protege a estos organismos contra la fagocitosis y los antibióticos. Es común sin embargo, que las cepas virulentas que causan infecciones en quemaduras produzcan colonias no mucoides.

Factores tóxicos .-

Las cepas del microorganismo en estudio producen una gran variedad de toxinas extracelulares, algunas de las cuales contribuyen para la patogenia de estas bacterias.

Liu y sus colegas (7, 181, 183, 185, 186, 187 y 188) han estudiado el papel de varias fracciones obtenidas de cultivos, concluyendo que este microorganismo se diferencia de otros bacilos — Gram negativos en la actividad patológica de sus productos extracelulares. En particular, la patogenicidad en las bacterias Gram negativo ha sido adscrita a endotoxinas, sin embargo Pseudomonas aeruginosa siendo un bacilo Gram negativo es la excepción, puesto que las toxinas extracelulares son más tóxicas que sus lipopolisacáridos (endotoxinas).

Entre las enzimas extracelulares se cuentan las enzimas — proteolíticas, el material designado como proteasas parece no ser una entidad simple, sino una mezcla, El fluido sobrenadante de un cultivo generalmente contiene dos o tres proteasas, que pueden ser separadas por métodos físicos (203), generalmente licuan la gelatina, clarifican la leche y disuelven la elastina y fibrina; su actividad como colagenasas no es la clásica puesto que atacan el péptido terminal de la colagena natural y liberan aminoácidos y péptidos de este sustrato, en vez de liberar hidroxiprolina (213).

Las enzimas proteolíticas pueden ser producidas en altas concentraciones en los medios de cultivo que no contienen glucosa y su actividad se incrementa en presencia de ácido láctico, el cual tiende a acumularse en los tejidos dañados (155).

Carney y Jones (44) estudiaron las propiedades biológicas de los filtrados de cepas virulentas y no virulentas, en base a su toxicidad, actividad enzimática y a sus propiedades inmunológicas, mostrando que se produce una mayor actividad proteolítica por parte de las cepas virulentas.

La inyección de proteasas de Pseudomonas aeruginosa dentro de la piel de animales, induce la formación de lesiones hemorrágicas en unos pocos minutos y en casi 24 hrs. estas lesiones se hacen necróticas (182). Las enzimas proteolíticas producidas son responsables de la destrucción del tejido corneal cuando los ojos son infectados por este microorganismo (171), así como también de las hemorragias dentro de los órganos internos, en particular de los pulmones, en las infecciones sistémicas (85).

Sin embargo, los efectos de las proteasas son muy localizados y no tienen por sí mismos propiedades letales (204, 205 y 66) pero pueden determinar el grado de virulencia, por ser un factor importante en la invasión de los tejidos por estas bacterias.

La producción de sustancias hemolíticas por Pseudomonas aeruginosa fue demostrada en 1900, pero la naturaleza del sistema involucrado fue determinada hasta mediados de 1960 por Kurioka y Liu (173).

Se sabe que las cepas producen dos sustancias hemolíticas, una termolábil, la cual es una fosfolipasa C que libera fosforilcolina de lecitina (74) y la otra es termo-resistente y es un glicolípido. Las dos sustancias son producidas concomitantemente en un medio ambiente con un alto contenido de carbohidratos y un bajo contenido de fosfato (181).

El glicolípido funciona como detergente en la solubilización de fosfolípidos, de aquí que realce la actividad de la fosfolipasa C (173). La producción de ésta por Pseudomonas aeruginosa, es inhibida por varios fosfatos inorgánicos y orgánicos, esto es único para esta especie (181).

Una preparación purificada del glicolípido, muestra que esta sustancia no es extremadamente tóxica, puesto que se requieren cerca de 5 mg para matar a un ratón (270). Cuando una preparación de la fosfolipasa C se inyecta dentro de la piel de animales, en aproximadamente 24 hrs. se produce un absceso central, rodeado -

por una área de enrojecimiento e induración (182). La inyección de la misma por vía intraperitoneal produce necrosis hepática, además de edema pulmonar (186).

La fosfolipasa C tiene un lugar importante en la patogénesis de la neumonía. Las membranas alveolares están cubiertas con una sustancia llamada dipalmitil lecitina, la cual es un agente tensoactivo que impide la adherencia de las superficies internas de los alvéolos, con lo que se previene la atelectasia. El principal componente de este agente tensoactivo es la lecitina, por lo tanto la producción de fosfolipasa por un microorganismo infectante, se refleja en la destrucción de este agente con la consecuente atelectasia (186).

Pseudomonas aeruginosa produce pequeñas cantidades de ácido cianhídrico, en el medio de cultivo y en los cuerpos de animales (47) siendo inverosímil que este producto alcance niveles tóxicos durante las infecciones in vivo de animales y de humanos; el cianuro producido en la colonización de extensas quemaduras, puede contribuir algunas veces al total de los efectos patogénicos, sin llegar a ser un factor determinante.

Con respecto a la piocianina, se ha mostrado que tiene efectos tóxicos en los cultivos de fibroblastos y en las células epiteliales. La concentración de piocianina responsable de la necrosis de las células epiteliales es muy pequeña, tanto que es común encontrarla en el exudado de quemaduras infectadas; pero esta concentración de piocianina, es capaz de interferir en la aceptación de los injertos de piel que es necesario efectuar en los pacientes que han sufrido extensas quemaduras.

Otro aspecto que debe ser considerado, es la capacidad que tienen los pigmentos para suprimir la flora bacteriana y reemplazarla por Pseudomonas aeruginosa, hecho que es común en las infecciones crónicas (186).

La capa viscosa extracelular de la superficie celular de esta bacteria, está constituida por polisacáridos (33), los cuales tienen probablemente una función similar a la de los polisacáridos capsulares de los bacilos Gram negativos (evitan la fagocitosis e incrementan la virulencia)(262 y 265). Sin embargo esta capa viscosa no se encuentra firmemente unida a la superficie celular (187), su toxicidad varía considerablemente de una preparación a otra y las fracciones purificadas de los polisacáridos generalmente no son tóxicas (2). La toxicidad de la capa viscosa cruda, probablemente refleja la presencia de exotoxinas (186).

Liu (182) efectuó el aislamiento de la cepa PA 103, en su afán por encontrar una cepa no proteolítica que produjera lecitina sa. Esta cepa mostró ser letal para el ratón cuando se aplicó por vía intraperitoneal, los ratones murieron entre las 4 y 6 hrs. posteriores a la inyección, por lo que se sugirió necesaria la formación de toxinas.

La toxina letal aislada fue destruída por calentamiento a 70°C, durante 15 min. y por exposición a tripsina; además mostró ser inestable a pH menores a 7. En base a los datos disponibles se concluye que :

- 1.- No existe relación entre los antígenos somáticos de este microorganismo y la toxina.
- 2.- Su producción no involucra autólisis.
- 3.- La posibilidad de ser de naturaleza proteica es muy alta.

Liu en 1973 (185), designa a la toxina letal producida por la cepa PA 103 de Pseudomonas aeruginosa como exotoxina A. Un mínimo de dos o tres serotipos de esta exotoxina pueden ser producidos por este microorganismo, los cuales se han designado con las letras B y C, pero debido a su inestabilidad no han sido caracterizados (186).

Bjorn y col. (27), efectuaron un estudio sobre la producción de la exotoxina A en varias especies de Pseudomonas con el siguiente resultado: la mayoría de las cepas que fueron aisladas de pacientes con infecciones del aparato urinario, heridas y septicemia (90 % de 111 aislamientos) fueron capaces de producir exotoxina A y raramente o nunca fue detectada la producción de esta exotoxina en otras especies de Pseudomonas que no fueran aeruginosa.

Vasil y col. (298), mostraron que la exotoxina A es producida como una sola cadena polipeptídica, con un peso molecular de " 75,000 " daltons. El punto isoeléctrico de esta proteína está a un pH de 5.1, el nitrógeno terminal corresponde a arginina y contiene en su estructura cuatro puentes disulfuro (176).

La exotoxina A, es producida como una proenzima tóxica — que carece de actividad enzimática; la actividad de adenosina 5' - ribosil difosfato transferasa, se manifiesta cuando la molécula se desnaturaliza y se reduce, ó cuando se divide por la acción de las proteasas de Pseudomonas aeruginosa produciéndose un fragmento enzimáticamente activo (fragmento a) el cual tiene un peso molecular de " 27,000 " daltons y una proteína que tiene un peso molecular de " 45,000 " daltons que ha sido identificada como el fragmento b de la exotoxina, el cual es enzimáticamente inactivo. Por lo que se concluye que la exotoxina natural (proenzima) como tal, es indispensable para que se manifieste la toxicidad; así como también es requisito indispensable que ocurra un rearrreglo estructural, para que se manifieste la actividad intracelular (298).

La exotoxina A inhibe la síntesis de proteínas en mamíferos, por el mismo mecanismo que la toxina diftérica (138 y 139) ambas toxinas catalizan la transferencia de la porción adenosina 5'-ribosil difosfato (ADP) del nicotinamida adenin dinucleótido (NAD), al factor 2 de elongación, el cual queda de esta manera inactivado, originándose por esto el bloqueo de la elongación de la cadena de-

péptidos que se está sintetizando.

Esta exotoxina, ha sido reportada como el factor tóxico - responsable de la letalidad de las infecciones causadas por este - microorganismo en animales y humanos (7, 139, 185, 186, 227 y 298).

Patología

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa, producen lesiones -- características en el tejido vivo de cualquier parte del cuerpo -- con los factores histológicos descritos anteriormente.

En algunos pacientes, estos cambios locales están asociados con septicemia ó piemia por el desarrollo de lesiones metastásicas en la piel, las meninges, el endocardio, etc. . Pueden ocurrir enfermedades generalizadas por la absorción de toxinas, sin haber evidencias de diseminación de las bacterias por el torrente-sanguíneo (240 y 293).

Quemaduras y heridas .-

Comúnmente el microorganismo en estudio aparece como un - organismo predominante en la colonización de las heridas por quemaduras en pacientes hospitalizados (56 y 191), la extensión del área quemada es un factor importante para el establecimiento de este microorganismo; entre mayor sea el área lesionada, hay una mayor probabilidad de que ésta sea colonizada(240).

Una vez que se han producido las heridas, éstas sirven como medio de cultivo, hecho que facilita la colonización por los microorganismos que tienen la capacidad de poder proliferar en las - escaras (tejido avascular), difundiéndose a través de ellas al espacio subepitelial, el cual delimita el tejido viable del no viable.

Si el proceso de proliferación no es inhibido y la densidad bacteriana excede a 10^5 organismos / g. de tejido, es probable que el tejido viable sea invadido.

Los signos clínicos que ponen de manifiesto la infección de las heridas producidas por quemaduras, son principalmente hemorragia dentro de la herida, formación de flictenas con rastras linfagéticas en el tejido lesionado, abscesos metastásicos en el tejido no quemado (cuando estas lesiones involucran la piel son conocidas como ectimas), lesiones vesiculares en las heridas ya curadas, etc.

Cuando está lesionada una gran área de tejido, la vasculitis asociada puede permitir la diseminación de los microorganismos por el torrente sanguíneo, causando una sepsis sistemática.

La hipotermia, la leucopenia y el fleo parafítico, asociados con la distensión abdominal, son los factores clínicos sobresalientes que establecen la sepsis.

En 1960, las infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa, fueron reconocidas como la causa más importante de la muerte de pacientes con quemaduras severas, por lo que el riesgo a la infección es mucho menor en las quemaduras que no involucran todas las capas que constituyen la piel. En estudios realizados mediante arteriografías, se ha mostrado que una quemadura parcialmente grave (3^{er} grado) puede originar la destrucción completa de la piel como resultado de la infección (220 y 221).

En los pacientes en los que es imprescindible llevar a cabo injertos de piel para que puedan sanar sus heridas, la infección puede interferir con la aceptación del injerto y en consecuencia retrasar la curación.

Las diferentes cepas tienen un papel relativamente pequeño como causa de sepsis en heridas traumáticas y quirúrgicas, los brotes de infección en este tipo de heridas puede deberse al uso de materiales contaminados, lo que propicia la infección de tejidos susceptibles (282). Se han reportado también algunas cepas como responsables de ostiomielitis (17).

