

35

2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA

"LA ACTUAL IMPORTANCIA CLINICA DE Pseudomonas aeruginosa"

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA: JAVIER FERNANDEZ TORRES



258013

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Profa. ELDA PENICHE QUINTANA
Vocal: Profa. MA. ELSA ESCUDERO GARCÍA
Secretario: Prof. RAÚL GARZA VELASCO
1er. Suplente: Profa. ADRIANA GUADALUPE MEJÍA CHÁVEZ
2o. Suplente: Prof. EDUARDO BONILLA ESPINOSA


El tema se desarrolló en la biblioteca de la Facultad de Química de la UNAM,
así como en diversas bibliotecas del Sector Salud.

Asesor del tema:



QFB. Raúl Garza Velasco

Sustentante:



Javier Fernández Torres

Agradecimientos:

- Doy gracias a Dios por permitirme subir un escalón más de mi vida y por haber realizado este trabajo.

- A mi madre Virginia Torres, por tus buenos consejos y el gran apoyo incondicional que siempre me has dado. Gracias por la confianza que me tienes.

- A mis hermanas Virginia, Cristina y Laura por estar siempre conmigo y por su gran apoyo que siempre me han dado. Gracias por todo.

- A mi hermano Jorge, que a pesar de la gran distancia que nos separa, sé que siempre has estado cerca de mí. Gracias por los momentos que me dedicaste; espero que nos veamos pronto.

- A mi cuñado Carlos Puente por su gran apoyo y por los momentos de alegría que hemos pasado juntos. Gracias por todo.

- A mi profesor y asesor QFB. Raúl Garza Velasco por el tiempo que me dedicó para realizar este trabajo, por sus buenos consejos y por haberme introducido al interesante campo de la Bacteriología. Gracias por todo.

- A la QFB. Elda Peniche Quintana por sus consejos y la orientación que me dió para realizar este trabajo.

- A todos mis profesores y compañeros que siempre estuvieron conmigo.
- A la U.N.A.M. y en especial a la Facultad de Química por facilitarme sus instalaciones.

- A mis amigos Fabián Valadez, Gonzalo Lomán, Eduardo Minauro, Arturo y Eréndira Meza, Howard Núñez, Vanesa González y a todas mis amigas y amigos que siempre estuvieron y creyeron en mí. Gracias por todos los momentos que hemos pasado juntos, por sus consejos, por sus regaños y por su gran apoyo incondicional.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
I. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS	
MICROBIOLÓGICAS DE <i>P. aeruginosa</i>	
Aspectos taxonómicos.....	5
Composición antigénica.....	7
Características microscópicas.....	9
Propiedades culturales.....	9
Medios de cultivo.....	9
Condiciones de incubación.....	10
Características macroscópicas.....	11
Resistencia a agentes físicos y químicos.....	13
Identificación bioquímica.....	14
II. IMPORTANCIA CLÍNICA DE <i>P. aeruginosa</i>	
Epidemiología.....	16
Principales factores de patogenicidad.....	19
Adhesinas.....	22
Capa limosa o mucoide.....	24
Exotoxina A.....	25

Exoenzima S.....	29
Proteasas.....	31
Hemolisinas.....	33
Citotoxina.....	34
Pigmentos.....	34

III. ENTIDADES CLÍNICAS ASOCIADAS a

Pseudomonas aeruginosa

Fibrosis quística.....	37
Neumonía.....	41
Infecciones oculares.....	43
Endocarditis.....	45
Septicemia.....	46
Meningitis.....	48
Osteomielitis.....	49
Infecciones urinarias.....	50
Infecciones en piel y tejidos blandos.....	52

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO..... 56

V. TRATAMIENTO..... 69

CONCLUSIONES..... 77

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 79

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Pseudomonas* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, poseen amplias capacidades oxidativas y desempeñan papeles importantes en los ciclos de desintegración de diversas sustancias en la naturaleza. Aunque la mayor parte de estos microorganismos se localiza en forma libre, como saprófitos de tierra y agua, algunos parasitan gran número de plantas y animales, tanto de sangre fría como de sangre caliente, incluidos diversos insectos.

Por ejemplo, *P. pseudomallei* y *P. mallei* son francamente patógenas para varias especies animales, las cuales a su vez fungen como focos infecciosos para los seres humanos; la melioidosis, producida por *P. pseudomallei*, es una enfermedad natural de animales domésticos y salvajes, la transmiten accidentalmente al hombre; por su parte, *P. mallei* es el agente etiológico del muermo, padecimiento clásico de los equinos. Otras especies de *Pseudomonas* que ocasionan

padecimientos al humano son: *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. pseudomallei*, *P. multivorans*, *P. stutzeri* y *P. maltophilia*.

Sin embargo, *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más relevante; de hecho, las manchas azules o verde azuladas que suelen aparecer en los apósitos quirúrgicos, han atraído desde siempre la atención de los especialistas: en 1860, antes de que se descubriera el origen de dicho pigmento, Fordos realizó varios estudios sobre su composición, si bien fue hasta 1882 cuando Gessard estableció que se trataba de una sustancia excretada por un microorganismo al que había logrado aislar en cultivo puro.

Cabe subrayar que, antes de la década de los 40's, las infecciones ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa* eran poco frecuentes; no obstante, ello contrasta notablemente con lo que ocurre en la actualidad, ya que esta especie representa uno de los agentes oportunistas que afectan con mayor frecuencia a los individuos debilitados, quemados o inmunocomprometidos a quienes causa un amplio espectro de entidades clínicas en diversos tejidos, incluyendo pulmones, ojos, riñones, oídos, piel, corazón, huesos y el sistema nervioso central (SNC).

Además, se ha comprobado ampliamente que *P. aeruginosa* es una de las especies bacterianas más resistentes a la mayoría de los antibióticos de uso común, al grado de que los equipos de salud consideran que el control futuro de las infecciones debidas a esta especie resultará poco exitoso.

El presente trabajo intenta presentar los principales aspectos relacionados con la actual patología, diagnóstico de laboratorio y tratamiento de las diversas enfermedades ocasionadas por *P. aeruginosa*.

OBJETIVOS

- Describir las características de los principales padecimientos ocasionados por *P. aeruginosa*.
- Enumerar los factores de patogenicidad detectados en *P. aeruginosa*, asociándolos a sus probables mecanismos de acción y a las lesiones ocasionadas por dicha especie bacteriana.
- Describir las metodologías que se emplean actualmente para establecer el diagnóstico de laboratorio de las afecciones causadas por *P. aeruginosa*.
- Subrayar los aspectos más relevantes acerca del tratamiento de las enfermedades causadas por *P. aeruginosa*.

I. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DE *Pseudomonas aeruginosa*

Aspectos taxonómicos

El género *Pseudomonas* constituye uno de los grupos bacterianos más extensos, ya que comprende más de cien especies reconocidas, aunque se han propuesto muchas más, su posición taxonómica es aún dudosa. De acuerdo con la novena edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (1994), estos microorganismos se ubican en el grupo 4: Bacilos y cocos Gram negativos, aerobios y microaerófilos, subgrupo 4a (que crecen bajo una atmósfera de 21 % de O₂) (49).

Por lo que respecta a la especie *P. aeruginosa*, las técnicas de hibridación del DNA han permitido diferenciar con mayor precisión las cepas causantes de los brotes epidémicos y establecer que la transferencia genética entre diversas cepas

se lleva a cabo por conjugación y transducción; su contenido G-C en su DNA es de aproximadamente de 67 moles por ciento y la lisogenia es común en numerosas cepas infectadas por al menos un profago.

La comparación entre los mapas genéticos de las pseudomonas y los pertenecientes a las bacterias entéricas muestran diferencias fundamentales en cuanto a la disposición de los genes funcionalmente relacionados: la secuencia genética de *P. aeruginosa* no es contigua, mientras que en las enterobacterias los genes similares se encuentran en una secuencia contigua; adicionalmente, los determinantes bacteriocinogénicos se ubican en los plásmidos de las enterobacterias y en el cromosoma de *P. aeruginosa* (43, 95).

Tabla 1. Principales especies de *Pseudomonas*.

ORDEN	FAMILIA	GÉNERO	ESPECIES
<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i> <i>P. mallei</i> <i>P. pseudo-mallei</i> <i>P. cepacia</i> <i>P. maltophilia</i> <i>P. putrefaciens</i> <i>P. stutzeri</i> <i>P. pseudo-alcaligenes</i>

Composición antigénica

La estructura química de *Pseudomonas aeruginosa* es muy similar a la observada en la familia *Enterobacteriaceae*; de hecho, presenta varios antígenos H (Ag H) en su(s) flagelo(s) polar(es), sin embargo, el lipopolisacárido (LPS) localizado en la pared celular, también denominado antígeno O (AgO), difiere en relación al de las bacterias entéricas: aunque el centro del LPS de ambos grupos de microorganismos contiene ácido 2-ceto-3-desoxioctanoico (KDO) y lípido A, el LPS de *P. aeruginosa* contiene más fósforo, una L-alanina-amido unida, los

aminoazúcares fucosamida y quinovosamina, además de carecer ocasionalmente del ácido β -hidroximirístico, posee polisacáridos centrales -comunes a todas las cepas- y polisacáridos de cadena lateral -específicos de cepa- (29, 43, 65).

Por otra parte, los microorganismos aislados a partir de muestras clínicas con frecuencia presentan pili que promueven la adherencia de las cepas a los tejidos del hospedador.

Finalmente, *P. aeruginosa* suele presentar una cubierta extracelular semejante a una cápsula, a la que se conoce como capa limosa o mucoide y cuya composición consiste en un polímero aniónico de ácidos β -1,4- manurónico y L-galurónico, en el cual algunos de los residuos de manuronato están mono-orto-acetilados y otros están di-orto-acetilados. Este polímero, también llamado alginato, es diferente a otros alginatos por cuanto que carece de los bloques de poligaluronato, lo que influye para que la estructura global sea más elástica y menos frágil; cabe mencionar que los microorganismos provenientes de pacientes con fibrosis quística tienen un aspecto extremadamente mucoide debido a la capa limosa, misma que funge como un inmunógeno con acción antifagocitaria, y que impide

la libre difusión de los antibióticos hacia el citoplasma de la bacteria (4, 17, 43, 66).

Características microscópicas

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, recto o ligeramente curvo, que mide 0.5 a 0.8 μm x 1.5 a 4 μm y suele presentarse en forma individual (sin agrupación), aunque ocasionalmente se le puede observar en pares o en cadenas cortas. Posee un flagelo polar único que le confiere una gran movilidad, la cual aumenta en algunas cepas en las que se evidencian hasta tres flagelos polares; esta especie es no capsulada ni esporulada y en frotis teñidos es indistinguible de las enterobacterias (8, 66, 67, 95, 103).

Propiedades culturales

Medios de cultivo

Pseudomonas aeruginosa, al igual que otros miembros de su género, es muy versátil desde el punto de vista metabólico, y no es exigente en cuanto a sus

requerimientos nutricionales, por lo que crece adecuadamente en los medios de cultivo comunes. Se ha comprobado ampliamente su incomparable capacidad para utilizar una gran variedad de sustratos orgánicos; de hecho, numerosas cepas pueden metabolizar más de cien compuestos orgánicos y llegan a desarrollar en medios aparentemente inadecuados para otras especies bacterianas, incluyendo desinfectantes, agua del grifo, soluciones oftálmicas, agua destilada, etc. Adicionalmente, crece en medios alcalinos empleados generalmente para llevar a cabo el aislamiento de *Vibrio* y hasta en los que contienen altas concentraciones de cloruro de sodio que se destinan al cultivo de estafilococos. Sin embargo, para fines diagnósticos en el laboratorio, se prefiere emplear algunos medios ligeramente selectivos para enterobacterias, destacando el agar MacConkey y el agar Eosina Azul de Metileno (EMB), aunque también se emplea la gelosa sangre, ya que *P. aeruginosa*, a diferencia de la familia *Enterobacteriaceae*, es hemolítica (40, 43, 66, 67, 103).

Condiciones de incubación

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria aerobia estricta no fermentativa que, sin embargo, llega a crecer en condiciones anaerobias cuando el medio contiene

nitratos, a los que puede emplear como alternos aceptores finales de electrones; además, puede utilizar a la arginina en forma anaerobia, a través de la vía de la arginina dehidrolasa, generando ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato; si bien crece en forma óptima a 37°C, también lo puede hacer entre los 10 y los 42°C, aunque no a los 4°C; sus colonias características aparecen después de 18 a 24 h de incubación (43, 66, 67).

Características macroscópicas

Pseudomonas aeruginosa presenta tres tipos de colonias: en las placas de agar sangre, después de 24 h, el más común es poco elevado y convexo o plano, de 1 a 5 mm de diámetro; la superficie colonial es rugosa o semejante a vidrio opaco, con bordes ondulados y hemólisis tipo β , aunque a las 48 h ésta puede aparecer difusa.

Un segundo tipo de colonia se observa en las cepas aisladas a partir del esputo de pacientes con fibrosis quística: es relativamente grande y muy mucoide, lo cual resulta aún más claro en agar MacConkey. Estas cepas suelen dar origen al tercer tipo de colonias, después de haberse subcultivado en varias ocasiones; sus

características más consistentes son: tamaño grande y aspecto rugoso (4, 8, 17, 43, 103).

