



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

CARACTERIZACION FUNCIONAL DE
MUTANTES con DEL BACTERIOFAGO
FIZ15 DE *Pseudomonas aeruginosa*.

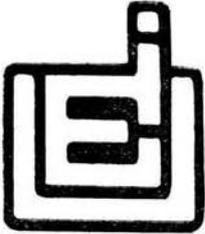
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ELVIA SELENE PEREZ HERRERA



AGOSTO DE 1993



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mis padres:

Enrique Pérez y Elvia Herrera

Por su amor y apoyo constante, por estar siempre pendientes de mi vida personal y profesional.

A mis hermanos:

Mo. del Refugio, Rafael, Enrique y Karina

Por todo el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

A mi esposo:

M en C Saúl Flores M.

Por su amor, comprensión y apoyo, por su ejemplo de superación y responsabilidad.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento al M en C Sergio Vaca Pacheco por su asesoramiento, apoyo y amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética M en C Ramón Moreno, Biól. Guadalupe Martínez, Fis. Raúl Gallardo, Biól. Elías Piedra, M en C Diego Arenas y Leonor Fragozo por brindarme su ayuda y amistad.

A los Profesores designados como revisores, por sus sugerencias y opiniones sobre este trabajo.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética de la Unidad de Biología Vegetal de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala-UNAM, bajo la dirección del M en C Sergio Vaca Pacheco.

" Las ilusiones, las metas, son solo tramos de un camino por recorrer; al pasar el tiempo cuando ya se han recorrido, lo único que queda son las ganas de seguir luchando por llegar a ser, lo que en un principio planeamos poder llegar a ser "

ELVIA SELENE

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVOS.....	13
MATERIAL Y METODOS.....	14
RESULTADOS.....	21
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	35

INTRODUCCION

CARACTERISTICAS GENERALES DE *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, con un tamaño de 1-4 micras de longitud por 0.5-1 micras de diámetro, es móvil debido a la presencia de un flagelo polar, no produce esporas, es aerobio y la temperatura óptima para su crecimiento es 37°C aunque puede crecer tanto a 5°C como a 42°C (40).

P. aeruginosa es considerada como un patógeno oportunista, causante de un 10 % a un 20 % de las infecciones de pacientes hospitalizados (4,38), principalmente aquellos que sufren quemaduras (44,45), leucemia (12), fibrosis quística (15) o que han sido tratados con drogas inmunosupresoras (47).

El aumento de infecciones por *P. aeruginosa* se debe a que estas bacterias presentan una gran capacidad de adaptarse a diferentes ambientes debido a sus mínimos requerimientos nutricionales, a que pueden utilizar como fuente de carbono una gran variedad de compuestos orgánicos (40), y a la capacidad de resistir a un gran número de antibióticos en virtud de que la mayoría posee plásmidos responsables de la resistencia (6,8,18,30). Además, es frecuente que las cepas resistentes a antibióticos posean resistencia a metales, como el mercurio, telurito, arsenato, cromato, cadmio (7,36,55).

Los hábitats fundamentales de *P. aeruginosa* son el suelo, el agua, las plantas y los animales (20,48), encontrándose a menudo en números pequeños en la flora intestinal normal y en la piel del ser humano (20). La fuente de infección es el ser humano enfermo o portador (intestinal o cutáneo) pudiendo transmitirse de persona a persona o de tejido a tejido (58) y es frecuente descubrirla en los ambientes húmedos de los hospitales (20) encontrándose contaminados los equipos médico quirúrgicos como catéteres, sondas, respiradores, termómetros y las soluciones desinfectantes y oftálmicas (58).

FACTORES DE VIRULENCIA

La virulencia de un microorganismo se debe a su capacidad para asociarse, invadir y multiplicarse en un hospedero para producirle una enfermedad local o sistémica (43).

La virulencia de *P. aeruginosa* es muy compleja, ya que se trata de un microorganismo invasivo y toxigénico, capaz de causar cuadros clínicos muy variados, predominando las infecciones urinarias, óticas, oculares, de heridas quirúrgicas y de quemaduras (58).

Dentro de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* se encuentran la toxicidad, resistencia a suero e invasividad, entre otros.

A) TOXICIDAD (EXOPRODUCTOS SINTETIZADOS POR *P. aeruginosa*):

EXOTOXINA A: Causante de necrosis tisular (20), es un polipéptido con un PM de 66 Kd (28) producido por un alto porcentaje de las cepas aisladas de pacientes (42) y cuya acción es inhibir la síntesis de proteínas por ADP-ribosilación del factor de elongación 2 (EF-2) requerido para el paso de translocación durante la síntesis proteica (41).

EXOENZIMA S: Una proteína con actividad de ADP-ribosiltransferasa que contribuye a la virulencia de *P. aeruginosa*, ya que se ha demostrado que mutantes deficientes en la producción de esta enzima son menos virulentas que su cepa progenitora tanto en el modelo del ratón quemado (infección aguda), como en el modelo de infección crónica en rata (37).