Piel .-

Se encuentran algunas cepas comúnmente entre la flora bacteriana de los exudados eczematosos infectados (210 y 264), reportándose además piodermitis extensas en pacientes con dermatitis no eczematosa (108).

Las inmersiones frecuentes y prolongadas de las manos y de los pies en el agua, predisponen hacia la infección del epitelio macerado por ejemplo, en el síndrome Verde de las uñas (288 y 289).

En pacientes con enfermedades inmunodeficientes o con severas quemaduras, pueden aparecer en la piel úlceras eczematosas características, asociadas con piemia debida a Pseudomonas aeruginosa (275).

Los infantes son especialmente susceptibles a las infecciones produciéndose lesiones en la nariz y en la garganta (146).

Aparato Urinario .-

Las infecciones del aparato urinario pueden dividirse en:

- 1.- Infecciones primarias .- en las cuales no hay predisposición a la enfermedad .
- 2.- Infecciones secundarias .- ocasionadas por recaídas e infecciones que surgen después de tratamientos quirúrgicos ó de instrumentación (cateterismo, endoscopia, etc.).

Las infecciones primarias casi siempre son causadas por Escherichia coli, microorganismo derivado de la flora intestinal del paciente y generalmente sensible a todas o a la mayoría de drogas antimicrobianas.

Las infecciones secundarias son causadas por bacterias adquiridas de fuentes externas, en las que se incluyen cepas multiresistentes de otros pacientes y cepas adquiridas del medio inani

mado. Entre los microorganismos que se han identificado como responsables de estas infecciones se encuentran bacilos coliformes, - Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa y Klebsiella sp. (98).

Las infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa en el aparato urinario, pueden permanecer localizadas en la vejiga (cistitis) ó pueden ascender a través de los ureteros a la pelvical renal, a partir de la cual se puede invadir el tejido renal causando pielonefritis.

En infecciones septicémicas pueden ocurrir lesiones locales en el riñón, similares a las encontradas en las infecciones producidas en animales de experimentación (291 y 294), tales lesiones desarrollan pielonefritis corticomedular ó cortical sin involucrar la médula.

Myerowitz y col. (207), han encontrado que las cepas de Escherichia coli y de Pseudomonas aeruginosa obtenidas en la orina de pacientes con infecciones del aparato urinario, poseen antígenos que dan una reacción cruzada con los polisacáridos capsulares de Streptococcus pneumoniae tipos I y III, también con los grupos C y H de Neisseria meningitidis y con el tipo B de Haemophilus influenzae. Estos antígenos son semejantes al antígeno K de E. coli, el cual confiere a la bacteria características que le permiten ser la causa de la infección del parénquima renal.

Aparato respiratorio .-

Normalmente Pseudomonas aeruginosa, no es patógeno del recubrimiento bronquial, por lo que es probable que nunca ocurran -- bronquitis o traqueitis primarias causadas por este microorganismo; sin embargo, han ido incrementándose los reportes de estas infecciones en el aparato respiratorio todas asociadas con lesiones preexistentes, con instrumentación quirúrgica, con el uso de nebulizadores ó con tratamientos con antibióticos ó esteroides (14, 234 y-

284). Particularmente en la fibrosis quística, causa bronconeumonías severas e intratables; los microorganismos asociados que generalmente aparecen en una etapa avanzada de la enfermedad son: Staphylococcus aureus y Haemophilus influenzae .

Burns y May (37), demostraron la presencia de anticuerpos (precipitinas y aglutininas) contra Pseudomonas aeruginosa en el suero de pacientes con fibrosis quística, considerando el desarrollo de anticuerpos en la colonización del aparato respiratorio, como una evidencia implícita de la patogenicidad de este microorganismo; esta opinión se sugirió por el hecho de que los anticuerpos — presentes en el suero, están generalmente asociados con cepas mucoides, las cuales predominan en los pacientes más severamente enfermos (65, 212 y 246).

Los síntomas clínicos en las bronconeumonías causadas por este microorganismo, corresponden a una infiltración masiva de las bacterias dentro de las paredes de arteriolas y vénulas, con una respuesta inflamatoria mínima, existiendo in cambio necrótico difuso alrededor de las paredes de los alveolos adyacentes (14).

Infecciones en los ojos .-

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa pueden causar conjuntivitis, lesiones necróticas en los párpados y dacriocistitis. Sin embargo, los tipos más importantes de infección, son aquellos que involucran las cámaras de los ojos.

Si el microorganismo tiene acceso a la cámara anterior — del ojo, causa hipopión y es probable que se desarrolle una panofthalmitis (69).

Se encontró que las lesiones iniciales causadas en la córnea, conducen a úlceras severas que tienen como consecuencia la — pérdida del órgano afectado, siendo éste un microorganismo particularmente peligroso en los ojos lesionados (34, 38, 58, 140 y 167).

La cámara anterior del ojo es peculiarmente susceptible a las infecciones por microorganismos oportunistas (Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, etc.).

Crompton (58) realizó experimentos en conejos en los que inyectó unas cuantas bacterias (50) dentro de la cámara anterior - de cada uno de los ojos con lo que ocasionó una severa infección - que tuvo como consecuencia la pérdida de los órganos; un efecto similar se tuvo al inyectar 9000 células de Staphylococcus aureus - dentro de la cámara anterior de cada uno de los ojos de otros conejos.

Las bacterias pueden entrar a la cámara anterior del ojo, como resultado de una lesión o enfermedad corneal, así como también a través de hendiduras asépticas durante una operación quirúrgica.

Las fuentes de este microorganismo que causan infecciones en los ojos incluyen a las soluciones usadas con irrigador y a las gotas para los ojos, por ejemplo: las soluciones de fluoresceína - usadas para localizar abrasiones corneales, pueden ser la causa de la contaminación de los sitios afectados, las operaciones que exponen la cámara anterior, como sucede cuando se remueven cataratas, - representan un riesgo particular (9 y 58). También se han reportado brotes de endoftalmitis, cicatrizaciones de la córnea con disminución de la visión y conjuntivitis, todas ellas asociadas al uso de soluciones contaminadas por este microorganismo (9 y 58).

Infecciones en los oídos .-

Comúnmente Pseudomonas aeruginosa, se encuentra en el exudado de la otitis externa, la humedad del meato auditivo externo - favorece su crecimiento en este sitio (255 y 304).

Se encuentra asociada particularmente con pericondritis, - la cual es una infección dolorosa de la aurícula complicada con --

otitis externa (76 y 320) . También ha sido hallada en el exudado de las otitis medias, donde generalmente aparece como un invasor secundario.

Endocarditis .-

Endocarditis bacterianas agudas, son una complicación ocasional de las septicemias por Pseudomonas aeruginosa (46, 241 y 256).

Infecciones del sistema nervioso central .-

Las meningitis causadas por esta bacteria están reconocidas como contaminaciones, originadas durante el desarrollo de diferentes procesos, por ejemplo: en las punciones lumbares, en las operaciones neuroquirúrgicas, en la diseminación por medio de procesos mastoideos de las infecciones de los oídos, en las transfusiones, etc. tales infecciones son a menudo fatales (169 y 215).

Ayliffe y col. (8) reportaron que la contaminación del material empleado en los equipos de curación, es capaz de ocasionar brotes infecciosos.

Meningitis y abscesos cerebrales se presentan después de transfusiones con sangres contaminadas con Pseudomonas aeruginosa.

Las heridas producidas en la cabeza pueden ser la vía por la que penetre al organismo, ocasionando septicemia.

Otros sitios .-

Pueden surgir osteomielitis y artritis, como resultado de la invasión en huesos y articulaciones; en estos casos generalmente el microorganismo procede de heridas adyacentes infectadas (94).

Pueden ocurrir infecciones clínicas en el aparato digestivo durante el curso de una infección generalizada, apareciendo úlceras en el estómago ó en las paredes de los intestinos las cuales

son similares a las úlceras eczematosas de la piel.

Pseudomonas aeruginosa, es uno de los microorganismos que han sido aislados de las lesiones pseudomembranosas en las enterocolitis (245); estas lesiones generalmente ocurren en pacientes sujetos a terapia con antibióticos. El papel de la colonización bacteriana en las enteritis pseudomembranosas es incierto.

Se han descrito también brotes de severas diarreas en infantes (especialmente prematuros) (77).

En los pacientes que sufren cáncer, Pseudomonas aeruginosa representa un papel importante en las infecciones que pueden adquirir (260, 308 y 317), principalmente en los pacientes con leucemia no linfocítica aguda, en los cuales es más común la sepsis; en todos los casos ésta ocurre durante un período de granulocitopenia - ($< 1,000 / \text{mm}^3$) (260). Los sitios más susceptibles a infección en pacientes con leucemias no linfocíticas agudas, son los pulmones y la región ano-rectal (259, 261 y 269).

Tapper y Armstrong (290) reportaron que los pacientes más susceptibles a padecer sepsis son en orden de importancia, los que padecen:

- 1.- Leucemias agudas.
- 2.- Linfomas o enfermedades inmunoproliferativas (mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenström, etc.).
- 3.- Neoplasias no hematológicas (cáncer mamario, cáncer vesical, cáncer de cérvix, cáncer de pulmón, etc.).

Infecciones en la infancia .-

Las infecciones en los infantes causadas por el microorganismo en estudio, incluyen: pulmones, aparato urinario, aparato digestivo, piel y ojos; en algunos casos las infecciones locales permiten una invasión sistemática con septicemia, meningitis, abscesos cerebrales, endocarditis y colapsos circulatorios (6).

Neonatos e infantes prematuros, son más susceptibles a las infecciones en relación con los adolescentes y adultos, debido a - que su sistema inmunológico no está completamente desarrollado.

Las fuentes de infección son muy variadas. Cole y col. (-55), encontraron distintos tipos de cepas en las heces del 8 % de los infantes, durante los primeros 6 meses de vida, por lo que la posibilidad de que ellos mismos se infectaran era alta; sin embargo, las fuentes externas de contaminación son las más frecuentemente implicadas. Se encontró que los catéteres y los aparatos de succión empleados para limpiar el aparato respiratorio de los infantes, pueden estar contaminados por el microorganismo aún cuando se empleen soluciones débilmente antisépticas para desinfectarlos (-16 y 252).

Obstetricia .-

Las cepas de Pseudomonas aeruginosa representan durante la práctica obstétrica un riesgo mucho mayor para el infante, que para la madre, cuando colonizan el útero puerperal de una mujer inmunodeficiente, puede ocasionar severas lesiones; sin embargo, es un organismo predominante en el aborto séptico, aunque no estuvo entre las bacterias frecuentemente halladas en los apósitos vaginales de las pacientes con fiebre puerperal (42).

Septicemias .-

La septicemia es la forma de infección invasiva más severa producida por Pseudomonas aeruginosa.

Speirs y col. (275), describieron septicemias producidas por este microorganismo, que aparecieron espontáneamente en niños aparentemente sanos, en quienes se encontró posteriormente que padecían hipogamaglobulinemia congénita.

La inmunodeficiencia es el principal factor requerido para

el desarrollo de las septicemias y puede deberse a enfermedades (leucemia, quemaduras, diabetes, etc.) ó a tratamientos terapéuticos (con corticoesteroides, agentes inmunosupresores, radiación, etc.).

Mecanismos de transmisión .-

Los mecanismos de transmisión de las enfermedades infecciosas dependen de un gran número de factores, entre los que se incluyen: el habitat normal del agente patógeno, su capacidad para sobrevivir o crecer en el medio ambiente de la superficie del cuerpo humano, el cual puede ser seco ó húmedo, su presencia en los sitios-infecciosos del paciente, la frecuencia de portadores sanos que -- tienen relación con el paciente, la patogenicidad de la bacteria -- después de haber sido expuesta a condiciones adversas para su desarrollo y a las medidas empleadas en los hospitales para prevenir -- la transmisión de las infecciones .

Las infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa, casi siempre están restringidas a los pacientes hospitalizados, en base a la forma en que se pueden adquirir se clasifican en dos tipos:

- 1.- Infecciones exógenas .- son las adquiridas de fuentes externas, por ejemplo de la contaminación del aire ó por contacto con vectores humanos o inanimados.
- 2.- Infecciones endógenas .- son las causadas por el paciente mismo. Las bacterias están presentes en los sitios de transporte como son : la piel, el aparato respiratorio ó el aparato digestivo del paciente.