Sin lugar a dudas, otra propiedad interesante de *P. aeruginosa* consiste en la producción de pigmentos que difunden en el medio; el principal es la piocianina (del griego “pus azul”), la cual puede extraerse a partir de soluciones acuosas o clorofórmicas y corresponde a una fenazina no fluorescente de color azul-verdoso con pH neutro o ligeramente alcalino; algunas cepas también producen pigmentos de color rojo oscuro y/o negro (piorrubina y piomelanina, respectivamente), pero estos no son tan frecuentes como la pioverdina (fluoresceína) que es de color amarillo o amarillo-verdoso y no es tan evidente en gelosa sangre como en medios enriquecidos con magnesio, hierro y fosfato, en los que es posible observarla claramente bajo la luz emitida por lámparas ultravioleta. Cabe señalar que la piocianina sólo es producida por *P. aeruginosa*, en tanto que los pigmentos restantes también son producidos por otras especies del género (8, 40, 43, 66, 67, 95, 103).

Resistencia a agentes físicos y químicos

Pseudomonas aeruginosa es una de las bacterias más resistentes a diversos agentes físicos y químicos: sobrevive fácilmente cuando cuenta con la humedad adecuada y un mínimo de nutrimentos; de hecho, se aísla a partir de numerosos sitios dentro del ambiente hospitalario, incluyendo los equipos para cuidados respiratorios, baños, canillas, humidificadores de agua fría, el piso y, en general, de cualquier superficie; también es muy resistente a la desinfección química y se ha comprobado su reproducción en varias soluciones de amonio cuaternario, jabones con hexaclorofeno y soluciones yodadas; las sustancias fenólicas y el β -glutaraldehído suelen ser desinfectantes inefectivos contra esta especie pero, contrastando con lo anterior, este microorganismo es sensible al óxido de etileno, a las temperaturas de 55°C durante una hora y, en menor grado, a la desecación. Finalmente, esta especie resulta muy resistente a múltiples antibióticos y puede adquirir resistencias adicionales durante la antibioticoterapia, lo que genera que se le reconozca como la más resistente a los antimicrobianos, entre todas las bacterias que afectan al humano (43, 66).

Identificación bioquímica

La identificación de esta especie en el laboratorio de microbiología clínica es prácticamente simple, ya que crece fácilmente en una amplia variedad de medios y las pruebas bioquímicas que determinan su identidad son relativamente poco numerosas; de hecho, la prueba de las oxidasas, la producción de piocianina, su capacidad para desarrollar a 42°C y un característico olor dulzón o a tortillas húmedas, puede ser suficiente para diferenciarla de otras especies del género.

La tabla 2 muestra los patrones de identificación de las principales especies de pseudomonas encontradas en muestras de pacientes infectados.

Tabla 2. Pruebas involucradas en la identificación de las principales especies de *Pseudomonas*.

Prueba	1	2	3	4	5	6	7
Oxidasa	+	+	+	d	+	+	-
Piocianina	+	-	-	-	-	-	-
Desarrollo 42°C ^a	+	-	-	-	+	d	d
Movilidad	+	+	+	-	+	+	+
Otros pigmentos	+	+	+	-	-	-	+
Oxidación de glucosa *	+	+	+	+	+	+	+
Oxidación de maltosa *	-	d	d	+	+	+	+
Oxidación de lactosa *	-	d	d	+	+	+	d
Oxidación de manitol *	d	d	d	d	+	+	-
Reducción de NO ₃ ⁻ a NO ₂ ⁻	+	-	-	-	+	-	-
ODC	-	-	-	-	-	d	-
LDC	-	-	-	-	-	+	+
ADH	+	+	+	+	+	-	-

CLAVES: ^a = Desarrollo en caldo infusión de cerebro y corazón (BHI); * = a 30°C en el medio O-F de Hugh y Leifson; ODC = ornitina descarboxilasa; LDC = lisina descarboxilasa; ADH = arginina dehidrolasa; d = entre el 11 y el 89 % de las cepas son positivas; 1 = *P. aeruginosa*; 2 = *P. fluorescens*; 3 = *P. putida*; 4 = *P. mallei*; 5 = *P. pseudomallei*; 6 = *P. cepacia*; 7 = *P. maltophilia*.

II. IMPORTANCIA CLÍNICA DE *P. aeruginosa*

Epidemiología

Pseudomonas aeruginosa presenta una distribución cosmopolita, lo que permite aislarla con facilidad a partir de suelos, agua, plantas, animales y humanos; manifiesta su capacidad patogénica en todo tipo de organismos vivos pero, sobre todo, sus escasos requerimientos nutricionales y su tolerancia a una amplia gama de condiciones climatológicas, físicas y químicas, contribuyen de manera determinante a su gran adaptación a cualquier nicho ecológico.

La epidemiología asociada a *P. aeruginosa* refleja claramente su predilección por los ambientes húmedos, tal como se comprueba al aislarla a partir del perineo, axilas y oídos. Dicha humedad también representa un factor crítico en reservorios hospitalarios tales como el equipo de ventilación mecánica, soluciones de limpieza, medicamentos, desinfectantes, fregaderos, estropajos, mezcladores de

alimentos, vegetales, etc. Adicionalmente, en el ámbito extranosocomial, se le encuentra con regularidad en piletas, albercas, bañeras con agua caliente para hidromasajes y soluciones para lentes de contacto.

La especie en cuestión llega a formar parte de la flora habitual humana, aunque numerosos autores coinciden en señalar que su prevalencia en personas sanas ajenas a los hospitales es relativamente baja. Los índices de colonización por región anatómica son: piel, 0 a 2 %; mucosa nasal, 0 a 3.3 %; faringe, 0 a 6.6 % y, tubo digestivo, 2.6 a 24 %. En contraste, las cifras relacionadas con los nosocomios son mucho mayores, particularmente en la piel de pacientes con quemaduras serias, en el tracto respiratorio inferior de enfermos ventilados, en el tubo digestivo de quienes reciben quimioterapia asociada a neoplasias y en cualquier mucosa o tejido de las personas tratadas con antibióticos. En cada uno de los casos anteriores, un riesgo latente reside en la invasión y diseminación hematógena o linfático-hematógena del microorganismo; de hecho, en unidades especializadas, tales como los centros de atención a quemados o a pacientes con cáncer, *P. aeruginosa* es la especie aislada con mayor frecuencia, considerándose que ocasiona el 30 % de las infecciones adquiridas dentro de los hospitales.

Entre los individuos no hospitalizados que también adquieren diversas afecciones por este bacilo, destacan los adictos a las drogas intravenosas, quienes pueden desarrollar procesos de endocarditis y osteomielitis; adicionalmente, las personas que suelen usar bañeras y/o piscinas mantenidas de forma inapropiada adquieren foliculitis, o una otitis externa conocida como “oído del nadador”; finalmente, las infecciones oculares y la ulceración de la córnea se asocian a la contaminación del líquido limpiador para los lentes de contacto y de los cosméticos, así como a los traumas oculares (83).

La tipificación de las cepas, con finalidades epidemiológicas, se lleva a cabo mediante la susceptibilidad a diversas piocinas¹, a través de patrones de susceptibilidad a bacteriófagos y a la serotipificación de los lipopolisacáridos de la membrana externa. En cuanto a estos inmunotipos, los esquemas empleados más comúnmente son el de Fisher-Gnabasik, que sólo contempla siete tipos diferentes y el del sistema de Tipificación Antigénica Internacional (IATS), que incluye un total de diecisiete serotipos (33, 43, 65, 67, 94).

¹ Las piocinas son bacteriocinas (sustancias antibióticas) cuya estructura proteica es en forma de bastoncitos que semejan “colas de fago” y que se unen a receptores específicos localizados en la pared celular de las cepas bacterianas sensibles.

Principales factores de patogenicidad

A *Pseudomonas aeruginosa* se le considera un patógeno oportunista, dado que principalmente se relaciona con individuos que presentan alguna predisposición a ser colonizados/invadidos por este microorganismo, destacando la falta de integridad de la piel y mucosas, el empleo de sondas intravenosas, catéteres urinarios o tubos endotraqueales, disfunción subyacente en los mecanismos inmunes asociados a neutropenia, hipogammaglobulinemia, deficiencias en el sistema del complemento, e inclusive, terapias inmunosupresivas o quimioterapias (64, 97).

La adaptabilidad de *P. aeruginosa* a una amplia variedad de condiciones físicas, fisicoquímicas y nutricionales, así como su incomparable resistencia a diversos antibióticos, le permiten desarrollar óptimamente tanto en forma parasitaria como en la saprófita.

La patogenia asociada a los padecimientos causados por este microorganismo es muy compleja por cuanto que se trata de una especie que es invasiva y toxigénica, hecho que podría explicar la gran variedad de patologías con las cuales se le

identifica. Generalmente, en las enfermedades ocasionadas por *P. aeruginosa* se pueden diferenciar tres estadios:

1. Unión y colonización bacterianas.
2. Invasión local.
3. Diseminación y afectación sistémica.

Si bien es cierto que cada estadio presenta como antecedente o requisito al que ocurre previamente, es posible que el proceso se detenga antes de que los tres tengan lugar. A este respecto, ciertos factores de virulencia estarían mediando o regulando cada una de estas etapas asociadas a la patogenia, fungiendo como promotores o responsables de síndromes característicos.

La tabla 3 enumera los principales factores de patogenicidad de *P. aeruginosa*.

Tabla 3. Principales productos celulares y extracelulares implicados en la patogenicidad de *P. aeruginosa*.

PRODUCTO	ACCIÓN PATÓGENA
Pili	Promueve la adherencia de la bacteria a las células del hospedador. Sus receptores específicos en estas últimas son los gangliósidos tipo GM1.
Capa mucoide	Es antifagocitaria, impide la libre difusión de los antibióticos hacia el citoplasma del microorganismo y confiere mayor capacidad de adherencia.
Exotoxina A	Inhibe síntesis proteica por ADP-ribosilación del factor de elongación-2 (EF-2). Es producida por el 90% de las cepas.
Exoenzima S	Su actividad es similar a la de la exotoxina A. Es muy importante en la virulencia del microorganismo.
Proteasas	Causan hemorragias y lesiones locales, así como la destrucción de las fibras de elastina de los pulmones y vasos sanguíneos; ulceran la córnea y promueven la invasión de los tejidos.
Hemolisinas	El glucolípido hemoliza los eritrocitos mediante un mecanismo similar al de los detergentes; la fosfolipasa C (lecitinasa) induce lesiones hemorrágicas y necrosantes, causando atelectasia en neumonías.
Citotoxina	Destruye los leucocitos PMN.
Piocianina	Disminuye el movimiento ciliar y destruye el epitelio traqueobronquial vía la formación de aniones oxidantes.
Pioverdina y Pioquelina	Son sideróforos que atrapan hierro, afectando con ello las células del hospedador. El hierro es esencial para la síntesis de la exotoxina A.
Lipopolisacárido	Funge como endotoxina.
Neuraminidasa	Elimina residuos de ácido siálico (neuramínico) favoreciendo la unión de los pili a sus receptores.

Adhesinas

Aparentemente, existe una gran correlación entre la colonización de diversas regiones anatómicas por parte de *P. aeruginosa* y la capacidad de esta especie para adherirse a un sinnúmero de células (101).

Este microorganismo produce al menos dos tipos de adhesinas: los pili o fimbrias y otros componentes adhesivos de superficie (adhesinas no piliares). En cuanto a los primeros, se ha observado que son similares a los de *N. gonorrhoeae* y *V. cholerae* (de tipo 4) y podrían ser los principales responsables de la adherencia bacteriana al epitelio respiratorio, así como a otras mucosas, incluida la bucal. Evidentemente, aquellas estructuras proteicas requieren de la presencia de receptores en los tejidos "blanco" y, en este sentido, se ha observado que los más importantes son los que se encuentran recubiertos por ácido siálico (neuramínico), como sucede a los gangliósidos tipo GM1; *P. aeruginosa* sintetiza una neuraminidasa que favorece la unión a tales gangliósidos al eliminar los residuos de ácido siálico, lo que permite una mayor interacción de los pili.. La síntesis de neuraminidasa por parte de la bacteria es regulada por la osmolaridad presente en

el medio y se encuentra codificada en algunos de los genes asociados a la producción del alginato (12, 35, 77, 82, 90, 108).

Cabe señalar que los receptores específicos para los pili de *P. aeruginosa* resultan más numerosos en pacientes que padecen infección pulmonar crónica, tal como ocurre en el caso de la fibrosis quística, en la cual se comprueba una clara predisposición hacia la colonización por esta especie (89, 100).

En cuanto a la patogénesis involucrada en las afecciones asociadas a la diseminación, al parecer es determinante la adherencia de la bacteria al endotelio a través de fimbrias. A continuación ocurre la invasión y, posteriormente, la destrucción de los vasos sanguíneos, misma que se traduce en necrosis tisular (76).