PROTEASA ALCALINA Y ELASTASA: Han sido implicadas en la producción de hemorragias en órganos internos (25), especialmente en los pulmones y probablemente son las responsables de la destrucción del tejido corneal en infecciones oculares producidas por este microorganismo (24). La elastasa es una proteasa neutra que contiene zinc, es producida como una proenzima inactiva asociada a la pared celular y es activada por proteólisis limitada por otras proteasas de *P. aeruginosa* o por la propia elastasa (21). La elastasa purificada inactiva a los factores C1, C3, C5, C8 y C9 del complemento *in vitro*, por lo que quizá inhibe el movimiento de los leucocitos polimorfonucleares al sitio de inflamación y

disminuye su actividad fagocítica (52). La elastasa también inactiva a la proteína α -1, el principal inhibidor de las serín proteasas endógenas (35) (p. ej. de leucocitos) cuya actividad aumentada podría causar daño tisular. También se ha demostrado que las proteasas de *P. aeruginosa* rompen a la IgG (11) y a la IgA1; generando, por acción sobre ésta última, dos fragmentos cuyos pesos moleculares son similares a los de los fragmentos Fc y Fab (58).

LEUCOCIDINA: Es una proteína de 27.5 Kd, termolábil y activable por tripsina, que destruye a los leucocitos, pero no a los glóbulos rojos (50,51).

DOS HEMOLISINAS: Un glicolípido termoestable y una fosfolipasa termolábil (Fosfolipasa C), la cual es una proteína de 78 Kd que cataliza la hidrólisis de la fosfatidilcolina (el componente principal del surfactante pulmonar) en fosforilcolina y diacilglicerol. Se ha sugerido que la combinación del glicolípido hemolítico y la fosfolipasa C puede producir efectos citopáticos considerables en los pulmones de pacientes con infecciones de estos órganos (29). Aparentemente el glicolípido favorece la actividad de la fosfolipasa actuando como detergente para solubilizar a los fosfolípidos (26). Ambas hemolisinas son producidas durante la fase estacionaria en medios de cultivo con bajas concentraciones de fosfato pero son reprimidas en medios con alto contenido de fosfato (14,23).

Se ha demostrado que la fosfolipasa C es muy activa sobre los fosfolípidos presentes en células de eucariontes (fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y esfingomiélin) y casi no tiene actividad sobre los fosfolípidos que forman parte de las membranas de las células de procariontes (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol) (3).

Por último el **ALGINATO** es una sustancia mucoide elaborada por algunas cepas de origen clínico, particularmente las aisladas de pacientes con fibrosis quística (63). El alginato es un exopolisacárido constituido principalmente por ácido manurónico y ácido gulurónico (5) que hace que las cepas presenten una morfología colonial muy mucoide. El alginato inhibe las actividades fagocíticas de los leucocitos (49,53) y es capaz de producir efectos similares a los producidos por la infección de ratones con bacterias viables (9,54). También ha sido implicado en la adhesión de *P. aeruginosa* a células de tráquea de ratón (46).

B) RESISTENCIA A SUERO HUMANO.

El suero normal de animales presenta un efecto bactericida sobre varias especies bacterianas como *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *P. aeruginosa* entre otros (33).

La resistencia bacteriana al suero consiste en la disminución de la sensibilidad al efecto del mismo en ensayos que contienen cantidades excesivas del sistema bactericida (56).

La actividad bactericida, cuyo principal componente es el complemento, es considerada como una importante defensa del hospedero contra infecciones bacterianas, por lo que la resistencia a la muerte por suero es una propiedad de virulencia importante para una bacteria invasiva (43,57).

P. aeruginosa produce una endotoxina llamada lipopolisacárido (LPS) común a las otras bacterias Gram-negativas, esta endotoxina activa los sistemas de coagulación, fibrinolítico, del complemento y estimula la liberación de péptidos vasoactivos (20,58).

Se ha considerado que el LPS es un factor importante para la resistencia bacteriana al Suero Humano Normal (SHN) y está compuesto por tres regiones: (i) El lípido A, que está formado de glucosamina-fosfato y ácidos grasos, esta región es responsable de las propiedades endotóxicas del LPS. (ii) El "core", es un oligosacárido, compuesto de 2-ceto 3-desoximannulosuctónico, que está unido al lípido A y, (iii) la región del polisacárido O específico (antígeno O); éste consiste de unidades repetidas de oligosacáridos, su composición y estructura son la base química de la especificidad serológica de las bacterias Gram-negativas (31,39,43).

Los plásmidos, aparte de conferir resistencia a antibióticos como la estreptomina, ampicilina y el cloranfenicol entre otros, pueden producir efectos sobre la superficie de las células bacterianas, trayendo consigo la aparición de nuevos determinantes antigénicos y cambios en la estructura del lipopolisacárido, responsable de la resistencia al efecto bactericida del suero humano (32).

Se ha demostrado también que la presencia de profagos en las cepas puede modificar algunas propiedades de virulencia mediante conversión lisogénica. La conversión lisogénica se produce cuando uno o más genes del profago introducido confieren nuevas propiedades al hospedero (19).