Las distintas cepas pueden sobrevivir y multiplicarse en soluciones que contengan un mínimo de nutrientes, un ejemplo de esto es el hecho de que cepas suspendidas en agua desionizada y a --

temperatura ambiente, sobreviven durante unas 5 semanas; mientras que las cepas de Staphylococcus aureus sometidas al mismo tratamiento, mueren en un lapso de 48 horas. Esto contrasta con la poca supervivencia de las cepas de Pseudomonas aeruginosa, sometidas a tratamientos de desecación (230).

Fuentes .-

La importancia relativa de las diferentes fuentes y reservorios varía con la situación clínica. Las fuentes humanas más importantes son indudablemente las heridas infectadas, la orina y -- las lesiones productoras de exudado; estas fuentes por ser húmedas, pueden contaminar la ropa del paciente y de la cama, las manos del personal que tiene relación con él y el equipo empleado en las curaciones (por medio del cual puede ser transferida la infección a otros pacientes).

Como se mencionó anteriormente, las cepas son sensibles a los tratamientos de desecación; pero sobreviven y se multiplican -- en una gran variedad de soluciones, por lo tanto los reservorios -- inanimados más importantes están constituidos o tienen una estrecha relación con el medio ambiente húmedo (9, 16, 102, 295 y 307).

Inmunidad

Importante es el papel de la inmunidad (natural y adquirida), en los mecanismos que establecen la patogénesis de los microorganismos llamados oportunistas.

Se han realizado en los últimos años numerosos estudios -- sobre las propiedades inmunológicas de las cepas de Pseudomonas -- aeruginosa.

La mayoría de los investigadores han concentrado su atención hacia la profilaxis y el tratamiento por medio de vacunas y -- antisueros de las infecciones producidas por este microorganismo --

(estas aplicaciones clínicas serán consideradas en la parte final de este capítulo).

En esta sección será considerada la resistencia natural y la respuesta inmunológica a la infección, producida en el hombre por Pseudomonas aeruginosa.

Anticuerpos .-

Los primeros reportes sobre anticuerpos contra esta bacteria presentes en el suero de sujetos sanos, fueron hechos hacia el año de 1930.

Fox y Lowbury (89), demostraron en el suero de sujetos sanos la presencia de aglutininas contra diferentes serotipos de Pseudomonas aeruginosa; así como también se demostró que estaban presentes títulos altos de anticuerpos en los pacientes cuyas quemaduras fueron infectadas por este microorganismo (los anticuerpos de título alto, fueron específicos para el serotipo de la cepa colonizadora de la lesión).

El incremento del título de anticuerpos se asoció con la duración de la infección y la extensión de las quemaduras.

La importancia de estos descubrimientos, en relación con la defensa del huésped, ha sido difícil de precisar. A menudo los títulos altos de anticuerpos se encontraron en el suero de pacientes moribundos por infección con este microorganismo.

Igualmente se encontraron títulos altos de aglutininas contra Pseudomonas aeruginosa, en pacientes que posteriormente murieron debido a la septicemia producida por este microorganismo en una etapa de la enfermedad en que había causado un daño irreparable la infección.

Un efecto similar mostraron los pacientes que fallecieron a pesar del hecho de haber sido eliminados los microorganismos del torrente circulatorio por tratamiento quimioterápico (154).

La invasión por esta bacteria en los tejidos y en el torrente circulatorio, es más factible que ocurra cuando el nivel de anticuerpos está reducido, por ejemplo en enfermedades como hipogamaglobulinemia y leucemia, o en pacientes severamente quemados en quienes poco tiempo después de haber sufrido las lesiones, muestran daños como consecuencia de tener una respuesta primaria reducida al antígeno y un bajo nivel de inmunoglobulinas (5 y 249).

El tratamiento con drogas citotóxicas e inmunosupresoras también facilita la invasión. Liu y Mercer (188) encontraron que los anticuerpos obtenidos contra la capa viscosa extracelular de Pseudomonas aeruginosa tienen una función protectora, éstos fueron asociados con aglutininas que a su vez están relacionadas con las inmunoglobulinas G (152 y 250).

Fagocitosis .-

La resistencia celular a la infección, involucra la ingestión y la destrucción de las bacterias por las células fagocíticas (neutrófilos polimorfonucleares, macrófagos y células del sistema-retículo endotelial). Estos dos procesos están separados, pues --- existen bacterias que sobreviven a la ingestión por las células fagocíticas.

La fagocitosis puede ser más eficiente por la presencia de opsoninas (anticuerpos que cubren la superficie bacteriana y facilitan la captación de las bacterias por los fagocitos) y del complemento en el suero.

Alexander y Wixson (1), encontraron que el número y la capacidad de los neutrófilos para destruir a Pseudomonas aeruginosa, está reducida en los pacientes con severas quemaduras; esta deficiencia en la defensa fagocítica, combinada con la respuesta reducida de los anticuerpos, suministran en el paciente una vulnerabilidad particular durante los primeros días después de ha

berse originado el daño.

Carney y col. (43), mediante una técnica inmunofluorescente, mostraron una respuesta leucocitaria pobre y una invasión rápida de los folículos del vello y del tejido subcutáneo por una cepa virulenta; estos efectos no se presentaron cuando se utilizaron cepas no virulentas de este microorganismo.

La inmunización pasiva previene las infecciones invasivas, es probable que esta protección se deba en parte a la neutralización de los factores tóxicos del microorganismo que interfieren con la respuesta leucocitaria.

Estos datos y el hecho de que el antisuero protector a menudo no tiene actividad bactericida, sugieren que la acción fagocitaria auxiliada por la opsonización, es el mecanismo de protección principal contra Pseudomonas aeruginosa empleado por los humanos - (152 y 250).

Profilaxis .-

La profilaxis contra las infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa, es un tema que ha llamado la atención de muchos investigadores debido a las características tan peculiares que muestra este microorganismo y que han sido descritas en todos los capítulos de que consta este trabajo.

Para desarrollar un método quimioprofiláctico contra las infecciones causadas por este microorganismo, deben de tenerse en cuenta los siguientes factores :

----- La terapia a base de agentes inmunosupresores y esteroides, favorece la infección .

----- Se ha demostrado que esta bacteria produce enzimas que inactivan a los agentes antimicrobianos tales como: - Kanamicina, Neomicina, Estreptomycinina y Cloramfenicol (68 y 218) Cefalosporina y Penicilina (251 y 253).

----- Han sido identificados plásmidos que le confieren a este microorganismo resistencia contra la acción de agentes antimicrobianos tales como: Carbenicilina, Kanamicina / Neomicina, Tetraciclina, Estreptomicina, Ampicilina, -- Sulfonamida y Gentamicina (ver cap. 2 pág. 18).

La frecuencia con la que se producen mutantes resistentes a la acción de los antibióticos, aumenta cuando se hace uso inmoderado de los antibióticos de amplio espectro.

En los pacientes que sufren cáncer y que son infectados por este microorganismo, se puede recurrir a la supresión de la flora endógena del sujeto con antibióticos orales no absorbibles, frecuentemente se emplean altas dosis de Gentamicina, Vancomicina y Nistatina para contrarrestar la infección (239). En estos casos, el riesgo de los efectos colaterales producidos por estas drogas ocupan un segundo término.

Los agentes terapéuticos empleados más frecuentemente contra las infecciones causadas por Pseudomonas aeruginosa son: Gentamicina, Carbenicilina y Polimixinas.

Se han localizado anticuerpos contra esta bacteria en el suero de sujetos sanos y en el suero de algunos pacientes infectados por ella (ver cap. 5 pág. 63). El carácter protector que manifiestan dichos anticuerpos varía considerablemente.

La capacidad antigénica que muestran algunas estructuras y algunos productos de este microorganismo, son un factor determinante cuando se pretenden desarrollar métodos inmunoprolifácticos y/o tratamientos contra las enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa.

Entre los estudios que se han realizado , en torno a la capacidad inmunológica de las estructuras constituyentes, destacan los siguientes:

----- El estudio sobre la composición y la capacidad anti

génica de los componentes que constituyen la capa viscosa extracelular de Pseudomonas aeruginosa, es un tema que ha interesado mucho a los investigadores (72, 75, 33, 187 y 265).

Sensakovic y Bartell (265) mostraron que los polisacáridos extraídos de la capa viscosa extracelular de este microorganismo son capaces de producir una respuesta inmunológica, la cual bloquea algunas de las manifestaciones tóxicas que se producen en la infección.

En base a lo anterior, se ha especulado que los polisacáridos forman alrededor del microorganismo una cápsula antífagocítica; puesto que los anticuerpos opsonizadores son dirigidos contra ellos, se ha sugerido que estos polisacáridos pueden ser útiles en la fabricación de vacunas.

----- Los lipopolisacáridos extraídos de la membrana externa de la pared celular, son capaces de producir una respuesta inmunológica en el huésped (316).

Su análisis químico muestra que están constituidos por: - Heptosa, ácido 2 ceto-3-desoxioctulónico y ácidos grasos hidroxilados (50). La organización estructural de estos elementos se manifiesta por una cadena lateral y un núcleo de polisacáridos (84). - Este núcleo de polisacáridos es común para las especies de Pseudomonas aeruginosa (51). Los anticuerpos dirigidos contra esta porción de los lipopolisacáridos, son importantes para la protección contra las infecciones causadas por este microorganismo, sus lipopolisacáridos son menos tóxicos que los lipopolisacáridos de otros microorganismos Gram negativos (200) quizá esto se debe a diferencias en los ácidos grasos hidroxilados unidos al lípido A y especialmente a la falta del ácido beta-hidroxi mirístico (110 y 200).

----- Entre los estudios que se han realizado en torno a la capacidad inmunológica de los productos elaborados por Pseudomonas aeruginosa, destaca particularmente el trabajo realizado por

Pollack y col. (237) quienes demostraron la presencia de anticuerpos contra la exotoxina A , liberada por este microorganismo.

En el suero humano, la actividad neutralizadora de la toxina fue detectada sólo en la fracción Ig.G y no se afectó -- por el tratamiento con 2- mercaptoetanol.

De los pacientes que se seleccionaron para este estudio, todos los que sobrevivieron a la infección causada por esta bacteria mostraron tener títulos altos de anticuerpos contra la exotoxina A, lo que sugiere que estos anticuerpos tienen un carácter protector en el huésped.

En base a los resultados obtenidos a partir de estudio -- realizado por estos investigadores , se plantea la posibilidad de producir un toxoide para estudios inmunoprolácticos y/o para el tratamiento de las enfermedades causadas por Pseudomonas aeruginosa.