Lógicamente otra demostración objetiva de que los pili de *P. aeruginosa* son organelos de adhesión, se basa en el hecho de que los anticuerpos (Ac's) dirigidos contra dichas estructuras impiden la adherencia (82).

Capa limosa o mucoide

Bajo ciertas condiciones, *P. aeruginosa* acumula extracelularmente una gran concentración de polisacáridos que dan lugar a una cubierta denominada alginato, capa limosa o glicocálix. Ésta se encuentra constituida por los ácidos manurónico y galurónico cuya polimerización confiere una gran viscosidad a la estructura, que protege a la bacteria de varios mecanismos de defensa del hospedador, incluyendo los asociados a los macrófagos, Ac's y al sistema del complemento (C') (2).

Es importante subrayar que las cepas aisladas a partir de pacientes con fibrosis quística son fenotípicamente distintas a las restantes y una de sus principales diferencias radica en que son extremadamente mucoides dada la gran cantidad de alginato que producen; este último funciona como una adhesina de alta afinidad en relación con el epitelio traqueobronquial (30, 82, 90).

Algunos experimentos han comprobado la inhibición de la adherencia en cepas mucoides, tanto a través de Ac's monoclonales anti-alginato, como a través de la acción de una alginasa; dicho fenómeno no ocurre en cepas no mucoides. Adicionalmente, se ha observado que los antibióticos efectivos contra *P.*

aeruginosa provocan una clara disminución en la adherencia del microorganismo independientemente de que también se ha demostrado que tiene lugar el sinergismo entre combinaciones de Ac's monoclonales y antibióticos tales como la ciprofloxacina y entre esta última y la alginasa (56).

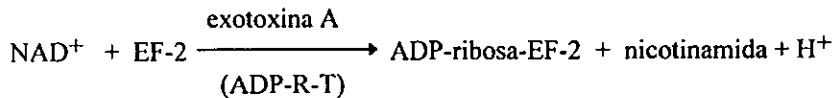
Finalmente, otro motivo de que el exopolisacárido mucoide de *P. aeruginosa* sea considerado como un factor incuestionablemente patogénico, reside en sus propiedades antifagocitarias y en que representa una gran barrera que opone resistencia a la difusión de los antibióticos hacia el citoplasma de la bacteria (4, 17, 84, 90).

Exotoxina A

La exotoxina A (ETA) representa otro de los principales factores de virulencia detectados en *P. aeruginosa*, tal como lo demuestra el hecho de que es producida aproximadamente por el 90 % de las cepas aisladas de casos clínicos; funciona como un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en células de diversos mamíferos, mediante un mecanismo idéntico al que se ha observado en la toxina diftérica; además, se considera 10,000 veces más virulenta que el LPS, de acuerdo

con lo observado en animales de experimentación: actúa como una ADP-ribosil-transferasa (ADP-R-T), inactivando al factor de elongación 2 (EF-2) y, de esta manera, impide la extensión de la cadena polipeptídica en formación. La catálisis de esta reacción reditúa la formación de nicotinamida libre más un complejo inactivo ADP-ribosa-EF-2, incapaz de participar en la síntesis proteica, lo que, por ende, conduce a la muerte de las células “blanco” (13, 105, 110).

La reacción en la que participa la ETA es la siguiente:



El NAD^+ actúa como donador de ADP-ribosa.

Si bien los pesos moleculares y las actividades enzimáticas de la ETA y la toxina diftérica son similares, sus respectivas estructuras y tejidos “blanco” son plenamente diferentes; sus secuencias de aminoácidos sólo son semejantes en los segmentos que se unen al NAD^+ y provocan las reacciones de ADP-ribosilación; además, no ocurre reacción cruzada entre ambas toxinas y el receptor de la ETA

en las células “blanco” es una glicoproteína de 300 KDa, distinta a la que se relaciona con la toxina diftérica. Por otra parte, el órgano “blanco” de la ETA es el hígado, en tanto que la toxina diftérica afecta principalmente al corazón y al sistema nervioso periférico y, finalmente, la primera presenta una estructura primaria de 638 aminoácidos, pero su región activa incide en un polipéptido de cadena única que consta de 613 residuos de aminoácidos divididos en dos dominios funcionales (43, 90).

Figura 1. Estructura activa de la exotoxina A.

Parte activa, responsable de la ADP-ribosilación del EF-2	Responsable de la unión a la membrana de las células del hospedador
A	B

Según Freeman, en ratones inoculados por vía intravenosa, la DL₅₀ de la ETA purificada es de sólo 60 a 80 ng; cuando ésta se administra intradérmicamente provoca dermonecrosis y edema y, por vía intraperitoneal, 5 a 10 DL₅₀ originan

leucopenia y muerte; la autopsia correspondiente revela tanto necrosis en el hígado, como edema y hemorragia en pulmones y riñones (8).

Las infecciones corneales experimentales provocadas con cepas toxigénicas de *P. aeruginosa*, resultan notablemente más severas que las asociadas a cepas no toxigénicas, e inclusive, algunos autores aseguran que la ETA es indispensable en la patogénesis relacionada con la invasión y destrucción de la córnea de ratón (110).

Otros estudios sobre esta toxina han revelado que altera la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en leucocitos humanos y de la interleucina 1 (IL-1) en macrófagos de ratones. Ambos fenómenos son considerados entre los mediadores principales de la cascada de eventos fisiopatológicos que ocurren durante la septicemia (11, 36).

Finalmente, también se ha observado que los pacientes en cuyos sueros se detectan elevados niveles de Ac's séricos anti-ETA tienen una mayor sobrevida a las septicemias. Todos los hallazgos mencionados confirman la letalidad de dicha exotoxina (79).

Exoenzima S

La exoenzima S (ExoS) de *P. aeruginosa* es sintetizada por más del 40 % de las cepas aisladas a partir de casos clínicos. Su actividad enzimática es similar a la de la ETA, en el sentido que cataliza la transferencia de ADP-ribosa del NAD⁺; sin embargo, también existen algunas diferencias importantes: el “blanco” de la ExoS no es el EF-2, sino más bien varias proteínas presentes en las células eucariotes, incluidas la vimentina (componente estructural de las células), el fluido pleural y varias moléculas de bajo peso molecular; por otro lado, sus propiedades físicas y bioquímicas son distintas y antigénicamente no dan reacción cruzada (26, 46, 47, 51, 69, 87).

Aparentemente, el papel de la ExoS resulta fundamental para la colonización y diseminación del microorganismo en los pacientes quemados; así lo demuestra el hecho de que, en modelos experimentales de ratones quemados, la DL₅₀ es de 30 bacterias, pero esta cifra se incrementa hasta 10⁵ en cepas no productoras de esta enzima.

Cabe señalar que se han detectado dos formas diferentes de la ExoS: una de 53-KDa, enzimáticamente inactiva y otra de 49-KDa, que corresponde a la forma activa; ya que los Ac's anti-49-KDa neutralizan la actividad de ADP-ribosiltransferasa no se descarta la posibilidad de que esta última forma sea el resultado de eliminar un segmento de 4-KDa del carboxiterminal a partir de la proteína inactiva, aunque también se sugiere que la ExoS pueda ser la porción A de una toxina; sin embargo, aún no existen evidencias de que se introduzca en las células del hospedador ni se ha encontrado a la porción B en la que residiría la unión a la membrana de las células "blanco"; además, como ocurre con la toxina del cólera, su actividad enzimática parece relacionarse con la participación de un grupo de proteínas de las células del hospedador, denominadas FAS (Factor Activating ExoS) en este caso (51, 87,90).

Finalmente, otros estudios sugieren que la ExoS funge como un importante mediador de la respuesta inmune del hospedador, ya que induce la proliferación de linfocitos T que confieren protección en los procesos patológicos (60).

Proteasas

P. aeruginosa in vivo produce varias enzimas proteolíticas extracelulares; en este sentido, destacan dos que hidrolizan elastina, conocidas como proteasas *LasA* y *LasB*, la última de las cuales también se conoce como elastasa, es dependiente de zinc y también puede degradar la colágena presente en mucosas, pulmones, vasos sanguíneos y dermis.

Como se recordará, la elastina es una proteína que se encuentra en los pulmones, en donde constituye alrededor del 30 % del contenido proteico total, pero su proporción es bastante mayor en las paredes internas de los vasos sanguíneos, ya que en ambos casos se trata de tejidos que se dilatan y se contraen. En tal contexto, *LasA* y *LasB* originan conjuntamente serias lesiones en las regiones anatómicas mencionadas, aunque ello no ocurre en ausencia de alguna de ambas: la actividad elastolítica de *LasB* purificada disminuye notablemente, lo que sugiere como obligatoria la coparticipación de *LasA*; al parecer, ésta se uniría a la elastina -aunque sin degradarla- y favorecería la acción de *LasB*.

Ambas enzimas son inmunógenas: sólo causan daño directo en los pulmones de pacientes con fibrosis quística durante las fases iniciales de la infección, pero ello no ocurre en las infecciones crónicas debido a la mayor concentración de anticuerpos anti-*LasA/LasB* que neutralizan su actividad elastolítica; sin embargo, los altos niveles de Ac's también resultan altamente lesivos: pueden formar complejos inmunes que se depositan en los pulmones y, al activarse el C', el daño ocurre sobre los tejidos neumónicos; además, atraen a los leucocitos polimorfonucleares (PMN), los cuales sintetizan una elastasa cuya actividad elastolítica se suma a la de *LasA* y *LasB*.

Otras funciones de las enzimas elastolíticas de *P. aeruginosa* son las siguientes: facilitan el establecimiento de la infección, ya que inactivan algunos factores del C' y también llegan a impedir la unión de las inmunoglobulinas al microorganismo; llevan a cabo la hidrólisis de la elastina presente en las paredes de los vasos sanguíneos, ocasionando grandes hemorragias que podrían resultar fatales (90, 98).

Otra enzima con actividad proteolítica es la proteasa alcalina; ésta manifiesta una eficaz actividad necrosante sobre piel, pulmones y córnea y, conjuntamente con

LasA y *LasB*, destruye las conexiones existentes entre las células de los tejidos, incluidos los proteoglicanos de la córnea y muchas otras estructuras de sostén constituidas por fibrina y elastina (45).

Un estudio sobre fibrosis quística, estableció que el 83 al 88 % de los pacientes presentaba Ac's específicos contra *LasA/LasB* y /o la proteasa alcalina, lo que demuestra la producción *in vivo* de dichas enzimas proteolíticas (21).

Hemolisinas

P. aeruginosa produce dos hemolisinas: una proteína termolábil -denominada fosfolipasa C- y un glucolípido termoestable; aparentemente, ambas podrían actuar en forma sinérgica para degradar fosfolípidos (cuya concentración es mayor en las membranas celulares) lo que contribuiría a la destrucción de las células eucariotes y a la invasión tisular, ocasionando necrosis.

Adicionalmente, se ha comprobado que la fosfolipasa C desempeña otros papeles trascendentales en la patogenia de las neumonías causadas por *P. aeruginosa*:

degrada algunos componentes del revestimiento de los pulmones provocando atelectasia (falta de expansión pulmonar) y necrosis (42, 43).

Citotoxina

Corresponde a una proteína de 25,000 Da, a la cual originalmente se conocía como leucocidina, debido a sus comprobados efectos citopáticos sobre los leucocitos PMN; aunque aún se desconocen los detalles asociados a su(s) mecanismo(s) de acción, también se ha establecido alguna responsabilidad en la denominada lesión microvascular pulmonar (6, 93).

Pigmentos

La piocianina, una fenazina, es una de las sustancias que sólo se han detectado en *P. aeruginosa*, lo cual permite sospechar la presencia del microorganismo en aquellos tejidos afectados que adquieren su característica coloración azul-verdosa. Cabe señalar que su concentración en el esputo de pacientes con padecimientos pulmonares asciende hasta 10^{-4} M, niveles a los cuales causa destrucción del epitelio traqueobronquial y disminuye la frecuencia

del movimiento ciliar de las vías respiratorias; bajo tales condiciones, se promueve la acumulación de moco en el tracto respiratorio, circunstancia que resulta fatal en los individuos que presentan cuadros bronco-neumónicos (44).

El mecanismo a través del cual la piocianina provoca lesiones al epitelio traqueobronquial, incluye la conversión de oxígeno (O_2) en iones superóxido (O_2^-) y peróxido (O_2^{2-}), que resultan ampliamente tóxicos para las células del hospedador, principalmente cuando se trata de tejidos que presentan elevadas presiones de oxígeno (90).

Por su parte, la pioverdina (fluoresceína) también es producida por otras especies del género y su patogenicidad radica en su actividad como sideróforo, que atrapa y acumula hierro requerido por los leucocitos y, en general, por todas las células humanas; además, una vez captado el hierro, promueve el aumento de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria, lo que permite el paso del metal hacia el interior de la célula bacteriana. En este sentido, es oportuno señalar que el hierro es indispensable para la síntesis bacteriana de la ETA y de los citocromos.