En *P. aeruginosa* se ha reportado que la lisogenización de la cepa PA01 (serotipo O:2a,d) por el bacteriófago D3, causa conversión lisogénica mediante la introducción de un grupo acetilo en la posición 4 de la fucosamina y el cambio en el enlace entre las unidades repetidas de trisacáridos de α 1-4 a β 1-4 (27). Este cambio superficial a nivel del antígeno O que le causa el profago D3 a la cepa PA01, le confiere resistencia a la fagocitosis por macrófagos peritoneales de ratón *in vitro* y resistencia a la superinfección por el fago D3, ésta última debida a que D3 es incapaz de adsorberse a la lisógena (17,27).

C) INVASIVIDAD

La movilidad de *P. aeruginosa*, debida al flagelo polar, facilita la invasión del hospedero por la bacteria. Se ha demostrado que la inmunización activa con el antígeno flagelar aislado protege a los ratones quemados infectados *in vitro* (58).

Aparentemente esta protección se debe a la inmovilización de la bacteria, que en estas condiciones es capaz de colonizar la piel pero no de penetrar ni de causar letalidad (16).

La evidencia más sólida de que el flagelo contribuye importantemente a la virulencia de *P. aeruginosa* ha sido aportada por Montie *et al.* (34), quienes obtuvieron por mutagénesis con etilmetanosulfonato, una mutante Fla⁻ de la cepa virulenta M2 y a partir de ésta, una revertante espontánea Fla⁺. Las tres cepas fueron idénticas bioquímica y morfológicamente (excepto por la ausencia de flagelo en la mutante Fla⁻). En el modelo del ratón quemado, la cepa M2 silvestre causó el 100% de mortalidad 3 días después de la infección con 100 UFC/ratón, en tanto que la mutante M2 Fla⁻, a una dosis de 10⁶ UFC/ratón causó la muerte sólo de 40% de los ratones 3 días postinfección y del 80% 7 días después de la infección. La revertante M2 Fla⁺, mostró un comportamiento similar al de la cepa silvestre: 80-100 % de mortalidad 3-4 días después de la infección con 100 UFC/ ratón.

Uno de los factores primarios de virulencia bacteriana, es la adhesión y colonización de bacterias a un sitio del hospedero, comúnmente a células epiteliales. Mediante la adhesión los organismos pueden establecerse, mantenerse y reproducirse en los tejidos, teniendo de este modo la posibilidad de invadirlos y de resistir las defensas normales del hospedero (22).

La adhesión de *P. aeruginosa* a superficies epiteliales ha sido registrado como el primer paso en el establecimiento de una infección en el tracto respiratorio, causado por estos bacilos (22).

La adhesión bacteriana es el resultado de la asociación entre moléculas específicas de las superficies bacterianas (adhesinas) y receptores, que son componentes de la superficie mucosa de las células del hospedero, que sirven como estructuras adhesivas complementarias (1,2).

Las adhesinas son pili (*fimbriae*) de la superficie de las bacterias Gram-negativas. Los pili son polímeros de proteínas, compuestos de subunidades idénticas, unidas por puentes de hidrógeno o por interacciones hidrofóbicas. Las subunidades tienen un PM de 8000 a 26000 Kd, están formadas en un 50% por aminoácidos no polares y su punto isoeléctrico oscila entre 3.7 y 5.6 (2).

En cuanto a los receptores celulares para las bacterias patógenas, éstos contienen en su mayoría carbohidratos, a veces es un solo residuo el responsable de la adhesión y otras veces son cadenas de oligosacáridos.

Actualmente se conocen tanto las adhesinas como los receptores de algunas bacterias; *E. coli*, por ejemplo, tiene una adhesina identificada como *fimbriae* tipo I, mientras que el receptor implicado es el carbohidrato D-Manosa (2). Para *P. aeruginosa* se sabe que dos componentes superficiales intervienen en la adhesión de estas bacterias a células epiteliales humanas el alginato y una adhesina del tipo *fimbriae* (pili), mientras que se desconoce la naturaleza del receptor. La adhesión mediada por los pili de *P. aeruginosa* a estas células ocurre por un mecanismo independiente de energía y es inhibida por pili purificados o por la adición de anticuerpos a células epiteliales contra los pili de la célula bacteriana antes de la prueba de adhesión (2,62).

Existen evidencias que demuestran la preferencia de las bacterias para adherirse específicamente a ciertos tipos de tejidos, se cree que este tropismo está determinado en gran medida por la distribución de las adhesinas de la superficie bacteriana y los receptores en los diferentes tejidos. (13).

Además, la presencia de fagos en cepas de *P. aeruginosa* produce cambios que contribuyen a la virulencia de la misma.

Vaca *et al.*, (59,60), aislaron el bacteriófago FIZ15 de una cepa clínica de *P. aeruginosa* y construyeron la lisógena PIZ15 en la cepa PAO1 (libre de fagos) y observaron que el fago FIZ15 le confiere a su lisógena un incremento significativo en la adhesión a células bucoepiteliales humanas (CBH) mediante un mecanismo que requiere energía; le confiere una resistencia de 6 y 20 veces mayor al efecto bactericida del suero humano a concentraciones de 75% y 80%, respectivamente, y una sobrevivencia 2 veces mayor a la fagocitosis por macrófagos de ratón (todo esto con respecto a la cepa control PAO1, libre de fagos).