C A P I T U L O 6

RESUMEN Y COMENTARIOS.

~~~~~

Con el objeto de poder justificar la importancia médica - que puede adquirir Pseudomonas aeruginosa microorganismo oportunista bajo ciertas condiciones, se elaboró esta revisión bibliográfica.

Durante el desarrollo de los primeros capítulos (1, 2 y 3) se trató de plantear la situación taxonómica, genética y bioquímica del género Pseudomonas. Con un particular interés se pretendió establecer en cada una de las situaciones la posición que mantiene el microorganismo objeto de este trabajo.

Con respecto a esto se pueden tener los comentarios siguientes:

----- El género está constituido por grupos muy heterogéneos de bacterias, la clasificación taxonómica basada solamente en características fenotípicas, cada día es más insatisfactoria por lo que se desarrollan con cierta frecuencia nuevas técnicas que -- tratan de correlacionar a los grupos entre sí. Esto ha llevado a los investigadores a efectuar estudios más minuciosos de la célula bacteriana que puedan coadyuvar al establecimiento de una clasificación más satisfactoria; entre las técnicas que se han desarrollado con este objetivo se encuentran : la composición del DNA, el -- análisis inmunológico de proteínas, la hibridización in vitro de los ácidos nucleicos, el análisis de la secuencia de aminoácidos -- de las proteínas, la comparación de los procesos bioquímicos, etc.

----- La identificación y caracterización de plásmidos, el mapeo de genes cromosomales y el desarrollo de técnicas para el

aislamiento de una gran gama de mutantes, son los mejores procedimientos genéticos que nos pueden conducir al entendimiento de la organización genética del género. Estas técnicas están disponibles, pero se plantean serios problemas con la Biología de este género - en lo que respecta a morfogénesis, organización funcional de la célula bacteriana y su relación con la versatilidad bioquímica y la resistencia característica de este género a los agentes antimicrobianos.

Los bacteriofagos y las bacteriocinas muestran una importante contribución al fenotipo bacteriano.

La frecuencia de la lisogenia y de la aeruginocidad de las cepas de Pseudomonas aeruginosa, contrasta con la falta de estas propiedades en otras especies del género (Pseudomonas putida y Pseudomonas fluorescens). Es posible que este contraste esté relacionado con los componentes del genoma de los plásmidos que se encuentran en cada una de estas bacterias.

----- La marcada versatilidad bioquímica dota a este microorganismo de una capacidad muy particular, que le permite sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas; esta es una de las principales razones por las cuales Pseudomonas aeruginosa se puede desarrollar en diferentes sitios del cuerpo humano y en el medio ambiente inanimado (ver cap. 5 pág. 61).

La importancia clínica del microorganismo en estudio, está basada principalmente en los siguientes puntos:

----- Su capacidad para crecer y desarrollarse en diferentes condiciones ambientales.

----- Su capacidad para producir una variedad de factores tóxicos.

----- El uso inmoderado de tratamientos terapéuticos a base de antibióticos de amplio espectro, drogas inmunosupresoras y esteroides.

----- El caracter protector de los anticuerpos que se producen en contra de este microorganismo varfa considerablemente.

----- Los métodos inadecuados de asepsia para los equipos tales como catéteres, endoscopios, sondas, nebulizadores, aparatos de succión, etc. .

----- La falta de higiene del personal que atiende a los pacientes infectados por este microorganismo, con lo que se propicia la aparición de focos endémicos.

El control de los mecanismos de transmisión y los métodos profilácticos, son los principales factores que pueden ayudar a contrarrestar las infecciones causadas por este microorganismo.

Efectuar una revisión bibliográfica sobre un microorganismo en particular, como la que se desarrolló en este trabajo, trata de manifestar el deseo de querer despertar un mayor interés en cada una de las personas que lo lean, por la Bacteriología Clínica.

Pseudomonas aeruginosa fue seleccionada entre muchos microorganismos, tanto patógenos como oportunistas por las características complejas, pero interesantes , que posee.

Poder donstatar la angustia que tienen los pacientes que sufren, al darse cuenta que por las circunstancias en las que se encuentran resulta difícil que tenga éxito un tratamiento para la erradicación de este microorganismo, da margen para querer saber - el porqué es capaz de crear tales situaciones.

Este trabajo tuvo por objeto en base a la revisión de las -  
investigaciones hasta ahora efectuadas sobre Pseudomonas aeruginosa,  
brindar un panorama del conocimiento que se tiene a la fecha sobre -  
este microorganismo.

## C A P I T U L O 7

## B I B L I O G R A F I A

~~~~~

- 1.- Alexander J.W. y Wixon D. Neutrophil dysfunction and sepsis in burn injury. Surg. Gynec. Obstet. 130 : 431 - 438 1970.
- 2.- Alms T.H. y Bass J.A. Immunization against Pseudomonas aeruginosa I. Induction of protection by an alcohol-precipitated fraction from the slime layer II. Purification and characterization of the protective factor from the alcohol-precipitated fraction. J. Infect. Dis. 117 : 249-264 1967.
- 3.- Amako K. Yasunaka K. y Takeya K. Relationships between rhamnidosome and pyocin in Pseudomonas fluorescens. J. Gen. Microbiol. 62 : 107-112 1970 .
- 4.- Ambler R.P. y Brown L.H. The amino acid sequence of Pseudomonas fluorescens azurin. Biochem. J. 104 : 784-825 1967.
- 5.- Arturson G., et.al. Changes in immunoglobulin levels in severely burned patients. Lancet 1 : 546-548 1969.
- 6.- Asay L.D. y Koch R. Pseudomonas infections in infants and children. New Engl. J. Med. 262 : 1062-1066 1960.
- 7.- Atik M., et.al. Pseudomonas exotoxin shock. A preliminary report of studies in dogs. J.A.M.A. 205 : 134-140 1968.
- 8.- Ayliffe G.A., et.al. Hospital infection with Ps. aeruginosa in neurosurgery. Lancet 2 : 365-368 1965.
- 9.- - - - , et.al. Postoperative infection with Ps aeruginosa in an eye hospital. Lancet 1 : 1113-1117 1966.
- 10.- Azoulay E. y Couchoud-Beaumont P. Etude de la cytochrome -

- oxidase de Pseudomonas aeruginosa. Biochim. Biophys. Acta --
110 : 301-311 1965 (FR.) .
- 11.- Bak A.L.,Christiansen C. y Stenderup A. Bacterial genome sizes determined by DNA renaturation studies. J. Gen. Microbiol. 64 : 377-380 1970.
- 12.- Ballard R.W. , Duodoroff M. , Stanier R.Y. y Mandel M. Taxonomy of the aerobic Pseudomonads : Pseudomonas diminuta and Pseudomonas vesiculare. J. Gen. Microbiol. 53 : 349-361 --- 1968.
- 13.- - - - ,et.al. Taxonomy of the aerobic Pseudomonads : -----
Pseudomonas cepacia , Pseudomonas marginata , Pseudomonas ---
allicola and Pseudomonas caryophylli. J. Gen. Microbiol. ---
60 : 199-214 1970.
- 14.- Barson A.J. Fatal Pseudomonas aeruginosa bronchopneumonia in a children's hospital. Arch. Dis. Child. 46: 55-60 1971 .
- 15.- Bartsch R.G. Bacterial cytochrome. Ann. Rev. Microbiol. ----
22 : 181-200 1968.
- 16.- Bean H.S. y Farrell R.C. The persistence of Ps aeruginosa in aqueous solutions of phenols. J. Pharmacol. 19: Suppl 183 -196 1967.
- 17.- Berant M.,et.al. Vertebral osteomyelitis in a young infant. Clin. Pediatr. (Phila.) 13 (8) : 677 - 679 1974.
- 18.- Bergan T. Typing of Pseudomonas aeruginosa by pyocine production. Acta Path. Microbiol. Scand. (B) 72: 401-411 1968.
- 19.- - - - A new bacteriophage typing set for Ps aeruginosa 2.- Characterization and comparisons of new and previous typing sets. Acta Path. Microbiol. Scand. (B) 80: 189-201 1972.
- 20.- --- - - Epidemiological markers for Ps aeruginosa I. Sero__

- grouping , pyocine typing and their interrelations. Acta ---
 Pathol. Microbiol. Scand. (B) 81 : 70-80 1973.
- 21.- - - - Epidemiological markers for Ps aeruginosa 2. Rela___
 tionship between bacteriophage susceptibility and serogroup -
 or pyocine type. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (B) 81 : 81-
 90 1973.
- 22.- - - - Epidemiological markers for Ps aeruginosa 3. Compari
 son of bacteriophage typing , serogrouping and pyocine typing
 on a heterogeneous clinical material. Acta Pathol. Microbiol
 Scand. (B) 81 : 91-101 1973.
- 23.- Bergan T. y Lytad A. Reproducibility in bacteriophage sensiti
 vity pattern of Ps aeruginosa . Acta Pathol. Microbiol. Scand
 (B) 80 : 345-350 1972.
- 24.- Betz J.L. y Clarke P.H. Selective evolution of phenylacetami_
 de - utilizing strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Mi
 crobiol. 73: 161-174 1972.
- 25.- Beumer J. Ampleur des modifications du lysotype provoquées p-
 pur la lyophilisation chez des souches de Ps aeruginosa.
 Ann. Inst. Pasteur (Paris) 122: 415-425 1972.
- 26.- Bird J.A. y Wain R.B. Cis -cis Muconate , the product inducer
 of catechol 1 , 2 oxygenase in Pseudomonas aeruginosa.
 Biochem. J. 109 :479-481 1968.
- 27.- Bjorn M.J. ,et.al. Incidence of exotoxin production by -----
Pseudomonas species. Infect. Immun. 16: 362-366 1977.
- 28.- Black W.A. y Girdwood R.W. Carbenicillin resistance in -----
Pseudomonas aeruginosa. Brit. Med. J. 4: 234 1969.
- 29.- Bradley D.E. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins
 Bact. Rev. 31: 230-314 1967.

- 30.- Bradley D.E. A study of pili on Pseudomonas aeruginosa .
Genet. Res. Camb. 19: 39-51 1972.
- 31.- Brammar W.J. y Clarke F.H. Induction and repression of -----
Pseudomonas aeruginosa amidase. J.Gen. Microbiol. 37 : 307 --
319 1964.
- 32.- Brown M.R. y Foster J.H. A simple diagnostic milk medium for-
Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Path. 23 : 172 - 7 1970.
- 33.- - - - ,Foster J.H. y Clamp J.R. Composition of Pseudomonas
aeruginosa slime. Biochem. J. 112 : 521-525 1969.
- 34.- Brown S.I.,et.al. The corneal destroying enzyme of -----
Pseudomonas aeruginosa. Invest. Ophthalmol. 13:174-180 1974.
- 35.- Brown V.I. y Lowbury E.J.L. Use of an improved cetrimide agar
medium and other culture methods for Pseudomonas aeruginosa.
J. Clin. Path. 18 : 752-756 1965.
- 36.- Bryan L.E.,et.al. Characteristics of R 931 and other -----
Pseudomonas aeruginosa R factors. Antimicrob. Agents Chemother
3 : 625-637 1973.
- 37.- Burns M.W. y May J.R. Bacterial precipitins in serum of patien
ts with cystic fibrosis. Lancet 1: 270-272 1968.
- 38.- Burns R.P. y Rhodes D.H. Jr. Pseudomonas eye infection as a -
cause of death in premature infants. Arch. Ophthal.(Chicago)
65: 517-525 1961.
- 39.- Cain R.B. y Farr D.R. Metabolism of arylsulphonates by micro_
organisms. Biochem. J. 106 : 859-877 1968.
- 40.- Calhoun D.H.,Carson M. y Jensen R.A. The branch point metabo_
lite for pyocyanine biosynthesis in Ps aeruginosa. J. Gen. Mi
crobiol. 72: 581-583 1972.
- 41.- - - - y Jensen R.A. Significance of altered carbon flow in

- aromatic amino acid synthesis : an approach to the isolation of regulatory mutants in Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 109 : 365-372 1972.
- 42.- Calman R.M. y Gibson J. Pyrexia in puerperium. Lancet 2 : 649 - 652 1953 .
- 43.- Carney S.A., Dyster R.E. y Jones R.J. The invasion of burned - skin by Ps aeruginosa. Br. J. Dermatol. 88: 539-545 1973.
- 44.- - - - y Jones R.J. Biological and immunochemical properties of culture filtrates of virulent and avirulent strains of — Ps aeruginosa. Brit. J. Exp. Path. 49: 395-410 1968.
- 45.- Carrick L. Jr. y Berk R.S. Membranous inclusions of ——— Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 106: 250-256 1971.
- 46.- Carruthers M.M., et.al. Pseudomonas aeruginosa endocarditis . Report of a case with review of the literature. Am. J. Med. 55 : 811 - 818 1973.
- 47.- Castric P.A. Hydrogen cyanide a secondary metabolite of ——— Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Microbiol. 21(5) : 613 -618 1975 .
- 48.- Cetin E.T., Toreci K. y Ang O Encapsulated Ps aeruginosa (— Pseudomonas aeruginosa mucosus) Strains. J. Bacteriol. 89 : 1432 - 1433 1965.
- 49.- Chabbert Y.A., et.al. Incompatibility groups and the classification of fi- resistance factor. J. Bacteriol. 112: 666-675 — 1972 .
- 50.- Chester I.R., Gray G.W. y Wilkinson S.G. Further studies of — the chemical composition of the lipopolysaccharide of ——— Pseudomonas aeruginosa . Biochem. J. 126 : 395-407 1972 .
- 51.- - - - y Meadow P.M. The relationship between the O - anti_

- genic lipopolysaccharides and serological specificity in strains of Pseudomonas aeruginosa of different O- serotypes. J. Gen. Microbiol. 78 : 305-318 1973.
- 52.- Clarke P.H. The aliphatic amidases of Pseudomonas aeruginosa. Adv. Microbial Physiol. 4 : 179 1970.
- 53.- - - - ,Houldsworth M.A. y Lilly M.D. Catabolite repression and the induction of amidase synthesis by Ps aeruginosa 8602 in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 51 :225-234 1968.
- 54.- Cohen G.N., Stanier R.Y. y Le Bras G. Regulation of the biosynthesis of amino acids of the aspartate family in coliform bacteria and Pseudomonads. J. Bact. 99: 791 - 801 1969.
- 55.- Cole A.P., Thom A.R. y Watrasiewicz K. Infant carriers of --- Pseudomonas aeruginosa. Lancet 2: 1155-1170 1971 .
- 56.- Colebrook L., Lowbury E.J. y Hurst L. The growth and death of wound bacteria in serum exudate and slough. J. Hyg. (London) 58: 357-366 1960.
- 57.- Colwell R.R. A study of features used in the diagnosis of --- Pseudomonas aeruginosa. J.GEN.MICROBIOL. 37: 181-194 1964.
- 58.- Crompton D.O. Avoidance of the use of gloves during ophthalmic surgery. Trans. Ophthal. Soc. Aust. 21: 88-97 1961.
- 59.- Csiszár K. y Lányi B. Pyocine typing of Ps aeruginosa : association between antigenic structure and pyocine type. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 17 : 361-370 1970.
- 60.- Dagley S. y Trudgell P.W. The metabolism of galactarate , D - glucarate and various pentoses by species of Pseudomonas. Biochem. J. 95: 48-58 1965.
- 61.- Darell J.W. y Wahba A.H. Pyocine - typing of hospital strains of Ps pyocyanea. J. Clin. Path. 17: 236-242 1964.