Finalmente, la pioquelina también actúa como un sideróforo que acumula y solubiliza el hierro para transportarlo a través de la membrana, hacia el citoplasma bacteriano; a este respecto, es importante considerar que *P. aeruginosa* puede utilizar otros agentes quelantes para el transporte de hierro, tales como el ácido salicílico, citrato, ácido nitrilotriacético e inositolpolifosfato (58, 90, 109).

III. ENTIDADES CLÍNICAS ASOCIADAS a *P. aeruginosa*

Fibrosis quística

Como es bien sabido, la fibrosis quística es una enfermedad hereditaria autosómica recesiva que se caracteriza por la dilatación de las glándulas de la submucosa lo que promueve la liberación de grandes cantidades de moco hacia el lumen respiratorio. El mecanismo incluye una alteración en el transporte de los iones Cl^- a través de la membrana de las células epiteliales del pulmón, lo que también sucede en otros órganos tales como el páncreas, glándulas sudoríparas e intestino. En condiciones de salud, el transporte de dicho anión ocurre a través de canales que se abren en la membrana como respuesta al incremento en los niveles del AMPc; asimismo, dichos niveles activan a la proteincinasa dependiente del AMPc que también contribuye para que se efectúe la entrada de los iones Cl^- y/o de algunas proteínas reguladoras, mediante la fosforilación del propio canal. También, se ha observado que el gen que codifica la fibrosis quística, también

contiene información para sintetizar una glucoproteína de membrana, denominada “regulador de la conductancia transmembranal en la fibrosis quística (CFTR)”, que está íntimamente relacionada con el transporte de los iones Cl⁻; cuando ocurre alguna mutación en dicho gen, aumentan los niveles de la CFTR y ello altera el transporte electrolítico, originando cambios en las células epiteliales; este proceso, a nivel pulmonar, se traduce en una obstrucción progresiva de las vías aéreas (18, 32, 62, 63, 85).

Sin lugar a dudas, el problema clínico más serio asociado a la fibrosis quística consiste en la infección broncopulmonar causada por algunos microorganismos patógenos, entre los cuales destacan *Pseudomonas aeruginosa* (60 %), *Staphylococcus aureus* (29 %) y, *Haemophilus influenza* (10 %); sin embargo, durante la antibioticoterapia, cualquiera de los dos últimos desaparece, lo que no sucede con el primero.

Cabe señalar que, al colonizar el tracto respiratorio inferior de un paciente con fibrosis quística, *P. aeruginosa* sufre un cambio fenotípico por algún mecanismo aún no bien establecido, dando como resultado que las cepas se manifiesten muy mucoides. De esta manera, al combinarse con el moco elaborado en los pulmones,

la capa mucoide promueve la rápida obstrucción del tracto respiratorio que frecuentemente resulta fatal. Por otro lado, la capa mucoide también impide, tanto la libre difusión de los antibióticos hacia el citoplasma microbiano, como la fagocitosis por macrófagos y neutrófilos; sin embargo, ambas clases de células permanecen activas, liberando sustancias oxidantes y enzimas proteolíticas que incrementan la gravedad de las lesiones del epitelio bronquial. Adicionalmente, el microorganismo sintetiza y libera toxinas que deterioran progresivamente el tejido del hospedaor (7, 9, 17, 30, 107).

En pacientes neutropénicos, las cepas de *P. aeruginosa* que se establecen durante períodos prolongados en el tracto respiratorio, llegan a invadir y lesionar otros tejidos, incluido el conducto gastrointestinal; esto resulta muy importante, debido a que esta especie adquiere rápidamente resistencia a los antibióticos administrados, lo que contribuye a que el enfermo quede como portador de ella y funja como fuente de contagio para otros pacientes con fibrosis quística y otros que se encuentran inmunocomprometidos (22, 64, 97).

Durante la fibrosis quística, las manifestaciones clínicas de los cuadros pulmonares ocasionados por *P. aeruginosa* pueden variar ampliamente,

dependiendo de la gravedad de la enfermedad. Inicialmente, se pueden evidenciar afecciones del tracto respiratorio superior, con tos persistente; sin embargo, algunos pacientes experimentan episodios recurrentes de neumonía sin tos y otros desarrollan una tos crónica progresiva, anorexia y pérdida de peso. Los signos físicos incluyen evidencias de desnutrición, fiebre moderada, aumento en el diámetro torácico, cianosis y sibilancias inspiratorias y expiratorias; los estudios sanguíneos indican leucocitosis así como grados variables de hipoxemia y las pruebas de función pulmonar revelan defectos obstructivos -que también se aprecian en las radiografías-, además de que ocurre atelectasia, debido al taponamiento mucoso de las vías aéreas, a la extensa infiltración peribronquial con bronquiectasia generalizada y a la formación de quistes.

El evolutivo proceso patológico pulmonar conduce a insuficiencia respiratoria y la hipoxia resultante se asocia a una dinámica cardiorrespiratoria alterada; por tales motivos, los índices de mortalidad son superiores al 90 % y la mayoría de los pacientes pediátricos con fibrosis quística no viven más allá de los tres a cinco años de edad (9, 22, 63, 97).

Neumonía

Las enfermedades del tracto respiratorio inferior ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*, se presentan casi exclusivamente en personas con compromiso respiratorio local o con defensas sistémicas deficientes. Las neumonías causadas por este microorganismo y otros bacilos Gram negativos se pueden originar de tres maneras:

1. La aspiración del microorganismo desde la faringe previamente colonizada; ésta es la forma más común.
2. Por vía hematógena, a partir de un lugar lejano infectado; por ejemplo, del tracto urinario o de tejidos quemados; esto ocurre comúnmente en procesos debidos a *E. coli* o *P. aeruginosa*.
3. Por nebulización del conducto traqueobronquial con aspersores contaminados.

La colonización de la faringe por bacilos Gram negativos sólo ocurre en el 10 % de las personas sanas y, en tales casos, usualmente se involucra a pequeños números de microorganismos; sin embargo, dicha frecuencia de colonización se

incrementa en diabéticos y alcohólicos (en quienes las cifras aproximadas son de un 35 %), así como en los pacientes hospitalizados en unidades de terapia intensiva. Algunos factores que se asocian al fenómeno son el uso de equipos de inhalación e intubación contaminados y la administración de agentes antimicrobianos; además, las enfermedades pulmonares obstructivas, el humo del tabaco, la acidosis, el empleo de agentes inmunosupresores y la edad, también contribuyen a la colonización por estos microorganismos debido a que afectan el movimiento mucociliar y la actividad de los macrófagos alveolares.

Los síntomas y signos de las neumonías causadas por *P. aeruginosa*, también incluyen fiebre elevada, escalofríos, tos, expectoración con o sin sangre, cianosis, disnea y dolor torácico; sin embargo, al parecer este es el único agente etiológico asociado a manchas en la periferia de los pulmones, las cuales son detectables por rayos X. Por otro lado, los derrames pleurales son comunes y pequeños y se observan la formación de microabscesos, necrosis alveolar y hemorragias locales; otras características frecuentes son leucocitosis, presión arterial disminuida y destrucción del parénquima, mediada por las toxinas bacterianas o por las células inflamatorias del hospedador (3, 24, 31,37, 39, 52).

Desafortunadamente, los pacientes neutropénicos con recuentos de granulocitos menores de $500/\text{mm}^3$ se encuentran entre los que presentan mayores tasas de mortalidad por neumonía y otras infecciones causadas por *P. aeruginosa*.

Infecciones oculares

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno frecuente y generalmente devastador para el ojo humano, siendo una de las causas más comunes de las úlceras y/o queratitis de la córnea. La afectación del tejido ocular puede originarse de varias formas: a través de traumatismos que se traduzcan en lesiones penetrantes, cirugía intraocular, empleo de lentes de contacto contaminados -a partir de la solución limpiadora que los contiene-, o por diseminación hematógena a partir de otros sitios primarios de infección. Desafortunadamente, el proceso infectivo cursa con rapidez, pudiendo originar daños permanentes o la pérdida total de la vista; ello se debe a que este microorganismo sintetiza enzimas extracelulares capaces de destruir todo el globo ocular y a que es muy resistente a la mayoría de los antimicrobianos utilizados en el tratamiento. Adicionalmente, la córnea y el humor vítreo constituyen un medio relativamente aislado y avascular por lo que,

en su estado normal, se encuentra “desprovisto” de elementos inmunes humorales y celulares (26).

La unión inicial de *Pseudomonas aeruginosa* al epitelio ocular parece estar mediada por las adhesinas bacterianas y receptores específicos de ácido siálico conocidos como gangliósidos GM₁, análogos a los que se localizan en el epitelio traqueobronquial; no obstante, también se ha observado que existen otros receptores fosfolipídicos denominados fosfatidilserina y fosfatidilinositol (35, 73).

Cuando el microorganismo se establece en el ojo, rápidamente sintetiza sus enzimas extracelulares; a este respecto, es preciso considerar que la proteasa alcalina es la responsable de la opacificación y ulceración de la córnea, mientras que la actividad elastolítica de *LasA/LasB* promueve la invasión de todo el tejido. Por su parte, la exotoxina A produce muerte de las células del epitelio, endotelio y estroma, lo que da lugar a una necrosis tisular (72).

Por otro lado, la queratitis por *Pseudomonas aeruginosa* se asocia con el uso de lentes de contacto y albercas contaminadas. El curso de la queratitis progresa con rapidez en 8 a 24 h, aunque en algunos casos, existen evidencias de hasta 48 h;

sus signos clínicos más comunes incluyen a un infiltrado estromal grisáceo y necrótico, edema epitelial circundante y a una abundante secreción mucopurulenta fuertemente adherida a la superficie ulcerada; además, son frecuentes el dolor, hiperemia, quemosis conjuntival, menor agudeza visual y, finalmente, una panoftalmitis que involucra a toda la córnea, cuadro del que se puede obtener alguna perforación (81).

Endocarditis

Pseudomonas aeruginosa causa endocarditis infecciosa, afectando principalmente a las válvulas mitral y tricúspide de los drogadictos intravenosos; actualmente, la incidencia del microorganismo en esta entidad clínica ha aumentado hasta el 60 %, sin embargo, dependiendo de la zona geográfica y de las condiciones climatológicas, esta cifra se puede abatir, dada la importancia de *Staphylococcus aureus* y los estreptococos del grupo *Viridans*. Un hallazgo interesante reside en el hecho de que en todos los casos aislados de endocarditis por *Pseudomonas*, la cepa implicada pertenece al serotipo O:11; en este sentido, se considera que dicho serotipo sobrevive sin dificultad alguna en presencia de las drogas intravenosas más utilizadas (pentazocina y tripelenamina) (83).

En cuanto a la patogenia implicada, el microorganismo se establece en el endocardio, por invasión directa desde la sangre, al parecer, promovido por traumatismos o lesiones previas en la válvula tricúspide; de hecho, esto explica la frecuencia tan elevada con la que se ve involucrada la mencionada válvula cardíaca, generándose cuadros típicos de endocarditis subaguda, los cuales difieren de los que afectan a la válvula mitral, que por lo general cursan en forma aguda y son más fulminantes. Los signos y síntomas incluyen fiebre elevada y soplo cardíaco, acompañados por embolias pulmonares sépticas con tos, gran cantidad de esputo, infiltrados pulmonares, así como dolor y derrames pleurales. Cabe señalar que la endocarditis izquierda puede presentarse con insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma arterial y grandes embolias arteriales sistémicas (43, 94).

Septicemia

Pseudomonas aeruginosa representa la tercera causa más común de septicemia adquirida dentro de los hospitales, ya que su frecuencia sólo es rebasada por *E. coli* y *K. pneumoniae* (67).

Entre los principales factores predisponentes de esta entidad se cuenta a las neoplasias hematológicas, neutropenia, deficiencia de inmunoglobulinas, *diabetes mellitus*, quemaduras severas, cáncer y transplantes de órganos, aunque otros factores son las guías intravenosas, instrumentación urinaria, cirugía y traumatismos graves. Evidentemente, el hecho de que esta especie se asocie a una mayor mortalidad en pacientes en quienes ocasiona padecimientos “poco” severos, subraya su peligrosidad y su gran potencial patogénico dentro del torrente circulatorio (25, 27, 57, 99).

Clínicamente, la septicemia causada por *Pseudomonas* es indiferenciable a las producidas por otros microorganismos; los signos y síntomas pueden variar, aunque son muy frecuentes la fiebre elevada, postración, dolor muscular generalizado e insuficiencia renal, pudiendo presentarse la ictericia, más a menudo que en otras formas de sepsis por Gram negativos y, desde luego, el clásico choque séptico. La tasa de mortalidad en pacientes con septicemia por *Pseudomonas* es muy elevada, pudiendo ascender hasta un 80 % cuando se trata de personas inmunocomprometidas.

Meningitis

Pseudomonas aeruginosa causa alrededor del 12 % de los casos de meningitis debidos a bacilos Gram negativos y puede llegar hasta el LCR por alguna de las siguientes vías:

1. Desplazamiento a partir de alguna estructura contigua como el oído, el antro mastoideo o los senos paranasales.
2. Inoculación directa por medio de traumatismos cefálicos o previa cirugía.
3. Diseminación hematógica a partir de otros sitios infectados: vías urinarias, pulmones, endocardio, etc..