Observaron también que el fago FIZ15 es incapaz de formar placas en la cepa PAO1 lisógena para el fago D3 y que D3 es incapaz de crecer en PIZ15. La incapacidad de estos fagos para crecer en las lisógenas se debe a que no pueden adsorberse, lo que demuestra que los fagos utilizan el mismo receptor y causan conversión lisogénica a nivel de éste.

Posteriormente aislaron una mutante espontánea de PAO1 resistente a FIZ15 (PAO/15), la cual no permitió la adsorción de D3 ni de FIZ15, esta mutante mostró una resistencia 2 veces mayor que PAO1 a la fagocitosis, una sobrevivencia de 10 y 30 veces mayor al efecto bactericida del suero humano a concentraciones de 75% y 80%, respectivamente, y una adhesión a células bucoepiteliales 4 veces mayor que PAO1 (59,61).

Todo lo anterior demuestra que la resistencia a la fagocitosis, al efecto bactericida del suero y el incremento en la adhesión a células bucoepiteliales que muestra la lisógena PIZ15, se debe a un cambio superficial que el profago le causa a la lisógena, a nivel del propio receptor para el fago, el cual parece residir en el antígeno O; por lo tanto, el fago FIZ15 le confiere a su lisógena importantes factores de virulencia (10).

Además, la adhesión de la cepa PA01 a CBH está mediada por los pili y ocurre mediante un mecanismo que no requiere energía, ya que las bacterias muertas por irradiación con luz UV o vivas pero incapaces de sintetizar ATP por la adición de un desacoplante de la fosforilación oxidativa (p. ej. 2,4-D) muestran valores de adhesión idénticos a los de la cepa no tratada (61, 62). Además, el ión potasio incrementa grandemente la adhesión de *P. aeruginosa* a CBH, pero el efecto estimulador es inhibido por la adición de un desacoplante de la fosforilación oxidativa (60).

En nuestro laboratorio estamos interesados en caracterizar al fago FIZ15. Uno de los enfoques empleado para este propósito fue aislar mutantes estreptomycin sensibles (S_m^S) por mutagénesis con Etilmetanosulfonato (EMS) de la cepa PIZ15. Estas mutantes fueron denominadas *con*. Se aisló el bacteriófago de cada una de las mutantes *con* y se relisogenizó a la cepa PA01; estas últimas lisógenas se denominaron *cond*.

OBJETIVOS

- 1.- Caracterizar el efecto del KCl sobre la adhesión de las cepas *con* y *cond* en presencia y ausencia de 2,4- Dinitrofenol.
- 2.- Determinar el efecto bactericida del suero humano normal sobre las cepas *con* y *cond*.
- 3.- Determinar si persiste la alteración superficial inducida por el fago FIZ15 en las cepas *con* y *cond*, midiendo la capacidad de adsorción del fago FIZ15.

MATERIAL Y METODOS

1.- CEPAS BACTERIANAS

NOMBRE	CARACTERISTICAS	ORIGEN
PA01	<i>P.aeruginosa</i> protótrofa. libre de fagos.	Dr. B.W. Holloway, MONASH UNIVERSITY, AUSTRALIA.
PIZ15	PA01 lisógena para el fago FIZ15, Sm ^R .	Lab. Genética ENEP Iztacala-UNAM
con1	Mutante Sm ^S obtenida de PIZ15 por mutagénesis con EMS.	Lab. Genética ENEP Iztacala-UNAM
con2	Mutante Sm ^S obtenida de PIZ15 por mutagénesis con EMS.	Lab. Genética ENEP Iztacala-UNAM
con1d	PA01 lisogenizada con el fago aislado de la cepa con1.	Lab. Genética ENEP Iztacala-UNAM
con2d	PA01 lisogenizada con el fago aislado de la cepa con2.	Lab. Genética ENEP Iztacala-UNAM

2.- MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

-AGAR NUTRITIVO (AN): Pesar 23 gramos de AN (Dibico), disolver en 1000 ml de agua destilada y esterilizar.

-AGAR SUAVE (AS): Pesar 10 gramos de Peptona de Caseína, 6 gramos de Agar Bacteriológico, 2.5 gramos de Cloruro de Sodio, disolver en 1000 ml de agua destilada y esterilizar.

-AGAR DE SOYA Y TRIPTICASA (AST): Pesar 30 gramos de CST, 15 gramos de Agar Bacteriológico, disolver en 1000 ml de agua destilada y esterilizar.

-CALDO NUTRITIVO (CN): Pesar 8 gramos de CN (Bioxon), disolver en 1000 ml de agua destilada y esterilizar.

-CALDO DE SOYA Y TRIPTICASA (CST): Pesar 30 gramos de Caldo de Soya y Tripticasa (Bioxon), disolver en 1000 ml de agua destilada y esterilizar.

-AZUL DE METILENO (0.4%): Pesar 0.4 gramos de Azul de Metileno y disolver en 100 ml de agua destilada.

-CLORURO DE POTASIO: KCl 50 mM.

-2,4-Dinitrofenol: 2,4-D a 75 µg/ml.

-ERITROCINA B (0.4%): Pesar 0.4 gramos de Eritrocina B y disolver en 100 ml de agua destilada.