- 62.- Datta N. y Hedges R.W. Compatibility groups among fi - R factors. Nature (London) 234 : 222-223 1971.
- 63.- - - - y Hedges R.W. Host ranges of R factors . J. Gen. Microbiol. 70 : 453- 469 1972.
- 64.- Datta P. y Gest H. Alternative patterns of end-product control in biosynthesis of amino acid of the aspartic family. Nature (London) 203 : 1259 -1261 1964.
- 65.- Diaz F., Mosovitch L.L. y Neter E. Serogroups of Ps aeruginosa and the immune response of patients with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. 121 : 269 - 274 1970.
- 66.- Diener B., Carrick L.Jr. y Berk R.S. In vivo studies with collagenase from Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 7 : 212 -217 1973.
- 67.- Doggett R.G. , Harrison G.M. y Carter R.E. Mucoid Pseudomonas aeruginosa in patients with chronic illnesses . Lancet 1: 236 -237 1970.
- 68.- Doi O., Ogura M., Tanaka N., et.al. Inactivation of Kanamycin , Neomycin and Streptomycin by enzymes obtained in cells of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Microbiol. 16:1276-1281 1968.
- 69.- Duke - Elder S. 1970 Parsons' Diseases of the Eye , 15 th ed., Churchill , London , pag. 384 .
- 70.- Dunn N.W. y Gunsalus I.C. Transmissible plasmid coding early-enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida . J. Bacteriol. 114 : 974 - 979 1973 .
- 71.- Duodoroff M. and Palleroni N.J. 1974 Genus I Pseudomonas p. 217-243 in R.E.Buchanan and E. Gibbons (ed), Bergey's Manual of determinative bacteriology , 8 th ed. The Williams & Williams Co. Baltimore .



- 72.- Eagon R.G. Composition of an extracellular slime produced by Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Microbiol. 8: 585-586 1962.
- 73.- Egan J.B. y Holloway B.W. Genetic studies on lysogeny in ---- Pseudomonas aeruginosa. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 39 : 9 - 17 1961 .
- 74.- Esselmann M. y Liu P.V. Lecithinase production by Gram negative bacteria. J. Bacteriol. 81 : 939-945 1961 .
- 75.- Evans L.R. y Linker A. Production and characterization of the slime polysaccharide of Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 116 : 915 -924 1973.
- 76.- Faden A. Neurological sequelae of malignant external otitis. Arch. Neurol. 32 (3) : 204 - 205 1975 .
- 77.- Falcao D.P.,et.al. Nursery outbreak of severe diarrhoea due to multiple strains of Pseudomonas aeruginosa . Lancet 2 : 38 - 40 1972.
- 78.- Fargie B y Holloway B.W. Absence of clustering of functionally related genes in Ps aeruginosa. Genet. Res. 6: 284-299 1965 .
- 79.- Farmer J.J. Y Herman L.G. Epidemiological finger-printing of Pseudomonas aeruginosa by the production of and sensitivity-of pyocin and bacteriophage , Appl. Microbiol. 18 : 760 - 765 1969 .
- 80.- Feary T.W.,Fisher E.Jr. y Fisher T.N. A small RNA containing Pseudomonas aeruginosa bacteriophage, Biochem. Biophys. -- Res. Commun. 10 : 359 - 365 1963.
- 81.- - - - , Fisher E.Jr. y Fisher T.N. Lisogeny and phage resistance in Pseudomonas aeruginosa . Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113: 426 -430 1963 .

- 82.- - - - , Fisher E.Jr. y Fisher T.N. Isolation and preliminary characteristics of three Bacteriophages associated with a lyso genic strain of Pseudomonas aeruginosa.
J. Bact. 87 : 196 - 208 1964.
- 83.- Feist C.F. y Hegeman G.D. Phenol and benzoate metabolism by -- Pseudomonas putida : regulation of tangential pathways.
J. Bact. 100 : 869 - 877 1969.
- 84.- Fensom A.H. y Meadow P.M. Evidence for two regions in the poly saccharide moiety of the lipopolysaccharide of Pseudomonas aeruginosa 8602 . F.E.B.S. Letters 9 : 81 - 84 1970.
- 85.- Fetzer A.E., Werner A.S. y Hagstrom J.W. Pathologic features of Pseudomonas pneumonia. Amer. Rev. Resp. Dis. 96 : 1121 - 1130 1967.
- 86.- Fewson C.A. y Nicholas D.J. Nitrate reductase from Pseudomonas aeruginosa . Biochem. Biophys. Acta 48 : 208-210 1961.
- 87.- Fisher M.W., Devlin H.B. y Gnabasik F.J. New immunotype schema- for Pseudomonas aeruginosa based on protective antigens.
J. Bacteriol. 98 : 835 - 836 1969 .
- 88.- Fishman L.S. y Armstrong D. Pseudomonas aeruginosa bacteremia- in patients with neoplastic disease . Cancer 30: 764-773 1972
- 89.- Fox J.E. y Lowbury E.J. Immunity and antibody to Pseudomonas - pyocyanea in rabbits. J. Path. & Bact. 65 : 533-542 1953.
- 90.- Fuerst J.A. y Hayward A.C. Surface appendages similar to fim__ briae (pili) on Pseudomonas species .
J. Gen. Microbiol. 58 : 227 - 237 1969 .
- 91.- - - - y Hayward A.C. The sheathed flagellum of Pseudomonas - stizolobii. J.Gen. Microbiol. 58: 239-245 1969.

- 92.- Garibaldi J.A. Media for the enhancement of fluorescent pigment production by Pseudomonas species.
J. Bact. 94 : 1296 - 1299 1967.
- 93.- Gibson D.T., Koch J.R. y Kallio R.E. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms I. Enzymatic formation of catechol from benzene. Biochem.(Wash.) 7 : 2653-2666 1968.
- 94.- Gifford D.B., et.al. Septic arthritics due to Pseudomonas in heroin addicts. J. Bone Joint Surg. (Am.) 57(5) : 631-635 1975.
- 95.- Gillies R.R. y Govan J.R. Typing of Pseudomonas pyocyanea by pyocine production. J.Path. Bact. 91 : 339-345 1966.
- 96.- Gorrill R.H. Bacterial localization in kidney with particular reference to Pseudomonas pyocyanea .
J. Path. & Bact. 64 : 853-864 1952.
- 97.- Goto S. y Enamoto S. Nalidixic acid cetrinide agar . A new selective plating medium for the selective isolation of Pseudomonas aeruginosa. Jap. J. Microbiol. 14: 65-72 1970.
- 98.- Gould J.C. 1968 in Urinary tract infection (Eds. F.O'Grady & W. Brumfitl) Oxford University Press p. 43 .
- 99.- - - - y McLeod J.W. A study of the use of agglutinating sera and phage lysis in the classification of strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Path. Bact. 79:295-311 1960
- 100.- Govan J.R. y Gillies R.R. Further studies in the pyocine typing of Ps pyocyanea. J. Med. Microbiol. 2: 17-25 1969 .
- 101.- Graber C.D., et.al. Bacteriophage grouping of Pseudomonas aeruginosa with special emphasis on lysotypes occurring in infected burns. Amer. J. Clin. Path. 37: 54-62 1962.
- 102.- Griebel H.G., et.al. Fine- particle humidifiers source of

- Pseudomonas aeruginosa infections in a respiratory - disease-unit. New Eng. J. Med. 282 : 531 - 535 1970.
- 103.- Gryder R.M. y Adams E. Inducible degradation of hydroxyproline uptake. J. Bact. 97 : 292 - 306 1969.
- 104.- Gunsalus I.C., Bertland A.V. and Jacobson L.A. Enzyme induction and repression in anabolic and catabolic pathways. Arch. Mikrobiol. 59 : 113 - 122 1967.
- 105.- - - -, et.al. Regulation of catabolic metabolism. Israel J. Med. Sci. 1 : 1099 - 1119 1965.
- 106.- - - -, et.al. P-450 cam hydroxylase : substrate effector -- and electron transport reactions. Chem. Biol. Interact. 4 : 75 - 78 1971 v
- 107.- Habs J. Untersuchungen über die O- antigene von Pseudomonas aeruginosa. Z. Hyg. Infektionskr. 144: 218-228 1957.
- 108.- Hall J.H., et.al. Pseudomonas aeruginosa in dermatology. Arch. Derm. (Chicago) 97 : 312-324 1968 .
- 109.- Hamon Y. , Peron Y. y Veron M. Contribution to the study of the lysogenic and bacterocinogenic properties of the genus -- Pseudomonas . Ann. Inst. Pasteur (paris) 253 : 738-753 1961.
- 110.- Hancock I., Humphreys G. y Meadow P. Characterization of the hydroxy acids of Pseudomonas aeruginosa 8602 . Biochim. Biophys. Acta 202 : 389 - 391 1970.
- 111.- Hanessian S., Regan W., Watson D. y Haskell T. Isolation and -- characterization of antigenic components of a new heptavalent Pseudomonas vaccine. Nature (New Biol.) 229:209-210 1971.
- 112.- Hart A. y Kite P.E. Comparison of four selective agars for -- the isolation of Pseudomonads . Appl. Environm. Microbiol. 33 : 1209 - 1214 1977.

- 113.- Hartline R.A. y Gunsalus I.C. Induction specificity and catabolite repression of the early enzymes in camphor degradation by Pseudomonas putida. J. Bact. 106 : 468 -478 1971 .
- 114.- Hayaishi O. Crystalline oxygenases of Pseudomonads . Bact. - Rev. 30 : 720 - 731 1966 .
- 115.- Hegeman G.D. Synthesis of the enzymes of the mandelate pathway by Pseudomonas putida I. synthesis of enzymes by the wild type. J. Bact. 91: 1140 - 1154 1966 .
- 116.- Heinrichsen J. Bacterial surface translocation : a survey and a classification . Bact. Rev. 36: 478 - 503 1972.
- 117.- Heumann W. y Marx R. Feinstruktur und funktion der fimbriembei dem sternbildenden bakterium Pseudomonas echinoides . Archiv. für Mikrobiologie 47 : 325 - 337 1964.
- 118.- Higerd T.B. , Baechler C.A. y Berk R.S. In vitro and In vivo characterization of pYocin. J. Bact. 93: 1976 - 1986 1967.
- 119.- Higgins S.J. y Mandelstan J. Evidence for induced synthesis - of an active transport factor for mandelate in Pseudomonas putida . Biochem. J. 126 : 917 - 922 1972.
- 120.- Hoffman H.P., et.al. Mesosomes in Pseudomonas aeruginosa . J. Bacteriol. 114 : 434 - 438 1973 .
- 121 .- Holland I.B. A bacteriocin specifically affecting DNA synthesis in Bacillus megaterium. J. Mol. Biol. 12:429-438 1965.
- 122.- Holloway B.W. Genetic recombination in Pseudomonas aeruginosa J. Gen Microbiol. 13 : 572 - 581 1955 .
- 123.- - - - Grouping Pseudomonas aeruginosa by lysogenicity and - pyocinogenicity. J. Path. Bact. 80: 448-450 1960.
- 124.- - - - Genetics of Pseudomonas. Bact. Rev. 33:419-443 1969.