Las manifestaciones clínicas de esta entidad, independientemente del agente etiológico, incluyen fiebre elevada, cefaleas, vómito, postración, confusión y rigidez de la nuca; el inicio de la enfermedad suele ser agudo o incluso fulminante, en particular cuando se asocia a septicemias, ya que se producen choques sépticos y coma y, por lo general, es común que ocurra una muerte temprana (28).

Osteomielitis

Las infecciones en huesos y articulaciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, suceden como resultado de la diseminación hematógena del microorganismo a partir de otros focos metastásicos o de su propagación desde tejidos contiguos. La vía sanguínea es muy común en drogadictos intravenosos y en personas con infecciones urinarias o pelvianas; por otro lado, las infecciones contiguas generalmente se relacionan con traumatismos penetrantes, cirugía y la previa colonización de tejidos blandos subyacentes. Cabe mencionar que la bacteria parece tener una particular predilección por las articulaciones fibrocartilaginosas.

Las afecciones de huesos y articulaciones por *Pseudomonas* son más persistentes que las causadas por *Staphylococcus aureus*, aunque tienden a ser menos destructivas. Sin embargo, la osteomielitis estafilocócica se asocia a mayor cantidad de abscesos, extensión extraósea menos frecuente y cambios radiológicos más leves.

En los pacientes con *diabetes mellitus*, se ha observado que la osteomielitis se acompaña por insuficiencia vascular de las extremidades inferiores; por su parte, en los individuos con enfermedad reumatoidea subyacente, es común la invasión del líquido sinovial; por lo regular, los huesos largos adquieren el problema después de fracturas expuestas y/o procedimientos de fijación de huesos (67).

La duración de los signos y síntomas de la osteomielitis por *Pseudomonas* es muy variable, ya que el lapso se extiende de semanas a meses, durante los cuales destacan el dolor y la sensibilidad local, ya que la fiebre y otros síntomas sistémicos son menos consistentes (70).

Infecciones urinarias

Las infecciones urinarias ocasionadas por *P. aeruginosa* se limitan generalmente a ancianos y personas hospitalizadas, influyendo factores tales como el sondeo de la vejiga, la instrumentación o cirugía en el tracto urinario y los trasplantes renales.

Si bien se ha observado que *P. aeruginosa* es el más adherente de los patógenos urinarios comunes, la frecuencia de este microorganismo es superada por *E. coli*, *K. pneumoniae* y los enterococos. Las manifestaciones clínicas involucradas son indiferenciables de las provocadas por otros microorganismos, aunque *P. aeruginosa* suele invadir los vasos sanguíneos pequeños y medianos de los riñones, especialmente cuando se trata de pacientes septicémicos, a quienes origina múltiples infartos renales. La pielonefritis es una complicación de los procesos ascendentes, aunque también puede ser resultado de la diseminación hematógena del microorganismo. Desafortunadamente, las vías urinarias representan una fuente importante de diseminación microbiana que termina afectando a otras partes del organismo humano (43).

Infecciones en piel y tejidos blandos

Las infecciones primarias de la piel y tejidos blandos por *Pseudomonas aeruginosa*, pueden ser localizadas o difusas y entre los factores predisponentes figuran las lesiones en la piel debidas a quemaduras, traumatismos, dermatitis, etc., si bien la humedad también juega un papel muy importante. Las zonas anatómicas afectadas con mayor regularidad son: el área perineal, debajo de los pañales de los niños, pies, oídos y la piel de personas que se aplican el hidromasaje.

Cabe señalar que la previa septicemia, también puede derivar en afecciones de la piel y mucosas, generando lesiones cutáneas distintivas denominadas “ectima gangrenoso”. Los aspectos clínicos más importantes de esta entidad incluyen hemorragias, eritema circundante, nódulos subcutáneos o abscesos profundos, celulitis, lesiones vesiculares o pustulares, necrosis y la demostración histológica de invasión vascular por bacterias.

P. aeruginosa se localiza con escasa frecuencia en el oído normal, formando parte de la flora habitual; sin embargo, a menudo llega a colonizar el conducto

auditivo externo, como consecuencia de lesiones diversas, maceración, inflamación o permanencia de condiciones húmedas. De hecho, se trata del agente causal de la otitis externa “maligna”, también conocida “oído del nadador”, ya que este cuadro predomina entre quienes practican la natación en albercas contaminadas; sus síntomas más comunes son el dolor o prurito en el oído (otalgia) con secreción, un conducto edematoso con detritus (otorrea) y aumento del dolor por tracción del lóbulo.

La inmersión en albercas o bañeras insuficientemente limpias también se asocia a la foliculitis cutánea por *P. aeruginosa*. El período de incubación de dicha enfermedad varía notablemente de 7 horas hasta 5 días y sus síntomas incluyen prurito, pústulas vesiculares y malestar generalizado; afortunadamente se trata de una afección autolimitante.

Por otra parte, es conveniente destacar que *Pseudomonas aeruginosa* es una de las dos causas más comunes de infecciones en pacientes con quemaduras graves; la sepsis subsiguiente puede resultar fatal y es el resultado de la previa colonización de los tejidos quemados, favorecida por la destrucción de las barreras primarias y/o por múltiples defectos inmunológicos sistémicos. Si bien en los sitios

quemados pueden predominar otro tipo de microorganismos Gram negativos, durante el inmediato período postquemadura aquellos son reemplazados por *P. aeruginosa*, debido a que ésta prolifera rápidamente llegando a densidades de más de 10^5 bacterias por gramo de tejido. En general, cuando esta especie invade el tejido subcutáneo no quemado, se disemina a lo largo de los tabiques fibrosos hasta los tejidos perivasculares y linfáticos; de esa forma invade los vasos sanguíneos y provoca las septicemias.

Entre los signos clínicos de las quemaduras infectadas por *Pseudomonas*, figuran una coloración negra, marrón oscura o violácea de las escaras, de las quemaduras; degeneración del tejido con separación de las escaras, hemorragia hacia el tejido subcutáneo, edema y/o necrosis de las zonas adyacentes. Las manifestaciones sistémicas que anteceden a la septicemia incluyen fiebre elevada, hipotensión, desorientación, oliguria y leucopenia; por otro lado, es importante señalar que las infecciones metastásicas pueden originar lesiones de ectima en sitios alejados de la quemadura y que en los pacientes inmunocomprometidos la tasa de mortalidad llega a superar el 80 % (43, 86).

Empleando modelos experimentales con ratones quemados, se han logrado establecer diversos datos: al inocular *P. aeruginosa* por vía subcutánea en la zona quemada, se observaron infecciones sistémicas que condujeron a la muerte de los animales por choque séptico; la DL₅₀ para este modelo es aproximadamente de 30 bacterias; cifra que difiere de la detectada en zonas de piel no quemada en las que dicha DL₅₀ llega a ser de 10⁸ bacterias. Sin lugar a dudas, este tipo de hallazgos demuestran el gran riesgo que rodea a las personas que sufren de quemaduras graves (90).

Otra entidad clínica de tejidos superficiales es el síndrome de la uña verde, que se caracteriza por la aparición de una coloración verdosa en la placa ungueal con paroniquia por *P.aeruginosa*; evidentemente, la coloración verdosa suele ser resultado de la difusión de pirocianina a través de la zona infectada (1, 67).

Finalmente, cabe mencionar los reportes de algunos casos de sinusitis causadas por *P. aeruginosa*, los cuales se asocian a factores predisponentes tales como la intubación nasal, trauma local, neutropenia, fracturas nasal y/o craneal, y el empleo de corticoesteroides (71).

IV. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Dado que *P. aeruginosa* es un agente etiológico de numerosas enfermedades que involucran diversos tejidos, las muestras a analizar incluyen secreciones, exudados, sangre, orina, LCR, fragmentos de uñas, médula ósea, expectoraciones o aspirados transtraqueales, líquido sinovial, etc.

Una vez obtenidos los especímenes, estos se someten a metodologías microbiológicas tradicionales destinadas a aislar e identificar las colonias, o bien, se emplean técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (19, 29, 43, 95, 104).

En el primer caso, los medios utilizados con mayor frecuencia son la gelosa sangre y los agares MacConkey y EMB, sin soslayar la posibilidad de que las siembras también se realicen en agar cetrimida, en virtud de que en este se produce la piocianina con mayor eficacia.

Una vez incubadas las placas, se proceden a diferenciar macroscópicamente las colonias sospechosas -se trate de aislamientos mucoides o no mucoides- y se realizan las pruebas bioquímicas tradicionales, incluyendo a los medios Kligler, Citrato de Simmons, SIM, caldo manitol rojo de fenol y caldo sacarosa-urea (8, 29, 43, 66).

Las lecturas se efectúan 24h más tarde, previa incubación a 35°C durante 24h -en condiciones aerobias-, considerando los resultados contenidos en la tabla 2 (pág. 15).

Evidentemente, la facilidad y rapidez con las que *P. aeruginosa* desarrolla *in vitro*, representan las principales razones de que no se hayan diseñado muchas otras técnicas para lograr la pronta y confiable detección del microorganismo, tanto en las muestras clínicas como en los ambientes intrahospitalarios, incluidos los quirófanos, las superficies de los mobiliarios y las soluciones desinfectantes (en las que suelen desarrollar).

Cabe señalar que los pigmentos producidos por el microorganismo ayudan a establecer un diagnóstico directo y temprano; por ejemplo, el examen de una

región quemada, utilizando una lámpara de Wood, puede evidenciar la fluorescencia asociada a la pioverdina, antes que el proceso patológico resulte clínicamente evidente (8, 29, 66).

Por otra parte, el diagnóstico de laboratorio basado en la técnica de PCR, considera la amplificación de dos genes de *P. aeruginosa* que codifican la síntesis de lipoproteínas de membrana externa: *oprI* y *oprL*.

El *oprI* se encuentra presente en toda la familia *Pseudomonadaceae* y en algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*; sin embargo, el *oprL* es exclusivo de *P. aeruginosa*, por lo que su detección aporta una mayor especificidad. El método es tan sensible que alcanza a detectar hasta 2 UFC en la muestra, sobre todo cuando se trata de expectoraciones y/o biopsias de piel (19).

Sin lugar a dudas, el reciente desarrollo de la “reacción en cadena de la polimerasa (PCR)” ha venido a enriquecer la práctica diagnóstica molecular de las enfermedades infecciosas en los laboratorios de todo el mundo: una vez recolectada y preparada la muestra, ocurre en su seno la rápida multiplicación (amplificación) del DNA perteneciente al agente causal, y los millones de copias

obtenidas incrementan notablemente la sensibilidad de cualquier técnica que se elija -a continuación- para lograr la detección correspondiente.

En resumen, la PCR es una reacción bioquímica, catalizada por una enzima, en la cual pequeñas cantidades de cualquier segmento “blanco” del DNA se multiplican logarítmicamente (19, 104).

Cabe señalar que la PCR no constituye por sí mismo un método diagnóstico: en una muestra clínica, el proceso global asociado a la detección del agente causal, con base en el reconocimiento de su DNA, consta de tres pasos:

- (A) Procesamiento de la muestra
- (B) Amplificación del DNA por PCR
- (C) Identificación del DNA amplificado

Evidentemente, la exactitud y precisión del diagnóstico molecular se fundamentan en dos factores generales: 1) la gran consistencia de la secuencia nucleotídica en los segmentos “blanco” de DNA; 2) la posibilidad de establecer en forma rápida, confiable y, actualmente, con mayor sensibilidad, la procedencia de los ácidos

nucleicos (ya que estos presentan segmentos específicos para cada género, especie, tipo y cepa microbianos) (68, 78).

La PCR es relativamente fácil de llevar al cabo, ya que sólo requiere de un tubo de reacción, de algunos reactivos y de una fuente estable de calor. Adicionalmente, el DNA que se desea copiar puede encontrarse puro o constituir una pequeña porción de una mezcla compleja de materiales biológicos.

Una vez efectuada la amplificación, la procedencia del DNA “blanco” se puede establecer mediante diferentes métodos, que comprenden desde una simple electroforesis en gel de agarosa, hasta diversos ensayos inmunogenéticos que incluyen el empleo de sondas marcadas. No obstante, dada su generalizada aceptación para reconocer o confirmar al producto amplificado, la técnica más utilizada continúa siendo la de *Southern-blot* (88, 104).

Fundamento de la PCR

La amplificación de DNA por la PCR corresponde a una reacción enzimática ejecutada por alguna DNA polimerasa; esta clase de enzimas cataliza la

formación de un enlace fosfodiéster entre el 3'-OH en el extremo creciente de la cadena de DNA a elongar (el iniciador) y el grupo 5'-PO₄ del desoxirribonucleótido trifosfato (dNTP) entrante.

La elección de cada nucleótido a incorporar está determinada por el DNA molde, al que el iniciador se ha unido previamente por complementariedad de bases (68, 78, 88, 104).

La amplificación del DNA se logra mediante ciclos repetidos de PCR, cada uno de los cuales presenta 3 etapas distintivas de temperatura²

- (1) Desnaturalización del DNA molde -entre los 94° y 96°C-.
- (2) Alineamiento de los iniciadores al molde -entre los 42° y 60°C-.
- (3) Extensión (elongación) de los iniciadores por la DNA polimerasa -entre los 60° y 72°C-.