-PBS (SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS): Pesar 2.55 gramos de KH_2PO_4 , aforar a 125 ml, 20.1 gramos de Na_2HPO_4 , aforar a 500 ml, 4.25 gramos de NaCl , aforar a 500 ml, tomar 60, 380 y 440 ml respectivamente de las soluciones anteriores, ajustar el pH a 7.2 y esterilizar.

-TRIS 0.1 M (SOLUCION AMORTIGUADORA): Pesar 12.11 gramos de TRIS (MERCK), disolver en 1000 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.2 y esterilizar.

-TRIPSINA (2.5 ug/ml): Pesar 0.0025 gramos de Tripsina y disolver en 1 ml de PBS, de ahí tomar 0.1 ml y disolver en 1 ml de PBS.

3.-METODOS.

PRUEBA DE ADHESION A CELULAS BUCEOPITELIALES HUMANAS (CBH)

1. OBTENCION DE CELULAS: Las células se obtuvieron por raspado de la mucosa epitelial con un hisopo estéril, de donadores adultos saludables. Las células obtenidas se lavaron 3 veces con TRIS 0.1 M por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos, se les agregó 2.5 µg/ml de Tripsina por 10 minutos a 37°C, se lavaron y ajustaron a 2.5×10^4 cel/ml por conteo en un hemocitómetro de Neubauer.

2. OBTENCION DE BACTERIAS: Se creció la bacteria durante 12 hs. a 37°C en CST y se resembró en AST durante 24 hs. a 37°C, se colectó y lavó 3 veces con TRIS 0.1 M y se hicieron diluciones hasta obtener una absorbancia de 0.2-0.3 a 590 nm.

La prueba de adhesión se realizó mezclando 1 ml de células epiteliales con 0.2 ml de bacterias, se incubó 2 hs a 37°C en un baño de agitación a 20 rpm. Posteriormente se lavó 3 veces con TRIS 0.1 M para liberar las bacterias que no se unieron, después del primer lavado se les agregaron 2 gotas de Eritrocina B al 0.4 %, se hicieron frotis teñidos con Azul de Metileno al 0.4 % y se lavaron con agua destilada.

Se contó el número de bacterias adheridas a cada una de 40 células epiteliales en un microscopio de luz.

En cada experimento se incluyó un tratamiento con KCl 50 mM, un tratamiento con KCl 50 mM más 2,4-D 75 µg/ml y un control al cual no se le agregaron bacterias para evaluar el número de bacilos autóctonos adheridos.

PRUEBA DE RESISTENCIA A SUERO HUMANO NORMAL (SHN)

1. OBTENCION DE SUERO HUMANO: Se colectó sangre de donadores humanos saludables y se incubó a 37°C durante 1 h. Se separó el coágulo y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se separó el suero con una pipeta Pasteur.

2. ENSAYO DE RESISTENCIA A SUERO: Se creció la bacteria en 10 ml de CST hasta fase exponencial, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos, dos veces. En matraces de 125 ml se hicieron mezclas de suero, bacteria y TRIS y se incubó a 37°C en agitación durante 3 hs. Se hicieron diluciones seriadas, se espatularon en cajas de AN y se incubaron a 37°C durante 12 hs.

A partir de las colonias sobrevivientes se determinó el porcentaje de sobrevivencia, usando como control las bacterias que no fueron expuestas al suero:

$$S/S_0 = \frac{\text{UFC/ml con suero}}{\text{UFC/ml sin suero}} \times 100$$

PRUEBA DE ADSORCION DEL FAGO FIZ15

1. OBTENCION DE UN LISADO DE ALTO TITULO: Se tomó un inóculo de FIZ15 y se trazó una línea superficial de un extremo a otro de una caja de AN, se vació 0.2 ml de PA01 más 3 ml de AS, se incubó a 37°C durante 12 hs.

Para obtener el lisado del fago se tomó una placa aislada y se mezcló con 0.3 ml de PA01 y 5 ml de CN, se incubó a 37°C en agitación de 3 a 5 hs. (hasta lisis), se agregaron 5 gotas de cloroformo y se incubó 15 minutos a 37°C para completar la lisis de las bacterias. Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm y se decantó a un tubo estéril que contenía una gota de cloroformo. Se almacenó a 4°C.

2. TITULACION DEL STOCK: Se hicieron diluciones seriadas del fago FIZ15 en CN, se plaquearon con 0.2 ml de PA01 más 3 ml de AS, en cajas de Petri con AN, y se incubaron a 37° C durante 12 hs.

Se contó el número de placas por caja y se calculó el número de unidades formadoras de placa por mililitro:

$$\text{ufp/ml} = \frac{\text{No. de placas}}{(\text{vol. dilución})(\text{dilución})}$$

La prueba de adsorción se realizó mezclando 2×10^7 bacterias de fase exponencial en CN con 10^6 fagos (multiplicidad de infección = 0.05) en un volumen total de 0.5 ml. Se tomaron alícuotas de 50 μ l (a 0, 6 y 12 min.) y se mezcló con 0.45 ml de CN y 0.1 ml de cloroformo para lisar las bacterias.