- 125.- Holloway B.W. A genetic approach to the study of the bacterial membrane. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 49 : 429-434 1971.
- 126.- - - - y Cooper G.N. Lysogenic conversion in Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 84 : 1321 - 1324 1962.
- 127.- - - - , Egan J.B. y Monk M. Lysogeny in Pseudomonas aeruginosa. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 38: 321-329 1960.
- 128.- - - - y Jennings P.A. An infections fertility factor for Pseudomonas aeruginosa. Nature 181 : 855-856 1958 .
- 129 .- - - - , Krishnapillai V. y Stanisich V. Pseudomonas genetics Ann. Rev. Genet. 5 : 425 - 441 1971 .
- 130.- - - - y Rolfe B. Host - genome control in host - induced modification of Pseudomonas aeruginosa phages. Virol. 23 : 595 - 602 1964.
- 131.- - - - , Rossiter H., Burgess D. y Dodge Aeruginocin tolerant-mutants of Pseudomonas aeruginosa. Genet. Res. 22 : 239 - 253 1973.
- 132.- - - - y Van de Putte P. 1968 " Lysogeny and bacterial recombination " in Replication and Recombination of genetic Material (Edis. Peacock W.J. & Brock R.D.) Australian Academy of Science p. 175.
- 133.- Homma J.Y. y Uehara T. Differences in Chemical nature of the endotoxins derived from Pg aeruginosa strain P-13 . Jap. J. Exp. Med. 41 : 593 - 594 1971 .
- 134.- Horio T., et.al. Purification and properties of cytochrome oxidase from Pseudomonas aeruginosa . J. Biol. Chem. 236 : 944 - 951 1961 .
- 135.- - - - y Kamen M.D. Bacterial cytochrome II. Functional as_

- pects. Ann. Rev. Microbiol. 24 : 399 - 428 1970 .
- 136.- Hugh R. y Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram -ve bacteria. J. Bacteriol. 66: 24-26 1953.
- 137.- Hurst L. y Lowbury E.J.L. Transfer of fluorescein from Pseudomonas pyocyanea to colonies of other bacteria . J. Clin. Path. 5 : 359 - 360 1952.
- 138.- Iglewski B.H. y Kabat D. NAD - dependent inhibition of protein synthesis by Pseudomonas aeruginosa toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 2284 - 2288 1975.
- 139.- - - -, Liu P.V. y Kabat D. Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A : Adenosine Diphosphate - Ribosylation of Mammalian Elongation Factor 2 In vitro and In vivo. Infect. Immun. 15 : 138 - 144 1977.
- 140.- - - -, et.al. Pathogenesis of corneal damage from Pseudomonas exotoxin A. Invest. Ophthalm. Visual Sci. 16 : 73-76 1977.
- 141.- Ingram L., et.al. A transmissible resistance element from a strain of Ps aeruginosa containing no detectable extrachromosomal DNA. J. Gen. Microbiol. 72: 269 - 279 1972.
- 142.- Isaac J.H. y Holloway B.W. Control of pyrimidine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 96 : 1732 - 1741 1968.
- 143.- Ishii S.I., Nishi Y. y Egami F. The fine structure of a pyocin J. Molec. Biol. 13: 428 - 431 Sep 1965 .
- 144.- Ito S., Kageyama M y Egami F. Isolation and characterization of pyocins from several strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Gen Appl. Microbiol. 16 : 205 - 214 1970 .
- 145.- - - - y Kageyama M. Relationship between pyocins and a bac

- teriphage in Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Appl. Microbiol
16 :231-240 1970-
- 146.- Jacobs J. The investigation of an outbreak of Ps pyocyanea -
infection in a paediatric unit.
Postgrad. Med. J. 40 : 590 - 594 1964 .
- 147.- Jensen R.A., Calhoun D.H. y Stenmork S.L. Allosteric inhibiti_
on of 3-deoxy D arabino-heptulosonate , 7 phosphate syntheta_
se by tyrosine , tryptophan and phenyl pyruvate in Pseudomonas
aeruginosa. Biochim. Biophys. Acta 293 : 256 - 268 1973.
- 148.- Jensen R.A., Nasser D.S. y Neter E.W. Comparative control of-
a branch-point enzyme in microorganisms.
J. Bact. 94 : 1582 - 1593 1967 .
- 149.- Jessen O. 1965 Pseudomonas aeruginosa and other green fluo_
rescent Pseudomonads , A taxonomic study . Munksgaard , Copen
hagen .
- 150.- Jones M.V. y Hughes D.E. the oxidation of nicotinic acid by -
Pseudomonas ovalis chester the terminal oxidase.
Biochem . J. 129 : 755-761 1972.
- 151.- Jones R.J. Passive immunization against Gram - negative baci_
lli in burns. Brit. J. Exp. Path. ~~72~~ 51 : 53 -58 1970.
- 152.- - - - y Dyster R.E. The role of polymorphonuclear leucocy_
tes in protecting mice vaccinated against Pseudomonas -----
aeruginosa infections. Brit. J. Exp. Pathol. 54:416-21 1973
- 153.- - - - ,Hall M. y Ricketts C.R. Passive protective properties
of serum fractions from mice inoculated with an anti- -----
Pseudomonas vaccine. Immun. 23 : 889 - 895 1972.
- 154.- - - - ,Jackson D.M. y Lowbury E.J. Antiserum and antibiotic-
in the prophylaxis of burns against Pseudomonas aeruginosa.

- Brit. J. Plast. Surg. 19: 43-57 1966 .
- 155.- Kabota Y. y Liu P.V. An enterotoxin of Pseudomonas aeruginosa
J. Infect. Dis. 123 : 97 -98 1971 .
- 156.- Kageyama M. Studies of a Pyocin I. Physical and Chemical pro-
perties. J. Biochem.(tokyo) 55: 49-53 1964.
- 157.- - - - y Egami F. On the purification on some properties of-
a pyocin a bacteriocin produced by Pseudomonas aeruginosa .
Life Sci. 9 : 471 -476 1962 .
- 158.- Kahn N.C. y Ben S.P. Genetic transformation in Pseudomonas.
J. Gen. Microbiol. 49 : 201 - 209 1967.
- 159.- Kamen M.D. y Horio T. Bacterial cytochromes I. Structural as-
pects. Ann. Rev. Biochem. 39 : 673 - 700 1970 .
- 160.- Kawakami Y.,et.al. Prevalence of Pseudomonas aeruginosa stra-
ins possessing R factor in a hospital.
J. Antibiot. (tokyo) 25 : 607 - 609 1972 .
- 161.- Kay W.W. y Grondound A.F. Amino acid transport in Pseudomonas
aeruginosa. J. Bact. 97: 273 - 281 1969.
- 162.- - - - y Gronlund A.F. Isolation of amino acid transport -
negative mutants of Pseudomonas aeruginosa and cells with ---
repressed transport activity. J. Bact. 98 : 116-123 1969.
- 163.- - - - y Gronlund A.F. Proline Transport by Pseudomonas---
aeruginosa. Biochim. Biophys. Acta 193: 444 - 455 1969.
- 164.- Kaziro Y. y Tanaka M. Studies on the mode of action of pyocin
I. Inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells.
J. Biochem. (Tokyo). 57 : 689 - 695 1965.
- 165.- - - - y Tanaka M. Studies on the mode of action of pyocin
II. Inactivation of ribosomes. J. Biochem. (Tokyo) 58: 357-

363 1965.

- 166.- Kemp M.B. y Hegeman G.D. Genetic control of the beta Ketoamide pathway in Pseudomonas aeruginosa .
J. Bact. 96 : 1488 - 1499 1968.
- 167.- Kessler E., et.al. The corneal response to Ps aeruginosa : histopathological and enzymatic characterization .
Invest. Ophthal. Visual Sci. 16 (2) : 116 - 125 1977.
- 168.- King E.O., Ward M.K. y Raney D.E. 2 simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein .
J. Lab. & Clin. Med. 44 : 662 - 664 1954.
- 169.- Knight V., Hardy R.C. y Negrin J.Jr. Meningitis due to -----
Pseudomonas aeruginosa . J.A.M.A. 149 : 1395-1397 1952.
- 170.- Kovács N. Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidase reaction . Nature (London) 178 : 703 1956.
- 171.- Kreger A.S. y Griffin O.K. Physicochemical fractionation of -
extracellular cornea-damaging proteases of Ps aeruginosa .
Infec. Immun. 9 : 828 - 834 1974.
- 172.- Krishnapillai V. A novel transducing phage its role in recognition of a possible new host-controlled modification system-
in Pseudomonas aeruginosa. Mol. Gen. Genet. 114:134-143 1972
- 173.- Kurioka S. y Liu P.V. Effect of the hemolysin of Pseudomonas aeruginosa on phosphatides and on phospholipase C activity .
J. Bacteriol. 93 : 670 - 674 1967 .
- 174.- Lautrop H. y Jessen O. On the distinction between polar monotrichous and liphotrichous flagellation in green fluorescent-
Pseudomonads. Acta Path. Microbiol. Scand. (B) 60:588-98 1964
- 175.- Leidigh B.J. y Wheelis M.L. Genetic control of the histidine

- dissimilatory pathway in Pseudomonas putida .
Mol. Gen. Genet. 120 : 201 - 210 1973 .
- 176.- Leppla S.H. Large - scale purification and characterization-
of the exotoxin of Pseudomonas aeruginosa .
Infect. Immun. 14 : 1077 - 1086 (1976).
- 177.- Lessie T.G. y Neidhardt F.C. Adenosine triphosphate - linked-
control of Pseudomonas aeruginosa glucose 6 -phosphate dehy__
drogenase . J. Bact. 93 : 1337 - 1345 1967.
- 178.- Liedberg N.C.,Reiss E. y Artz C.P. Infection in burns ; septi
cemia , common cause of death. Surg. Gynec. & Obst. 99 : 151
-158 1954 .
- 179.- Lilly H.A. y Lowbury E.J. Cetrimide - nalidixic acid agar as-
a selective medium for Pseudomonas aeruginosa .
J. Med. Microbiol. 5 : 151 - 153 1972.
- 180.- Liston J.,Wiebe W. y Colwell R.R. Quantitative approach to --
the study of bacterial species. J. Bact. 85: 1061-1070 1963.
- 181.- Liu P.V. Factors that influence toxigenicity of Ps aeruginosa
J. Bact. 88 : 1421 - 1427 1964 .
- 182.- - - - The roles of various fractions of Pseudomonas -----
aeruginosa in its pathogenesis II. Effects of lecithinase and
protease. J. Infect. Dis. 116 : 112 - 116 1966.
- 183.- - - - The roles of various fractions of Ps aeruginosa in its
pathogenesis III. Identity of the lethal toxin produced in vi__
tro and In vivo . J. Infect. Dis. 116 : 481-489 1966.
- 184.- - - - Changes in somatic antigens of Pseudomonas aeruginosa
induced by bacteriophages. J. Infect. Dis. 119:237-240 1969.
- 185.- - - - Exotoxin of Pseudomonas aeruginosa I. Factors that in

- fluence the production of exotoxin A.II. Concentration , purification and characterization of exotoxin A. III. Characterization of antitoxin A . J. Infect. Dis. 128 : 506 - 526 1973
- 186.- - - - Extracellular toxins of Pseudomonas aeruginosa .
J. Infect. Dis. 130 : suppl. 94 - 99 1974 .
- 187.- - - -,Abe Y. y Bates J.L. The roles of various fractions of Pseudomonas aeruginosa in its pathogenesis.
J. Infect. Dis. 108 : 218 - 228 1961 .
- 188.- - - - y Mercer C.B. Growth , toxigenicity and virulence of-
Pseudomonas aeruginosa. J. Hyg. (Camb.) 61 : 485-491 1963.
- 189.- Loutit J.S. Investigation of the mating system of Ps aeruginosa
strain 1 .IV Mapping of distal markers .
Genet. Res. 13 : 91 - 98 1969 .
- 190.- Lowbury E.J.L. Improved culture methods for detection of ---
Pseudomonas pyocyanea. J. Clin. Path. 4 : 66-72 1951 .
- 191.- - - - Infection of burns. Brit. Med. J. 5178 : 994 - 1001
1960 .
- 192.- - - -,Babb Jr. y Roe E. Clearance from a hospital of Gram -
negative bacilli that transfer Carbenicillin-resistance to --
Pseudomonas aeruginosa. Lancet 2: 941-945 1972.
- 193.- - - - y Collins A. Use of new oetrimide product in selecti-
ve medium for Pseudomonas pyocyanea .
J. Clin. Path. 8 : 47 - 48 1955 .
- 194.- - - -, Lilly H.A. y Wilkins M.D. A gabinet for the detecti-
ve of fluorescent bacterial cultures.
J. Clin. Path. 15 : 339 - 342 1962 .
- 195.- - - -,et.al. Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to anti-