² Cada etapa dura apenas entre uno y algunos minutos, por lo cual casi resulta indispensable que el laboratorio cuente con un termociclador; éste permite programar las temperaturas y la duración de los diversos períodos, para todo el proceso.

La reacción de amplificación contempla la participación de dos iniciadores (*primers* o cebadores), que se hibridan (se unen por complementariedad de bases) a cadenas opuestas del segmento “blanco”; cada iniciador se orienta de forma tal que la elongación se lleva a cabo a partir de su extremo 3'-OH, a través de la zona delimitada entre ambos iniciadores y hasta la región homóloga al “otro iniciador”. Como cada producto de la amplificación incluye la secuencia complementaria a la del “otro iniciador”, prácticamente todos los productos de cada reacción sirven de molde para el siguiente ciclo de la PCR (19, 68, 78, 88, 104).

En la primera etapa del ciclo de la PCR, se provoca la desnaturalización del DNA molde, entre los 94° y 96°C. En la segunda etapa, la mezcla de reacción se somete a la temperatura óptima de alineamiento entre el iniciador y su molde (42° a 60°C). Finalmente, en la tercera etapa, la temperatura se modifica a 72°C, que es ligeramente inferior a la óptima de una DNA polimerasa termoestable. De esta manera, los iniciadores se elongarán hasta producir nuevas hebras de DNA, incorporando los dNTP's que correspondan -por complementariedad-, a través de la participación de la enzima (19, 78, 104).

Evidentemente, la hibridación inespecífica de los iniciadores puede conducir a la acumulación de productos inespecíficos o ausencia de amplificación.

Cabe señalar que la reacción concluye cuando la cantidad de enzima se reduce hasta niveles insuficientes (por la inactivación térmica ocurrida después de cada paso de desnaturalización), pero también gravita el hecho de que la efectividad del alineamiento de los iniciadores va decreciendo paulativamente (al irse disminuyendo su concentración e incrementando en forma exponencial el número de secuencias "blanco") (19, 88, 104).

Identificación del DNA amplificado

Una de las principales decisiones de quienes emplean la PCR consiste en seleccionar un método adecuado para detectar el producto amplificado dado que, entre los que se encuentran disponibles, existen diferencias muy significativas en términos de sensibilidad, especificidad, confiabilidad, dificultad y costo.

Como el producto primario de la PCR es una molécula dúplex de DNA lineal, de longitud y secuencia definidas, el método de detección ideal debe permitir una

determinación precisa del tamaño y de la pureza del producto amplificado (19, 68, 78).

En este sentido, existen técnicas que se basan en el uso de simples geles de agarosa hasta las que contemplan la secuenciación del DNA. A continuación se mencionan tres de las que se emplean con mayor frecuencia:

Electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida

El corrimiento electroforético de los productos de la PCR representa el método empleado más frecuentemente en los laboratorios, ya que aporta resultados relativamente confiables, con una sensibilidad de 1.0 a 5.0 ng de DNA.

El procesamiento simultáneo de marcadores de peso molecular y de controles positivos provenientes de microorganismos caracterizados con anterioridad, permite realizar las comparaciones correspondientes y, consecuentemente, establecer la procedencia del DNA amplificado por PCR (88, 78, 104).

Evidentemente, el uso de geles de agarosa a los que se ha incorporado un tinte fluorescente como bromuro de etidio -el cual se intercala entre las bases apiladas del DNA- facilita las lecturas con sólo exponer las placas correspondientes a la luz U.V. Las terminales de la fuente de poder deben conectarse de tal manera que el DNA emigre hacia el ánodo; una vez concluido el corrimiento, el sistema se puede fotografiar, colocándolo en un transiluminador U.V., utilizando filtros rojo o naranja y película de blanco y negro (19, 68, 78, 104).

Southern blot

Esta metodología representa una herramienta muy efectiva para establecer el origen del DNA presente en una muestra clínica. Una vez que se ha llevado a cabo la separación de los productos de la PCR -mediante electroforesis en gel-, se puede identificar un fragmento específico del DNA, previa transferencia de los diversos segmentos a una membrana de *nylon* o nitrocelulosa; posteriormente, la secuencia “blanco” se identifica vía su hibridación con una sonda (segmento monocatenario de DNA, de 18 a 50 nucleótidos de largo, proveniente de algún microorganismo plenamente identificado), marcada con algún elemento radioactivo. Después del lavado de la membrana, las dobles cadenas de DNA (constituidas por la sonda marcada y el DNA “problema”), permanecerán unidas a dicho soporte, en tanto que las moléculas monocatenarias se habrán eliminado. El revelado correspondiente se logra mediante la exposición de la membrana a una película de rayos-X (68, 78, 88).

Fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables (RFLP)

Otra metodología relacionada con el uso de sondas para identificar especies bacterianas, consiste en el denominado “fragmentos polimórficos de restricción con longitudes variables” (54).

La mayoría de los genomas microbianos posee regiones que presentan una variabilidad muy evidente, lo que determina que, en ciertas partes del DNA, las secuencias de los oligonucleótidos varíen no sólo entre una y otra especie bacteriana, sino también, de una cepa a otra.

Esta variabilidad puede ser demostrada cuando se purifica el DNA cromosómico y se fragmenta en varios segmentos, vía la acción de endonucleasas de restricción, las cuales cortan el DNA en regiones muy específicas, que presentan una determinada secuencia de bases nitrogenadas.

Una vez digerido el DNA con la enzima de restricción en turno, los fragmentos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa³; la distancia recorrida en el gel por cualquiera de los segmentos del DNA, puede relacionarse con marcadores de peso molecular.

Cuando el DNA de dos cepas diferentes es digerido por la misma enzima de restricción, y a continuación sus respectivos productos se separan mediante electroforesis, generalmente es fácil establecer diferencias entre ambos conjuntos de bandas. Sin embargo, ocasionalmente dichas diferencias pueden ser muy pequeñas, en cuyo caso se puede recurrir al análisis por *Southern-blot* (19, 54, 68, 78, 88, 104).

³ Los diferentes tamaños de los fragmentos obtenidos (origen de la denominación de "polimorfismo") dependen plenamente de la ubicación y cantidad de las secuencias que fungen como sitios de reconocimiento/corte para la(s) enzima(s) utilizada(s).

V. TRATAMIENTO

Desde el punto de vista de la terapéutica relacionada con los padecimientos infecciosos, es importante señalar que *P. aeruginosa* es el patógeno bacteriano que presenta una mayor resistencia hacia los diversos agentes antimicrobianos (5, 96).

Cabe recordar, que las cepas sensibles pueden adquirir resistencia cuando el tratamiento es prolongado y los antibióticos se emplean en forma individual; por tal motivo, se recomienda utilizar combinaciones, sobre todo si se trata de infecciones graves. Además, es conveniente tomar en cuenta que esta especie es muy resistente a la penicilina, a la ampicilina, a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las tetraciclinas, al cloranfenicol, a las sulfonamidas - excepto para uso tópico- y a algunos de los aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina, etc.) (59).

De hecho, se considera inútil la realización de pruebas de susceptibilidad asociadas a dichos fármacos, dados los esfuerzos exitosos que se han cristalizado en la obtención de nuevos antibióticos eficaces contra esta especie, los cuales abren una mejor perspectiva terapéutica, a pesar de la resistencia esporádica mediada por la transferencia de plásmidos y mutaciones al azar.

Es muy oportuno señalar que se están llevando a cabo trascendentales ensayos con una nueva cefalosporina, la cefsulodina, a la cual se ha comprobado que la mayoría de las cepas de *P. aeruginosa* es susceptible y, al parecer, difícilmente desarrolla resistencia. Además, este antibiótico atraviesa la pared celular del bacilo con mayor eficacia que otros fármacos y actúa en forma sinérgica con los aminoglucósidos (66, 90, 96).

Evidentemente, aunque aún no se ha detectado algún agente curativo contra la infección pulmonar (debida a *P. aeruginosa*) en los pacientes con fibrosis quística, cabe destacar que los tratamientos contemporáneos han mejorado significativamente la sobrevida de los enfermos. Un aminoglucósido, como la gentamicina o tobramicina, combinado con carbenicilina o ticarcilina, constituyen un régimen terapéutico efectivo contra esta entidad; sin embargo, las

combinaciones entre aminoglucósidos y las cefalosporinas de tercera generación - como la ceftazidima- o las quinolonas -ciprofloxacina- han resultado aún más eficaces para tratar las exacerbaciones de las infecciones pulmonares crónicas (16, 34, 50, 63, 92).

Los pacientes con neumonía, septicemia, endocarditis e infecciones urinarias por *P. aeruginosa*, a menudo tienen deterioro de sus defensas inmunológicas y generalmente adquieren estas infecciones dentro de los hospitales; por tal motivo, diversos especialistas aseguran que los aminoglucósidos continúan siendo los agentes de primera elección aunque, para evitar la resistencia bacteriana, es recomendable combinarlos con penicilinas tales como la ticarcilina o la azlocilina, que muestran una actividad mucho mayor que la carbenicilina; en cuanto a las infecciones urinarias, el aminoglucósido debe combinarse con la ciprofloxacina (23, 52, 106).

El tratamiento antibiótico de la meningitis por *Pseudomonas* se complica por la resistencia *in vivo* e *in vitro* de esta especie a numerosos fármacos y por su mala penetración al espacio subaracnoideo. La ceftazidima bien puede ser el agente antimicrobiano más efectivo para superar ambas limitaciones; la sensibilidad de

numerosas cepas a este medicamento, así como la capacidad de este último para atravesar la barrera hematoencefálica, dan como resultado que el LCR alcance niveles del fármaco por encima de la concentración mínima inhibitoria (MIC). Si bien la poca frecuencia de meningitis por esta especie ha impedido realizar estudios controlados, la eficacia de la ceftazidima se ha documentado con una amplia experiencia clínica; además, se han reportado buenos resultados en el tratamiento de esta enfermedad cuando la ceftazidima se combina con un aminoglucósido administrado por vía endovenosa (28).

Para el caso de la osteomielitis debida a *P. aeruginosa*, la terapéutica resulta difícil y prolongada, por lo que no se cuenta con datos generales sobre su tratamiento. Desde luego, los objetivos inmediatos consisten en lograr niveles antibióticos bactericidas en sangre y huesos, y mantenerlos durante los períodos necesarios para lograr la erradicación del microorganismo. La combinación de un aminoglucósido y una penicilina resistente a las β -lactamasas durante un mínimo de cuatro a seis semanas, continúa representando el tratamiento estándar; sin embargo, las infecciones complicadas pueden requerir el debridamiento del tejido afectado. La ceftazidima se ha utilizado con éxito, en dosis promedio de 4g/día, para tratar osteomielitis aguda y crónica; otro medicamento efectivo, es el

aztreonam que se emplea para tratar este tipo de afecciones. Este antibiótico es resistente a las β -lactamasas y difiere de otros antibióticos β -lactámicos, ya que su actividad es semejante a la de un aminoglucósido (67, 70).

Por otra parte, debido a que *P. aeruginosa* es una de las principales causas de úlceras corneales que conducen a la pérdida de la función ocular, la presencia de bacilos Gram negativos en la zona afectada requiere de la inmediata iniciación del tratamiento tópico y/o de la inyección subconjuntival de el (los) agente(s) antimicrobiano(s) seleccionado(s), destacando la gentamicina y la polimixina B, hasta que se obtengan cultivos negativos; sin embargo, en caso de una endoftalmitis estos agentes se aplican por vía parenteral (67, 80).

Por lo que se refiere a las quemaduras graves en las que los tejidos afectados han resultado colonizados por este microorganismo, la terapéutica también contempla el empleo de la combinación de gentamicina con una penicilina resistente a las β -lactamasas. Cabe señalar que la prevención de que aparezcan cepas resistentes incluye la meta de mantener la carga microbiana por debajo de los $10^5/g$ de tejido; de hecho, cifras mayores a la anterior provocan generalmente una septicemia mortal; en este sentido, debe administrarse un agente tópico que se

absorba con eficacia en la región anatómica quemada, destacando una crema muy eficaz compuesta a base de acetato de mafenida (Sulfamylon), que debe aplicarse una o dos veces diarias en cantidades que logren un espesor de 1 a 2 mm en la zona afectada; otra crema que aporta buenos resultados es la que contiene sulfadiazina de plata (Silvadene) y se administra de igual forma que la anterior. Adicionalmente, algunos autores recomiendan la hidroterapia en los pacientes con quemaduras, pues aseguran que disminuye notablemente los índices de mortalidad (43, 67, 86, 102).

Finalmente, el tratamiento de las infecciones en piel y tejidos blandos por *P. aeruginosa* varía de acuerdo con la zona afectada: la foliculitis cutánea, la otitis externa "maligna" y el síndrome de la uña verde, se resuelven eficazmente mediante la aplicación tópica de poilimixina B; sin embargo, estas dos últimas afecciones requieren de limpieza frecuente a través de compresas de ácido acético al 5 %, aunque para la otitis externa es necesario hacer una mezcla 1 + 1 de ácido acético con alcohol isopropílico. El ectima gangrenoso y la sinusitis se tratan comúnmente con ceftazidima, si bien en el caso de esta última afección, la ciprofloxacina proporciona mejores resultados (1, 67, 71).