Se hicieron diluciones seriadas, se tituló e incubó a 37°C durante 12 hs. para contar los fagos no adsorbidos y se calculó la adsorción:

$$\% \text{ Adsorción} = 1 - \left(\frac{\text{fago libre}}{\text{fago total}} \right) \times 100$$

RESULTADOS

* ADHESION DE LAS MUTANTES *con* Y *cond* A CBH.

Se ha reportado que el bacteriófago FIZ15 (aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa*) al lisogenizar a la cepa PA01 (libre de fagos, SM⁺), le confiere un fenotipo SM⁺ y un incremento significativo en la adhesión a CBH, por conversión lisogénica (61).

Con el propósito de obtener fagos mutantes deficientes en la promoción de la conversión lisogénica (que ya no confieran el fenotipo de adhesión aumentada), se mutagenizó a la cepa PIZ15 (PA01 lisógena para FIZ15) con EMS y se obtuvieron 2 mutantes SM⁺ llamadas *con* (10). A estas 2 mutantes les medimos adhesión a CBH. En la Tabla 1 se observa que la mutante *con1* presenta una adhesión de 22.5 Bacterias/Célula (B/C) similar a la de PA01 (20.4 B/C) y la mutante *con2* presenta una adhesión de 46.1 B/C (es 2 veces mayor que la de PA01 y 1.3 veces mayor que la de PIZ15). Para determinar dónde se encontraba la mutación *con*, se aisló el fago de cada una de las mutantes *con* y se lisogenizó nuevamente a la cepa PA01. Estas últimas lisógenas fueron llamadas *cond*. Si el fenotipo mutante se debe a una mutación en el cromosoma del fago, las lisógenas *cond* no deben ser capaces de mostrar un aumento en la adhesión sobre el valor de PA01. En la Tabla 1 puede verse que la adhesión de la lisógena *con1d* fue de 21.1 B/C, muy similar a la de PA01 y la adhesión de *con2d* fue de 36.3 B/C muy similar a la adhesión de PIZ15 (36.6 B/C). Estos resultados sugieren que para *con1* la mutación se localiza en el cromosoma viral, mientras que para *con2* la mutación parece residir en el cromosoma bacteriano.

TABLA 1. ADHESION DE LI SOGENAS Y MUTANTES DE *Pseudomonas aeruginosa* A CELULAS BUCEOPI TELIALES HUMANAS.

CEPA	N° BACTERIAS POR CELULA*
PA01	20.4 ± 2.0
PIZ15	36.6 ± 2.8
con1	22.5 ± 1.9
con2	46.1 ± 3.4
con1d	21.1 ± 1.9
con2d	36.3 ± 2.0

* Media ± Desviación standar de 3 ensayos.

Se mezcló 2.5×10^4 células (tratadas con $2.5 \mu\text{g/ml}$ de tripsina, 10 min. a 37°C) con 0.2 ml de bacterias de fase exponencial y se incubó 2 hs. a 37°C en agitación.

Se hicieron frotis y se contó el N° de bacterias adheridas por célula epitelial en 40 CBH.

Vaca et al. (60) han demostrado que los iones potasio incrementan grandemente la adhesión de *P. aeruginosa* a CBH. Con la finalidad de caracterizar el efecto del potasio sobre la adhesión de las cepas *con* y *cond*, se llevó a cabo el ensayo de adhesión a CBH en presencia de KCl. En la Tabla 2 se observa que el KCl incrementa la adhesión tres veces (PA01) y dos veces (PIZ15, *con* y *cond*), con respecto a los resultados obtenidos en ausencia de KCl (Tabla 1).

TABLA 2. EFECTO DEL KCl SOBRE LA ADHESION DE *Pseudomonas aeruginosa* A CBH.

CEPA	N° BACTERIAS POR CELULA*
PA01	63.8 ± 3.0
PIZ15	86.0 ± 2.7
<i>con</i> 1	43.6 ± 2.9
<i>con</i> 2	88.9 ± 2.6
<i>con</i> 1d	40.2 ± 2.2
<i>con</i> 2d	70.6 ± 2.4

* Media ± Desviación standar de 3 ensayos.

El ensayo es el mismo que el citado en la Tabla 1 excepto por la adición de KCl 50 mM.

Se ha descrito también que el efecto estimulador del KCl sobre la adhesión de *P. aeruginosa* se ve inhibido en presencia de un desacoplante de la fosforilación oxidativa (2,4-D) que impide la síntesis de ATP (60). La Tabla 3 muestra el resultado de la inhibición del efecto estimulador del potasio sobre la adhesión de las cepas *con* y *cond* a CBH cuando se adicionó el desacoplante de la fosforilación oxidativa, el 2,4-D.

TABLA 3. EFECTO DEL KCl-2,4 D SOBRE LA ADHESION DE *Pseudomonas aeruginosa* A CBH.