- biotios : emergence of strains highly resistant to Carbenicillin. Lancet 2 : 448 - 452 1969.
- 196.- Magasanik B. 1961 Cold. Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology 26 , 249.
- 197.- Mee B.J. y Lee B.T. A map order for his I , one of the genetic regions controlling histidine biosynthesis in Pseudomonas aeruginosa using the transducing phage F 116 . Genetics 62 : 687 - 696 1969 .
- 198.- Meitert E. Schema de lysotypie pour Pseudomonas aeruginosa . Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol. 24 : 439 - 458 1965 (Fr)
- 199.- Meynell E. ,Meynell G.G. y Datta N. Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bact. Rev. 32 : 55 - 83 1968 .
- 200.- Michaels G. y Eagon R. The effect of ethylene diamine tetraacetate and of lysozyme on isolated lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 122 : 866 -868 1966.
- 201.- Midgley M. y Dawes E.A. The regulation of transport of glucose and methyl alpha - glucoside in Pseudomonas aeruginosa . Biochem. J. 132 : 141 - 154 1973 .
- 202.- Misaghi I y Grogan R.G. Nutritional and biochemical comparisons of plant - pathogenic and saprophytic fluorescent Pseudomonads. Phytopathology 59 : 1436 -1450 1969 .
- 203.- Morihara K. Pseudomonas aeruginosa proteinase I. Purification and general properties . Biochim. Biophys. Acta 73 : 113-124 1963 .
- 204.- - - - y Tsuzuki H. Production of protease and elastase by

- Pseudomonas aeruginosa strains isolated from patients.
Infect. Immun. 15 : 679 -685 1977 .
- 205.- Mull J.D. y Callahan W.S. The role of the elastase of -----
Pseudomonas aeruginosa in experimental infection .
Exp. Molec. Path. 4 : 567 - 575 1965.
- 206.- Muraschi T.F. ,et.al. Serological types of Ps aeruginosa ba_
sed on heat-stable O antigens : Correlation of Habs (European)
and Verder and Evans (North American) Classification .
J. Infect. Dis. 116 : 84 - 88 1966.
- 207.- Myerowitz R.L.,et.al. Urinary - tract Escherichia coli with -
cross - reactive antigens to encapsulated pyogenic bacteria.
Lancet 2 : 250 - 253 1972 .
- 208.- Nason A. y Takahashi H. Inorganic Nitrogen Metabolism .
Ann. Rev. Microbiol. 12 : 203 - 246 1958.
- 209 .- Ng F.M. y Dawes E.A. Chemostat studies on the regulation of -
glucose metabolism in Pseudomonas aeruginosa by citrate .
Biochem . J. 132 : 129 - 140 1973 .
- 210.- Noble W.C. y Savin J.A. Steroid cream contaminated with -----
Pseudomonas aeruginosa . Lancet 1 : 347 -349 1966 .
- 211.- Nomura M. Colicins and related bacteriocins .
Ann. Rev. Microbiol . 21 : 257 - 284 1967 .
- 212 .- Noone P.,et.al. Pneumonia caused by coliforms and Pseudomonas
aeruginosa. J. Clin. Pathol. 29 : 652 - 656 1976 .
- 213.- Nordwig A. Collagenolytic enzymes . Adv. Enzymol. 34 : 155 -
205 1971 .
- 214.- Novick R.P. Extrachromosomal inheritance in bacteria .
Bact. Rev. 33 : 210 - 235 1969 .

- 215.- Nunn S.L. y Wellman W.E. Pseudomonas Meningitis : report of a case. Med. Cin. N. Amer. 44 : 1075 - 1078 1960 .
- 216.- O'Callaghan R.J., O'Mara W.O. y Grogen J.B. Physical stability and biological and physicochemical properties of twelve - Pseudomonas aeruginosa bacteriophages. Virol. 37 : 642-648 1969.
- 217.- Ohkawa I., Kageyama M. y Egami F. Purification and properties of pyocin S 2*. J. Biochem. 73 : 281 -289 1973 .
- 218.- Okamoto S. y Suzuki Y. Chloramphenicol-, Dihydrostreptomycin -, and Kanamycin - inactivating enzymes from multiple Drug - Resistant Escherichia coli carrying Episome "R" . Nature (London) 208 : 1301 - 1303 1965 .
- 219.- Olsen R.H. y Shipley P. Host range and properties of the --- Pseudomonas aeruginosa R factor R 1822 . J. Bacteriol. 113 : 772 - 780 1973.
- 220.- Order S.E., et.al. The pathogenesis of second and third degree burns and conversion to full thickness injury . Surg. Gynec. Obstet. 120 : 983 - 991 1965 .
- 221.- - - -, et.al. Vascular destructive effects of thermal injury and its relationship to burn wound sepsis . J. Trauma 5 : 62 : 71 1965 .
- 222.- Palleroni N.J. y Doudoroff M. Some properties and taxonomic-subdivisions of the genus Pseudomonas . Annu. Rev. Phytopathol. 10 : 73 - 100 1972 .
- 223.- - - -, Doudoroff M., Stajner R.Y. y Mandel M. Taxonomy of --- the aerobic Pseudomonads: the properties of the Pseudomonas stutzeri group. J. Gen. Microbiol. 60 : 215 - 231 1970.

- 224.- - - - , Kunisawa R., Contopoulou R. y Doudoroff M. Nucleic acid homologies in the genus Pseudomonas .
Int. J. Syst. Bact. 23 : 333 - 339 1973 .
- 225.- - - - y Stanier R.Y. Regulatory mechanisms governing synthesis of the enzymes for tryptophan oxidation by Pseudomonas fluorescens . J. Gen. Microbiol. 35 : 319 - 334 1964 .
- 226.- Pavlatou M/P/, Hassikou - Kaklamani E. Stability of Pseudomonas pyocyanea lysotypes In vivo and In vitro .
Ann. Inst. Pasteur 102 : 300 - 308 1962 (FR) .
- 227.- Pavlovskis O.R. y Shackelford A.H. Pseudomonas aeruginosa - exotoxin in mice : localization and effect on protein synthesis. Infect. Immun. 9 : 540 - 546 1974 .
- 228.- Pemberton J.M. y Clark A.J. Detection and characterization of plasmids in Pseudomonas aeruginosa strain PAO .
J. Bacteriol. 114 : 424 - 433 1973 .
- 229.- - - - y Holloway B.W. Chromosome mapping in Pseudomonas aeruginosa . Genet. Res. 19 : 251 - 260 1972 .
- 230.- Pettit F. y Lowbury E.J. Survival of wound pathogens under different environmental conditions. J. Hyg. (Camb.) 66 : 393 - 406 1968 .
- 231.- Phillips I. Identification of Pseudomonas aeruginosa in the clinical laboratory . J. Med. Microbiol. 2 : 9 - 16 1969 .
- 232.- Phibbs P.V. y Eagon R.G. Transport and phosphorylation of glucose , fructose and mannitol by Pseudomonas aeruginosa .
Arch. Biochem . 138 : 470 - 482 1970 .
- 233.- Pichinoty F. et.al. Recherche des nitrate - réductases bactériennes A et B : resultats. Ann. Inst. Pasteur (Paris) 116 :

- 27 - 42 1969 (FR) -
- 234.- Pierce A.K. et.al. An analysis of factors predisposing to -
Gram - negative bacillary necrotizing pneumonia .
Amer. Rev. Resp. Dis. 94 : 309 - 315 1966 .
- 235.- Polk H.C. y Stone H.H. 1972 in Contemporary Burn Management
(Eds. Polk H.C. & Stone H.H.) Little Brown & Co. Boston
p. 303 .
- 236.- - - -,et.al. Early detection of Pseudomonas burn infection
Clinical experience with wood's light fluorescence .
Arch. Surg. (Chicago) 98: 292 - 295 1969 .
- 237.- Pollack M, Callahan III L.T. y Taylor N.S. Neutralizing anti-
body to Pseudomonas aeruginosa exotoxin in human sera : Evi-
dence for In vivo toxin production during infections.
Infect. Immun. 14 (4) 942 - 947 1976 .
- 238.- Postic B. y Funland M. Observations on bacteriophage typing
of Pseudomonas aeruginosa .
J. Clin. Invest. 40 : 2064 - 2075 . 1961 .
- 239.- Freisler H.D.,Goldstein I.M. y Henderson E.S. Gastrointesti-
nal " Sterilization " in the treatment of patients with acute
leukemia . Cancer 26 : 1076 - 1081 1970 .
- 240.- Pruitt B.A. Jr. Infections caused by Pseudomonas species in-
patients with burns and in other surgical patients .
J. Infect. Dis. 130 : Suppl. 8 - 13 1974 .
- 241.- Rabin E.R. ,et.al. Fatal Pseudomonas infections in burned -
patients. A clinical , bacteriologic and anatomic study .
New. Engl. J. Med. 265 : 1225 - 1231 1961 .
- 242.- Ralston E.,Palleroni N.J. y Doudoroff M. Deoxyribonucleic -

- acid homologues of some so-called "Hydrogenomonas" species
J. Bacteriol. 109 : 465 - 466 1972 .
- 243.- Rayter A. Association of the nucleus and the membrane of bacteria : a morphological study. *Bact. Rev.* 32: 39-54 1968.
- 244.- Reiner A.M. Metabolism of aromatic compounds in bacteria : - purification and properties of the catechol forming enzyme 3,5-cyclohexadiene - 1,2 diol 1-carboxylic acid (NAD⁺) oxido reductase (decarboxylating). *J. Biol. Chem.* 247 : 4960 - 4965 1972.
- 245.- Reiner L., Schlesinger M.J. y Miller G.M. Pseudomembranous - colitis following aureomycin and chloramphenicol .
A.M.A. Arch. Path. 54 : 39 - 67 1952 .
- 246.- Reynolds H.Y., et.al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* . A sign of cystic fibrosis in young adults with chronic pulmonary - disease . *J.A.M.A.* 236 (19) : 2190 - 2192 1976 .
- 247.- Rheinwald J.G., Chakrabarty A.M. y Gunsalus I.C. A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 885-889 1973 .
- 248.- Rhodes M.E. The taxonomy of the *Pseudomonas fluorescens* species group . *J. Gen. Microbiol.* 69 : xi 1971 .
- 249.- Ritzmann S.E., et.al. Immunoglobulin levels in burned patients
Lancet 1 : 1152 - 1153 1969 .
- 250.- Roe E.A. y Jones R.J. Intracellular killing of different - strains of *Pseudomonas aeruginosa* by human leucocytes .
Br. J. Exp. Path. 55 : 336 - 343 1974 .
- 251.- - - - , Jones R.J. y Lowbury E.J. Transfer of antibiotic resistance between *Ps aeruginosa* , *E coli* y other gram - negati_

- ve bacilli in burns . Lancet 1: 149 - 152 1971 .
- 252.- Rubbo S.D., Gardner J.F. y Franklin J.C. Source of Pseudomonas aeruginosa infection in premature infants .
J. Hyg. (Camb.) 64 : 121 -128 1966.
- 253.- Sabath L.D., Jago M. y Abraham E.P. Cephalosporinase and penicillinase activities of a beta- lactamase from Pseudomonas pyocyanea. Biochem. J. 96 : 739-752 1965 .
- 254.- Sala - Trepas J.M., Murray K. y Williams P.A. The metabolic - divergence in the meta cleavage of catechols by Pseudomonas putida WCIB 10015 physiological significance and evolutionary implications. Eur. J. Biochem. 28: 347-356 1972.
- 255.- Saltzman M. Otitis externa : Clinical aspects and bacteriologic studies . Clin. Med. 70 : 559 -570 1963.
- 256.- Sánchez Casado E., et.al. Endocarditis caused by Pseudomonas aeruginosa . Description of a case with perforation of the - aortic valve . Rev. Clin. Esp. 142: 275-279 1976 .
- 257.- Sands D.C., Schroth M.N. y Hildebrand D.C. Taxonomy of phytopathogenic Pseudomonads . J. Bact. 101 : 9 - 23 1970 .
- 258.- Sawula R.V. y Grawford I.P. Mapping of the tryptophan genes of Acinetobacter calcoaceticus by transformation .
J. Bacteriol. 112 : 797 - 805 1972.
- 259 .- Schimpff S.C., et.al. Significance of Pseudomonas aeruginosa in the patient with leukemia or lymphoma .
J. Infect. Dis. 130 : Suppl. 24 - 32 1974 .
- 260.- - - -, et.al. Origin of infection in acute non lymphocytic leukemia significance of hospital acquisition of potential pathogens . Ann. Intern. Med. 77 : 707 - 714 1972 .