Por otra parte, los intentos por controlar las infecciones causadas por *P. aeruginosa* dentro de los hospitales han resultado poco exitosos, ya que el monitoreo de rutina y el control estricto de todo el ambiente nosocomial disminuyen pero no erradican la presencia del microorganismo y, además, la inmunoterapia activa y/o pasiva han resultado poco favorables en seres humanos, aún cuando se han logrado avances alentadores en animales de experimentación.

Sin lugar a dudas, las personas con alto riesgo de contraer afecciones por *P. aeruginosa* son los candidatos idóneos a quienes se les debe administrar, de manera preventiva, una serie de vacunas polivalentes confeccionadas con polisacáridos de alto peso molecular obtenidas a partir del LPS y de preparaciones flegelares; dichas vacunas son inmunógenas en voluntarios adultos e inducen altos niveles de Ac's protectores. Cabe destacar que también se han desarrollado toxoides que disminuyen la capacidad de la bacteria para diseminarse y colonizar otros tejidos; entre los principales figuran los que se preparan a partir de las toxinas ETA y *LasB* (15, 20, 38, 48, 53, 61, 74, 77).

Finalmente, como apoyo a la terapéutica antibiótica ha emergido la inmunidad pasiva; a este respecto, se ha comprobado que el uso de Ac's anti-alginato

(producidos en voluntarios humanos) mezclados con una alginasa, disminuyen notablemente la adherencia del microorganismo, por lo que favorecen la sobrevida de los individuos con quemaduras graves, neutropénicos o con infección pulmonar crónica (14, 55, 73, 88).

CONCLUSIONES:

- *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que afecta principalmente a personas debilitadas, hospitalizadas, con quemaduras graves, neutropénicas o que reciben terapia inmunosupresora. A dichos individuos puede ocasionarles padecimientos tales como neumonía, ulceración de la córnea, infecciones urinarias, septicemia, endocarditis, etc.
- *Pseudomonas aeruginosa* es una de las bacterias patógenas más resistentes a la acción de diversos agentes físicos y químicos, por lo que puede crecer en medios inapropiados para otras especies, e inclusive, en soluciones desinfectantes comunes.
- *Pseudomonas aeruginosa* se considera el patógeno más resistente a los antibióticos; de hecho, los regímenes terapéuticos asociados a las enfermedades

que produce, se constituyen por combinaciones de agentes antimicrobianos, destacando los aminoglucósidos, las penicilinas resistentes a las β -lactamasas, las quinolonas y las cefalosporinas de tercera generación.

- Los principales factores de patogenicidad de *P. aeruginosa* son: la exotoxina A, la exoenzima S, los pili, la capa mucoide, las proteasas con actividad elastolítica -*LasA/LasB*-, la proteasa alcalina, las hemolisinas -el glucolípido y la fosfolipasa C-, la citotoxina y los pigmentos -piocianina y pioverdina-.
- El diagnóstico de laboratorio de las infecciones causadas por *P. aeruginosa* continúa realizándose eficazmente mediante métodos microbiológicos clásicos. No obstante, se espera que estos sean sustituidos paulatinamente por técnicas de biología molecular, dada su mayor confiabilidad y rapidez.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Agger WA and Mardan A. *Pseudomonas aeruginosa* Infections of Intact Skin. Clin Infect Dis. 1995; 20: 302-308.
2. Alves M and Martin L. Temperature Profiles and Alginate Synthesis in Mucoïd and Non-mucoïd Variants of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl Microbiol. 1992; 12: 244-248.
3. Apodaca G, Bomsel M, Lindstedt R, Engel J, Frank D, Mostov KE and Wiener-Kronish J. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* - Induced MDCK Cell Injury: Glycosylation- Defective Host Cells are Resistant to Bacterial Killing. Infect Immun. 1995; 63: 1541-1551.
4. Baltimore RS and Mitchell M. Immunologic Investigations of Mucoïd Strains of *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of Susceptibility to Opsonic Antibody in Mucoïd and Nonmucoïd Strains. J Infect Dis. 1980; 141: 238- 246.
5. Bingen E, Bonacorsi S, Rohrlich P and Duval M. Molecular Epidemiology Provides Evidence of Genotypic Heterogeneity of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Serotype O:12 Outbreak Isolates From a Pediatric Hospital. J Clin Microbiol. 1996; 34: 3226-3229.
6. Bishop MB, Baltch AL and Hill LA. The Effect of *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin and Toxin A on Human Polimorphonuclear Leukocytes. J Med Microbiol. 1987; 24: 315.
7. Boucher J, Yu H, Hibler N and Deretic V. Virulence Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Lacking the Extreme-Stress Sigma Factor Alg U (σ^E). Infect Immun. 1996; 64: 2774-2781.

8. Braude, A.:
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.
Editorial Médica Panamericana.
Buenos Aires, 1984.
9. Brostoff, J.:
INMUNOLOGÍA CLÍNICA.
Editorial Mosby/Doyma.
Madrid, 1994.
10. Buret A, Dunkley ML, Clancy RL and Cripps AW. Effector Mechanisms of Intestinally Induced Immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in the Rat Lung: Role of Neutrophils and Leukotriene B₄. *Infect Immun.* 1993; **61**: 671-679.
11. Buret A, Dunkley ML, Pang G, Clancy RL and Cripps AW. Pulmonary Immunity to *Pseudomonas aeruginosa* in Intestinally Immunized Rats: Roles of Alveolar Macrophages, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-1 α . *Infect Immun.* 1994; **62**: 5335- 5343.
12. Cervin MA, Simpson DA, Smith AL and Lory S. Differences in Eucaryotic Cell Binding of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mic Pathogenesis.* 1994; **17**: 291-299.
13. Cross AS, Sadoff JC, Iglewski BH and Sokol PA. Evidence for the Role of Toxin A in the Pathogenesis with *Pseudomonas aeruginosa* in Humans. *J Infect Dis.* 1980; **142**: 538-545.
14. Crys SJ, Fürer E, Sadoff JC, Fredeking T, Que JU and Cross AS. Production and Characterization of a Human Hyperimmune Intravenous Immunoglobulin Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* Species. *J Infect Dis.* 1991; **163**: 1055-1061.
15. Crys SJ, Wedgwood J, Lang AB, Ruedeberg A, Que JU, Fürer E and UB Schaad. Immunization of Noncolonized Cystic Fibrosis Patients Against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 1994; **169**: 1159-1152.

16. Daly JS, Dodge RA, Glew RH and Soja DT. Effect of zinc Concentration in Mueller-Hinton agar on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Imipenem. *J Clin Mic.* 1997; **35**: 1027-1029.
17. Deretic V, Gill JF and Chakrabarty AM. Alginate Biosynthesis: A Model System for Gene Regulation and Function in *Pseudomonas*. *Biotechnology.* 1987; **5**: 469-477.
18. Deretic V, Schurr MJ and Yu H. *Pseudomonas aeruginosa* Mucoidy and the Chronic infection Phenotype in Cystic Fibrosis. *Trends in Microbiology.* 1995; **3**: 351-355.
19. De Vos D, Lim A, Pirnay JP, Struelens M, Vandenvelde C, Duinslaeger L, Vanderkelen A and Cornelis P. Direct Detection and Identification of *P. aeruginosa* in Clinical Samples Such as Skin Biosy Specimens and Expectorations by Multiplex PCR Based on Two Outer Membrane Lipoprotein Genes, *opr I* and *opr L*. *J Clin Microbiol.* 1997; **35**: 1295-1299.
20. Donta ST, Peduzzi P, Cross AS, Sadoff J, Haakenson C, Cryz SJ, Kauffman C, Bradley S, Gafford G, Elliston D, Beam TR, John JF, Ribner B, Cantey R, Welsh CH, Ellison RT, Young EJ, Hamill RJ, Leaf H, Schein RMH, Mulligan M, Johnson C, Abrutyn E, Griffiss JM, Hamadeh R, Eliasson AH, McClain JB, Melcher GP, Kelly JW, Byrne WR, Wallace M, Amundson D, Gumpert B and Slagle D. Immunoprophylaxis Against *Klebsiella* and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Infect Dis.* 1996; **174**: 537-543.
21. Döring G, Obernesser HJ, Botzenhart K, Flehming B, Høiby N and Hofmann A. Proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis.* 1983; **147**: 744-749.
22. Dropulic LK, Leslie JM, Eldred LJ, Zenilman J and Sears CL. Clinical Manifestations and Risk Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1995; **171**: 930-937.

23. Dudley MN, Blaser J, Gilbert D, Mayer KH and Zinner SH. Combination Therapy with Ciprofloxacin plus Azlocillin against *Pseudomonas aeruginosa*: Effect of Simultaneous versus Staggered Administration in a In Vitro Model of Infection. J Infect Dis. 1991; **164**: 499-506.

24. Dunn MM, Dunne M and Kamp DW. Polymorphonuclear Leukocyte -and *Pseudomonas aeruginosa*- Induced Damage to a Human Pulmonary Epithelial Cell Line. J Infect Dis. 1990; **162**: 172-177.

25. Fergie JE, Shema SJ, Lott L, Crawford R and Patrick C. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in Immunocompromised Children: Analisis of Factors Associated with a Poor Outcome. Clin Infect Dis. 1994; **18**: 390-394.

26. Fleiszig SM, Zaidi TS and Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* Invasion of and Multiplication within Corneal Epithelial Cells In Vitro. Infect Immun. 1995; **63**: 4070-4077.

27. Flores G, Stavola JJ and Noel GJ. Bacteremia Due to *Pseudomonas aeruginosa* in Children with AIDS. Clin Infect Dis. 1993; **16**: 706-708.

28. Fong IW and Tmkins KB. Review of *Pseudomonas aeruginosa* Meningitis with Special Emphasis on Treatment with Ceftazidime. Rev Infect Dis. 1985; **7**: 604-611.

29. Freeman B.A.:
MICROBIOLOGÍA BURROWS.
Editorial Interamericana, 22a. edición.
México, D.F., 1989.

30. Goldberg J, Coyne M, Neely A and Holder Y. Avirulence of a *Pseudomonas aeruginosa* alg C Mutant in a Burned-Mouse Model of Infection. Infect Immun. 1995; **63**: 4166-4169.

31. Gosselin D, DeSanctis J, Boulé M, Skamene E, Matouk C and Radzioch D. Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Innate Resistance to Mouse Pulmonary Infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1995; **63**: 3272-3278.
32. Gregory RJ. Expression and Characterization of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *Nature*. 1990; **347**: 382.
33. Grundmann H, Kropec A, Hartung D, Berner R and Daschner F. *Pseudomonas aeruginosa* in a Neonatal Intensive Care Unit: Reservoirs and Ecology of the Nosocomial Pathogen. *J Infect Dis*. 1993; **168**: 943-947.
34. Gwynn MN, Webb LT and Rolinson GN. Regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria after the Bactericidal Action of Carbenicillin and other β -Lactam Antibiotics. *J Infect Dis*. 1981; **144**: 263-269.
35. Hazlett LD, Masinick S, Barrett R and Rosol K. Evidence for Asialo GM1 as a Corneal Glycolipid Receptor for *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion. *Infect Immun*. 1993; **61**: 5164-5173.
36. Hirakata Y, Furuya N, Tateda K, Kaku M and Yamaguchi K. In Vivo Production of Exotoxin A and Its Role in Endogenous *Pseudomonas aeruginosa* Septicemia in Mice. *Infect Immun*. 1993; **61**: 2468-2473.
37. Hla SW, Hui KP, Tan WC and Ho B. Genome Macrorestriction Analysis of Sequential *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bronchiectasis Patients without Cystic Fibrosis. *J Clin Mic*. 1996; **34**: 575-578.
38. Holder IA, Wheeler R and Montie TC. Flagellar Preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: Animal Protection Studies. *Infect Immun*. 1982; **35**: 276-280.
39. Holian A and Schuele RK. Biología del Macrófago Alveolar. *Hospital Practice*. 1992; **1**: 105-115.
40. Jawetz E., Melnick J.L. y Adelberg E.A.:
MICROBIOLOGÍA MÉDICA.
Editorial El Manual Moderno, 12a. edición.
México, D.F., 1987.