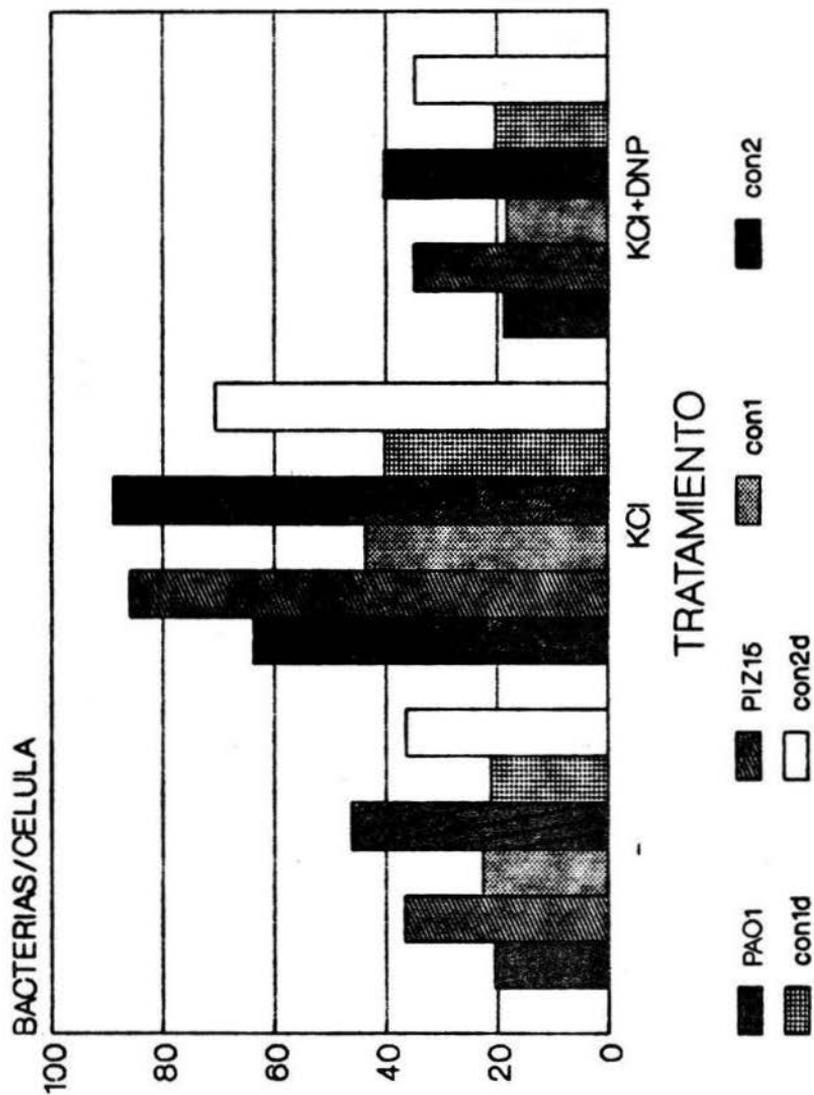
CEPA	Nº BACTERIAS POR CELULA [±]
PAD1	18.8 ± 2.1
PIZ15	34.8 ± 1.8
<i>con1</i>	18.1 ± 1.6
<i>con2</i>	40.2 ± 2.3
<i>con1d</i>	20.2 ± 1.7
<i>con2d</i>	34.7 ± 1.8

* Media ± Desviación standar de 3 ensayos.

El ensayo es el mismo que el citado en la Tabla 1 excepto por la adición de KCl 50 mM y 2,4-D 75 µg/ml.

En la Gráfica 1 se observa que el KCl incrementa 3 veces la adhesión de PAD1 y 2 veces la adhesión de PIZ15, *con* y *cond* en comparación con el tratamiento control al cual no se le adicionó KCl. Se observa también que el 2,4-D contrarresta el efecto estimulador del potasio ya que los valores de adhesión obtenidos en este tratamiento son muy similares a los obtenidos en el tratamiento control.

Figura 1. Efecto del KCl sobre la adhesion de *P. aeruginosa* a CBH



§ EFECTO BACTERICIDA DEL SHN SOBRE LAS CEPAS *con* Y *cond*.

Se determinó el efecto bactericida del SHN sobre las cepas *con* y *cond*. Los resultados obtenidos se describen en la Tabla 4 donde se observa que a una concentración de 75% de SHN, las lisógenas *con1* y *cond* presentan una sobrevivencia similar a la de PA01; 8.48% para *con1* y 8.80% para *cond* con respecto a 9.39% de PA01, esto sugiere fuertemente que la mutación *con1* se encuentra sobre el cromosoma del fago. Por otra parte las cepas *con2* y *con2d* presentan una sobrevivencia similar a PIZ15; 54.99% para *con2* y 52.02% para *con2d* con respecto a 56.11% de PIZ15, esto sugiere que la mutación *con2* se encuentra sobre el cromosoma de la bacteria.

TABLA 4. RESISTENCIA AL SUERO HUMANO NORMAL DE LISOGENAS Y MUTANTES DE *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPA	% SOBREVIVENCIA*
PA01	9.39 ± 0.04
PIZ15	56.11 ± 2.2
<i>con1</i>	8.48 ± 0.67
<i>con2</i>	54.99 ± 2.3
<i>con1d</i>	8.80 ± 0.74
<i>con2d</i>	52.02 ± 0.50

* Media ± Desviación standar de 3 ensayos.

Se crecieron las cepas por separado hasta fase exponencial, se diluyó 1/10 y se mezcló 0.1 ml de cada cepa con 0.75 ml de SHN más 0.15 ml de PBS. Se incubó a 37°C y se determinó S/S₀ por cuenta viable.