- 261.- - - - y Wiernik P.H. y Block J.B. Rectal abscesses in -- cancer patients. *Lancet* 2 : 844 -847 1972 .
- 262.- Schwartzmann S. y Boring J.R. Antiphagocytic effect of sli_ me from a mucoid strain of Pseudomonas aeruginosa . *Infec. Immun.* 3 : 762 - 767 1971.
- 263.- Selenka F. Differentiation of Pseudomonas aeruginosa compa_ red with Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida on- T.T.C. culture medium . *Arch. Hyg. Münch.* 142 (8) : 569 - 574 1958 .
- 264.- Selwyn S. The mechanism and prevention of cross- infection- in dermatological wards . *J. Hyg.(Camb.)* 63: 59 - 71 1965.
- 265.- Sensakovic J.W. y Bartell P.F. The slime of Pseudomonas --- aeruginosa : biological characterization and possible role - in experimental infection. *J. Infect. Dis.* 129 : 101 - 109 1974 .
- 266.- Shargool P.D. y Townsend E.E. Pseudomonas aeruginosa bacte_ riophage SD 1 . *Canad. J. Microbiol.* 12 : 885-893 1966 .
- 267.- Sharrock M.,et.al. Mössbauer studies of cytochrome P - 450 cam. *Biochemistry* 12: 258 - 265 1973 .
- 268.- Shionoya H. y Homma J.Y. Dissociation in Pseudomonas aerugi_ nosa. *Jap. J. Exp. Med.* 38 : 81 - 94 1968 .
- 269.- Sickles E.A.,et.al. Pneumonia in acute leukemia . *Ann. Intern. Med.* 79 : 528 - 534 1973 .
- 270.- Sierra G. Hemolytic effect of a glycolipid produced by -- Pseudomonas aeruginosa . *Antonie Van Leeuwenhoek* 26: 189 - 192 1960.

- 271.- Sjöberg L. y Lindberg A.D. Phage typing of Pseudomonas aeruginosa. Acta Path. Microbiol. Scand. (B) 74 : 61 - 68 1968 .
- 272.- Slayter H.S., Holloways B.W. y Hall C.E. The structure of -- Pseudomonas aeruginosa phages B 3 , E 79 y F 116 .
J. Ultrastruct. Res. 11: 274 - 81 1964.
- 273.- Smyth y Clarke P.H. Catabolite repression of Pseudomonas aeruginosa amidase. J. Gen. Microbiol. 73 : ix - x 1972.
- 274.- Sneath P.H.A. A study of the bacterial genus chromobacterium. Iowa State Journal Of Science 34 : 243 - 271 1960 .
- 275.- Speirs C.F., Selwyn S. y Nicholson D.N. Hypogammaglobulinæmia presenting as Pseudomonas septicæmia .
Lancet 2: 710 - 712 1963 .
- 276.- Stanier R.Y., Palleroni N.J. y Duodoroff M. The aerobic --- Pseudomonads : a taxonomic study .
J. Gen. Microbiol. 43: 159 - 271 1966.
- 277.- Stanisich V y Holloway B.W. Conjugation in Pseudomonas ---- aeruginosa. Genet. 61 : 327 - 339 1969 .
- 278.- Stanisich V.A. y Holloway B.W. Chromosome transfer in ---- Pseudomonas aeruginosa mediated by R factors ,
Genet. Res. Camb. 17 : 169 - 172 1971 .
- 279 .- - - - y Holloway B.W. A mutant sex factor of Pseudomonas - aeruginosa . Genet. Res. Camb. 19 : 91 - 108 1972 .
- 280.- Stevenson I.L., Mandelstam J. Induction and multi-sensitive-end-product repression in two converging pathways degrading aromatic substances in Pseudomonas fluorescens .
Biochem. J. 96: 354-362 1965 .
- 281.- Stone H.H., Martin J.D. Jr. y Graber C.D. Verdoglobulinuria : an

- ominous sign of Pseudomonas septicemia in burns .
Ann. Surg. 159 : 991 - 995 1964 .
- 282.- Sussman M. y Stevens J. Pseudomonas pyocyanea wound infection. An outbreak in a orthopaedic unit .
Lancet 2 : 734 - 736 1960 .
- 283.- Sutter V.L., Hurst V. y Fennell J. A standardized system -- for phage typing Pseudomonas aeruginosa.
Health Lab. Sci. 2 : 7 - 16 1965.
- 284.- Sutter V.L., Hurst V. y Grossman . Source and significance of Pseudomonas aeruginosa in sputum patients requiring tracheal suction . J.A.M.A. 197: 854-858 1966.
- 285.- Suzuki A.J. y Goto M. Isolation and Characterization of -- pteridines from Pseudomonas ovalis . Bull. Chem. Soc. Japan 44 : 1869 - 1872 1971 .
- 286.- Sykes R.B. y Richmond M.A. Intergeneric transfer of a beta - lactamase gene between Pseudomonas aeruginosa and --- Escherichia coli. Nature (London) 226 : 952-954 1970 .
- 287.- Takeya K., et.al. A small rod-shaped pyocin .
Virology 31 : 166 - 168 1967 .
- 288.- Taplin D. y Zaias N. Tropical immersion foot syndrome .
Milit. Med. 131 : 814 : 818 1966.
- 289.- - - -, Zaias N. y Rebell G. Environmental influences on the microbiology of the skin . Arch. Environ. Health (Chicago) 11 : 546 - 550 1965 .
- 290.- Tapper M/L. y Armstrong D. Bacteremia due to Pseudomonas aeruginosa complicating neoplastic disease: A progress report. J. Infect. Dis. 130 : Suppl. 14 - 23 1974 .

- 291.- Teplitz C. Pathogenesis of Pseudomonas vasculitis and septic legions. Arch. Path 80 : 297 -307 1965.
- 292.- - - -,et.al. Pseudomonas burn wound sepsis : I. Pathogenesis of experimental Pseudomonas burn wound sepsis. J. Surg. Res. 4 : 200 - 216 1964 .
- 293.- - - -,et-al. Pseudomonas burn wound sepsis II. Hematogenous infection at junction of burn wound and unburned hypodermis. J. Surg. Res. 4 : 217 - 222 1964.
- 294.- - - -,et.al. Spontaneous hematogenous Pseudomonas pyelonephritis in rats. J. Infect. Dis. 114 : 75 - 9 1964.
- 295.- Teres D.,et.al. Sources of Pseudomonas aeruginosa infection in a respiratory - surgical intensive - therapy unit. Lancet 1 : 415 - 417 1973.
- 296.- Thornley M.J. The differentiation of Pseudomonas from other Gram - negative bacteria on the basis of arginine metabolism . J. Appl. Bact. 23 : 37 1960 .
- 297.- Tripathy G.S. y Chadwick P. The effect of mitomycin C on the pyocine typing patterns of hospital strains of Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Microbiol. 17 : 829-835 1971.
- 298.- Vasil M.L.,Kabat D. y Iglewski B.H. Structure - activity relationships of an Exotoxin of Pseudomonas aeruginosa . Infect. Immun. 16 : 353 - 361 1977.
- 299.- Verder E y Evans J.A. A proposed antigenic schema for differentiation of strains of Pseudomonas aeruginosa . J. Infect. Dis. 109 : 183 -193 1961 .
- 300.- Wahba A.H. Hospital infection with Pseudomonas pyocyanea : an investigation by a combined pyocine and serological ty_

- ping method. Brit. Med. J. 5427 : 86 - 89 1965 .
- 301.- - - - y Darell J.H. The identification of atypical strains of Pseudomonas aeruginosa . J. Gen. Microbiol. 38 : 329-342 1965 .
- 302.- Walker H.L., Mason A.D. y Raulston G.L. Surface infection with Pseudomonas aeruginosa . Ann. Surg. 160: 297- 305 1964 .
- 303.- Waltho J.A. y Holloway B.W. Supression of fluorophenyl-alanina resistance by mutation to streptomycin resistance in Pseudomonas aeruginosa. J. Bact. 92 : 35 - 42 1966.
- 304.- Weingarten M.A. y Coll J.R. Otitis externa due to Pseudomonas in swimming pool bathers . Gen. Pract. 27 (179) : 359 - 360 1977.
- 305.- Weiss R.L. y Raj H.D. The structure and isolation of pili-(fimbriae) of Pseudomonas aeruginosa . Aust. J. Exp. Biol Med. Sci. 50 : 559 - 566 1972 .
- 306.- Weppelman R.M. y Brinton C.C. The infection of Pseudomonas aeruginosa by RNA pilus phage PP 7 : the adsorption organelle and the relationship between phage sensitivity and the division cycle . Virol. 44 : 1 - 17 1971 .
- 307.- Whitby J.L. y Rampling A. Pseudomonas aeruginosa contamination in domestic and hospital environments . Lancet 1 : 15 - 17 1972 .
- 308.- Whitecar J.P., Luna M. y Bodey G.P. Pseudomonas bacteremia in patients with malignant diseases . Am. J. Med. Sci. 260 : 216 - 223 1970 .
- 309.- Williams R.J. y Govan J.R. Pyocine typing of mucoid strains

- of Pseudomonas aeruginosa isolated from children with cystic fibrosis. J. Med. Microbiol. 6 : 409 - 412 1973 .
- 310.- Witchitz J.L. y Chabbert Y.A. Résistance transférable a la Gentamicine I. Expression du caractere de resistance .
Ann. Inst. Pasteur (Paris) 121 : 733 - 742 1971 (FR).
- 311.- Yamamoto T. Presence of rhabdosomes in various species of bacteria and their morphological characteristics .
J. Bact. 94: 1746 -1756 1967 .
- 312.- - - - y Chow C.T. Mitomycin C induction of a temperate - phage in Pseudomonas aeruginosa. Canad. J. Microbiol. 14: 667 - 673 1968 .
- 313.- Yamanaka T. Identity of Pseudomonas cytochrome oxidase with Pseudomonas nitrite reductase . Nature(London) 204: 253 - 255 1964 .
- 314.- - - - y Okuniki K. Crystalline Pseudomonas cytochrome - oxidase I. Enzimatic properties with special reference to the biological specificity II. Spectral properties of the enzyme III. Properties of the prosthetic groups.
Biochim. Biophys. Acta. 67: 379 - 416 1963.
- 315.- Young H.O., et.al. Ultrastructure of Pseudomonas saccharo- phila at early an late log phase of growth .
J. Bacteriol. 102: 862 - 868 1972.
- 316.- Young L.S. Human immunity to Pseudomonas aeruginosa II. Relationship between heat-stable opsonins and type speci__fic lipopolysaccharide . J. Infect. Dis. 126 : 277-287 1972
- 317.- Young W.E. Acute leukemia and infection . J.A.M.A. 201 : 923 - 926 1967 .

- 318.- Yui - Furihata C. Structure of pyocin R II. Subunits of - sheath. J. Biochem. (tokyo) 72: 1 - 10 1972 .
- 319.- Zabransky R.J. y Day F.E. Pyocine typing of clinical strains of Pseudomonas aeruginosa .
Appl. Microbiol. 17 : 293 - 296 1969 .
- 320.- Zaky D.A.,et.al. Malignant external otitis : a severe form of otitis in diabetic patients .
Am. J. Med. 61 (2) : 298 - 302 1976 .

Esta Tesis se Imprimió en Noviembre de 1978
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A. Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F