41. Jensen ET, Kharazmi A, Garred P, Kronborg G, Fomsgaard A, Mollnes TE and Høiby N. Complement Activation by *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Microbial Pathogenesis*. 1993; **15**: 377-388.
42. Johnson MK and Boese-Marrazz D. Production and Properties of Heat-Stable Extracellular Hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1980; **29**: 1028-1033.
43. Joklik W.K., Willett H.P., Amos D.B. y Wilfert C.M.:
ZINSSER MICROBIOLOGÍA.
Editorial Médica Panamericana, 20a. edición.
Buenos Aires, 1994.
44. Kanthakumar K, Taylor G, Tsang KW, Cundell DR, Rutman A, Smith S, Jeffery PK, Cole PJ and Wilson R. Mechanisms of Action of *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin on Human Ciliary Beat In Vitro. *Infect Immun*. 1993; **61**: 2848-2853.
45. Kawamoto S, Shibano Y, Fukushima J, Ishii N, Morihara K and Okuda K. Site-Directed Mutagenesis of Glu-141 and His-223 in *Pseudomonas aeruginosa* Elastase: Catalytic Activity, Processing, and Protective Activity of the Elastase against *Pseudomonas* Infection. *Infect Immun*. 1993; **61**: 1400-1405.
46. Knight DA, Finck-Barbançon V, Kulich SM and Barbieri JT. Functional Domains of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S. *Infect Immun*. 1995; **63**: 3182-3186.
47. Knight DA and Barbieri JT. Ecto-ADP-Ribosyltransferase Activity of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S. *Infect Immun*. 1997; **65**: 3304-3309.

48. Kohzuki T, Eguchi Y, Kato M, Irie K, Ohtsuka H, Higuchi A and Noguchi H. Protective Activity of Anti-Exotoxin A Monoclonal Antibody against Mice Infected with Toxin Producing *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 1993; 167: 119-125.
49. Krieg N.R., Holt, J.G, Smeath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T.: BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9TH edition. Editorial Williams and Wilkins. Baltimore, 1994.
50. Krilov LR, Blumer JL, Stern RC, Hartstein AI, Iglewski BN and Goldman DA. Imipenem/Cillastatin in Acute Pulmonary Exacerbations of Cystic Fibrosis. Rev Infect Dis. 1985; 7 (Suppl 3): 482-488.
51. Kulich SM, Frank DW and Barbieri JT. Purification and Characterization of Exoenzyme S from *Pseudomonas aeruginosa* 388. Infect Immun. 1993; 61: 307-313.
52. Levison ME and Kaye D. Pneumonia Caused by Gram-Negative Bacilli: An Overview. Rev Infect Dis. 1985; 7 (Suppl): 4.
53. Lydick E, Mclean AA, Woodhour AF and Callahan LT. Responses of Adult Volunteers to a *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxoid-A Vaccine. J Infect Dis. 1985; 151: 375.
54. Mahenthiralingam E, Campbell ME, Foster J and Lam JS. Random Amplified Polimorphic DNA Typing of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Patients with Cystic Fibrosis. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1129-1135.
55. Mai GT, McCormack JG, Seow WK, Pier GB, Jackson LA and Thong YH. Inhibition of Adherence of Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* by Alginase, Specific Monoclonal Antibodies, and Antibiotics. Infect Immun. 1993; 61: 4338-4343.

56. Mai GT, Seow WK, Pier GB, McCormack JG and Thong YH. Suppression of Lymphocyte and Neutrophil Functions by *Pseudomonas aeruginosa* Mucoid Exopolysaccharide (Alginate): Reversal by Physicochemical, Alginase, and Specific Monoclonal Antibody Treatments. *Infect Immun.* 1993; **61**: 559-564.
57. Mendelson M, Gurtman A, Szabo S, Neibart E and Meyers BR. *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in Patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1994; **18**: 886-895.
58. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C and Holder IA. Pyoverdinin is Essential for Virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 1996; **64**: 518-523.
59. Miller GH. Resistance to Aminoglycosides in *Pseudomonas*. *Trends in Microbiology.* 1994; **2**: 347-353.
60. Mody CH, Buser DE, Syme RM and Woods DE. *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S Induces Proliferation of Human T Lymphocytes. *Infect Immun.* 1995; **63**: 1800-1805.
61. Morihara K and Homma JY. New Method of Preparing Elastase Toxoid from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 1986; **23**:53-55.
62. Morissette C, Skamene E and Gervais F. Endobronchial Inflammation Following *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Resistant and Susceptible Strains of Mice. *Infect Immun.* 1995; **63**: 1718-1724.
63. Moss RB. Cystic Fibrosis: Pathogenesis, Pulmonary Infection, and Treatment. *Clin Infect Dis.* 1995; **21**: 839-851.
64. Murthy SK, Baltch AL, Smith RP, Desjardin EK, Hammer MC, Conroy JV and Michelsen PB. Oropharyngeal and Fecal Carriage of *Pseudomonas aeruginosa* in Hospital Patients. *J Clin Microbiol.* 1989; **27**: 35-40.

65. Mutharia LM, Nicas TI and Hancock RE. Outer Membrane Proteins of *Pseudomonas aeruginosa* Serotype Strains. J Infect Dis. 1982;; **146**: 770-779.
66. Myrvik, Q.N.:
BACTERIOLOGÍA Y MICOLOGÍA MÉDICAS.
Editorial Interamericana, 2a. edición.
México, 1991.
67. Neu HC. Infections Due to Gram-Negative Bacteria: An Overview. Rev Infect Dis. 1985; **7** (Suppl 4): 778-781.
68. Newton, CR. PCR: Essential Data Series, John Wiley and Sons Inc., New York, NY (1995).
69. Nicas TI, Bradley J, Lochner JE and Iglewski BH. The Role of Exoenzyme S in Infections with *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 1985; **152**: 716-720.
70. Norden CW and Keleti E. Experimental Osteomyelitis Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 1980; **141**: 71-75.
71. O'Donnell JG, Sorbello AF, Condoluci DV and Barnish MJ. Sinusitis Due to *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with HIV Infection. Clin Infect Dis. 1993; **16**: 404- 406.
72. Ohman DE, Burns RP and Iglewski BH. Corneal Infections in Mice with Toxin A and Elastase Mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 1980; **142**: 547-554.
73. Panjwani N, Zhao Z, Raizman MB and Jungalwala F. Pathogenesis of Corneal Infection: Binding of *Pseudomonas aeruginosa* to Specific Phospholipids. Infect Immun. 1996; **64**: 1819-1825.
74. Pennington JE and Small GJ. Passive Immune Therapy for Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia in the Neutropenic Host. J Infect Dis. 1987; **155**: 973-978.

75. Pier GB and Thomas DM. Characterization of the Human Immune Response to a Polysaccharide Vaccine from *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect Dis. 1983; **148**: 206-212.
76. Plotkowski MC, Saliba AM, Pereira SH, Cervante M and Bajolet-Laudinat O. *Pseudomonas aeruginosa* Selective Adherence to and Entry into Human Endothelial Cells. Infect Immun. 1994; **62**: 5456-5463.
77. Plotkowski MC, Tournier JM and Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* Strains Posses Specific Adhesins for Laminin. Infect Immun. 1996; **64**: 600-605.
78. Podzorski, RP and Persing DH. Molecular Detection and Identification of Microorganisms "En" *Manual of Clinical Microbiology*, 6TH edition, Murray, P.R., et al (Eds), American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1995): 130-157.
79. Pollack M and Prescott RK. Toxoid from Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*: Preparation and Characterization. J Infect Dis. 1982; **145**: 688-697.
80. Preston MJ, Kernack K and Berk RS. Kinetics of Serum and Ocular Antibody Responses in Susceptible Mice that Received a Secondary Corneal Infection with *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1993; **61**: 2713-2716.
81. Preston MJ, Fleiszig SMJ, Zaidi TS, Goldberg JB, Shortridge VD, Vasil ML and Pier GB. Rapid and Sensitive Method for Evaluating *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors During Corneal Infections in Mice. Infect Immun. 1995; **63**: 3497-3501.
82. Prince A. Adhesins and Receptors of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Infection of the Respiratory Tract. Mic Pathogenesis. 1992; **13**: 251-260.
83. Rajashekaraiiah KR, Rice TW and Kallick CA. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* from Syringes of Drug Addicts with Endocarditis. J Infect Dis. 1981; **144**: 482.

84. Rehm BHA, Grabert E, Hein J and Winkler U. Antibody Response of Rabbits and Cystic Fibrosis Patients to an Alginate-Specific Outer Membrane Protein of a Mucoid Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mic Pathogenesis*. 1994; **16**: 43-51.
85. Rich DP. Expression of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Corrects Defective Chloride Channel Regulation in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Nature*. 1990; **347**: 358.
86. Richard P, LeFloch R, Chamoux C, Pannier M, Espaze E and Richet H. *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in a Burn Unit: Role of Antimicrobials in the Emergence of Multiply Resistant Strains. *J Infect Dis*. 1994; **170**: 377-383.
87. Roth J.A., Bolin C.A., Brodgen K.A., Minion F.C. and Wannemuehler M.J.:
VIRULENCE MECHANISMS OF BACTERIAL PATHOGENS.
Editorial American Society for Microbiology, 2ND edition, Washington D.C., 1995.
88. Rys PN and Persing DH. Preventing False Positives: Quantitative Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products. *J Clin Microbiol*. 1993; **31** (9): 2356-2360.
89. Saiman L, Ishimoto K, Lory S and Prince A. The Effect of Piliation and Exoprotein Expression on the Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Respiratory Epithelial Monolayers. *J Infect Dis*. 1990; **161**: 541-548.
90. Salyers A.A. and Whitt D.D.:
BACTERIAL PATHOGENESIS: A molecular approach.
Editorial American Society for Microbiology, Washington D.C., 1994.
91. Schreiber JR, Pier GB, Grout M, Nixon K and Patawaran M. Induction of Opsonic Antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* Mucoid Exopolysaccharide by an Anti- Idiotypic Monoclonal Antibody. *J Infect Dis*. 1991; **164**: 507-514.
92. Scully BE, Ores CN, Prince A and Neu HC. Treatment of Lower Respiratory Tract Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with Cystic Fibrosis. *Rev Infect Dis*. 1985; **7** (Suppl 4): 669-673.

93. Seeger W, Walmrath D and Neuhoﬀ H. Pulmonary Microvascular Injury Induced by *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin in Isolated Rabbit Lungs. *Infect Immun.* 1986; **52**: 846.
94. Shekar R, Rice TW, Zierdt CH and Kallick CA. Outbreak of Endocarditis Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Serotype O11 Among Pentazocine and Tripeleminamine Abusers in Chicago. *J Infect Dis.* 1985; **151**: 203-207.
95. Sherris, J.C.:
MICROBIOLOGÍA MÉDICA: Introducción a las Enfermedades Infecciosas.
Ediciones Doyma, 2a. edición.
Barcelona, 1993.
96. Shearer BG and Legakis NS. *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for the Involvement of Lipopolysaccharide in Determining Outer Membrane Permeability to Carbenicillin and Gentamicin. *J Infect Dis.* 1985; **152**: 351-356.
97. Speert DP, Campbell ME, Davidson AGF and Wong LTK. *Pseudomonas aeruginosa* Colonization of the Gastrointestinal Tract in Patients with Cystic Fibrosis. *J Infect Dis.* 1993; **167**: 226-229.
98. Tamura Y, Suzuki S and Sawada T. Role of Elastase as a Virulence Factor in Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Infection in Mice. *J Infect Dis.* 1992; **12**: 237-244.
99. Tancrede CH and Andremont AO. Bacterial Translocation and Gram-Negative Bacteremia in Patients with Hematological Malignancies. *J Infect Dis.* 1985; **152**: 99-103.
100. Tang H, Kays M and Prince A. Role of *Pseudomonas aeruginosa* Pili in Acute Pulmonary Infection. *Infect Immun.* 1995; **63**: 1278-1285.
101. Tang H, DiMango E, Bryan R, Gambello M, Iglewski BH, Goldberg JB and Prince A. Contribution of Specific *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Factors to Pathogenesis of Pneumonia in a Neonatal Mouse Model of Infection. *Infect Immun.* 1996; **64**: 37-43.

102. Tredget EE, Shankowski HA, Joffe AM, Inkson TI, Volpel K, Paranchych W, Kibsey PC, Alton JDM and Burke JF. Epidemiology of Infections with *Pseudomonas aeruginosa* In Burns Patients: The Role of Hydrotherapy. Clin Infect Dis. 1992; 15: 941-949.

103. Volk, W.A.:
MICROBIOLOGÍA CLÍNICA.
Editorial Interamericana, 3a. edición.
México, 1988.

104. Whelen AC and Persing DH. The Role of Nucleic Acid Amplification and Detection in the Clinical Microbiology Laboratory. Annu Rev Microbiol. 1996; 50: 349-373.

105. Wick MJ. Structure, Function, and Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. Ann Rev Microbiol. 1990;44: 335-363.

106. Williams JD. Activity of Imipenem Against *Pseudomonas* and *Bacteroides* Species. Rev Infect Dis. 1985; 7 (Suppl 3): 411-416.

107. Wilson R, Sykes D and Cole PJ. Pulmonary Disease Associated with *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis: Current Status of the Host-Bacterium Interaction. J Infect Dis. 1986; 153: 376.

108. Woods DE, Straus DC, Johanson WG, Berry VK and Bass JA. Role of Pili in Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Mammalian Bucal Epithelial Cells. Infect Immun. 1980; 29: 1146-1151.

109. Woods DE, Sokol PA and Iglewski BH. Modulatory Effect of Iron on the Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Mouse Corneal Infections. Infect Immun. 1982; 35: 461-464.

110. Young LS. The Role of Exotoxins in the Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. J Infect Dis. 1980; 142: 626-630.