‡ ADSORCION DEL FAGO FIZ15 A LAS CEPAS *con* Y *cond*.

Como se mencionó anteriormente, el fago FIZ15 al lisogenizar a la cepa PA01 le causa un cambio superficial a nivel del propio receptor para el fago, el cual parece residir en el antígeno "O" del lipopolisacárido. Aparentemente este cambio superficial es el responsable de los fenotipos de adhesión aumentada, resistencia al efecto bactericida del SHN, así como también de la incapacidad del fago FIZ15 para adsorberse a su lisógena (59,61).

Para saber si persistía el cambio superficial ocasionado por el profago a nivel del receptor en las cepas *con* y *cond*, se midió la capacidad de FIZ15 para adsorberse a estas lisógenas.

Si las lisógenas *con* y *cond* presentan aún el cambio superficial en el receptor para el fago, éste no debe ser capaz de adsorberse a ellas, pero sí a la cepa silvestre PA01 que no ha sufrido modificación en el receptor para el fago. Los datos de la TABLA 5 muestran que el fago FIZ15 a los 12 minutos se adsorbe en un 90% a las cepas PA01, *con1* y *cond1*, no así para las cepas PIZ15, *con2* y *con2d* donde no se adsorbe. Así, las lisógenas *con1* y *cond1* ya no presentan el cambio superficial, mientras que *con2* y *con2d* sí.

TABLA 5. ADSORCION DEL FAGO FIZ15 A LISOGENAS Y MUTANTES DE *Pseudomonas aeruginosa*.

CEPA	% ADSORCION*	
	6 min.	12 min.
PA01	89.84 ± 0.86	91.78 ± 0.36
PIZ15	1.47 ± 0.31	2.04 ± 0.64
con1	81.53 ± 2.33	82.15 ± 2.08
con2	3.97 ± 0.80	5.11 ± 0.80
con1d	93.0 ± 1.84	93.29 ± 1.92
con2d	1.95 ± 0.12	2.49 ± 0.79

* Media ± Desviación standar de 3 ensayos.

Se mezcló 10^6 fagos con 2×10^7 bacterias de fase exponencial en un volumen total de 0.5 ml.

Se tomaron alícuotas de 50 μ l a 6 y 12 minutos para titular los fagos no adsorbidos.

Para descartar que la habilidad del fago FIZ15 para adsorberse a *con1* y *con1d* fue debida a la ausencia del profago FIZ15, se confirmó el estado de lisogenia de estas cepas mediante 2 experimentos; la formación de placa lítica (liberación espontánea de fagos) sobre un tapiz de PA01 y la eficiencia de plaqueo del fago FIZ15 sobre las lisógenas en relación a la mostrada en PA01.

En la Tabla 6 puede verse que tanto la cepa PIZ15 como las cepas *con* y *con1d* fueron capaces de liberar fago sobre un tapiz de cepa sensible (PA01), esto indica que aún poseen el profago FIZ15.

TABLA 6. LIBERACION ESPONTANEA DE FAGOS POR LAS LISOGENAS.

CEPA	PRODUCCION DE PLACA LITICA*
PA01	-
PIZ15	+
<i>con1</i>	+
<i>con2</i>	+
<i>con1d</i>	+
<i>con2d</i>	+

- * + = Presencia de placa lítica.
- = Ausencia de placa lítica.

Una propiedad de las lisógenas es que son inmunes a la superinfección por fagos homólogos de la misma inmunidad, por esta razón se midió la eficiencia de plaqueo del fago FIZ15 sobre las cepas *con* y *cond*.

En la Tabla 7 se observa que el fago FIZ15 plaqueó bien sobre la cepa PA01, pero fue incapaz de formar placas sobre las cepas PIZ15, *con* y *cond*. Esto confirma, junto con el experimento anterior, que estas últimas son lisógenas.

TABLA 7. EFICIENCIA DE PLAQUEO DEL FAGO FIZ15 SOBRE PA01 Y SUS LISÓGENAS.

CEPA	EDP
PA01	1.0
PIZ15	$< 1.2 \times 10^{-5}$
<i>con1</i>	$< 1.2 \times 10^{-5}$
<i>con2</i>	$< 1.2 \times 10^{-5}$
<i>con1d</i>	$< 1.2 \times 10^{-5}$
<i>con2d</i>	$< 1.2 \times 10^{-5}$

Se tituló el fago FIZ15 sobre PA01 (8×10^8 ufp/ml) y sobre las distintas lisógenas. Se tomó como 1.0 la eficiencia de plaqueo en PA01.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La virulencia bacteriana generalmente se define como la capacidad que tienen las bacterias para multiplicarse en un hospedero y producirle una enfermedad o incluso la muerte (43)

La adhesión es uno de los factores de virulencia más importantes de *P. aeruginosa* ya que le permite asociarse a su hospedero, para después invadirlo y multiplicarse en él para producirle una enfermedad local y/o sistémica (43).

Es importante mencionar que la presencia de profagos en las cepas bacterianas puede modificar algunas propiedades de virulencia mediante conversión lisogénica. La conversión lisogénica se produce cuando uno o más genes del profago confieren nuevas propiedades al hospedero (19).

Vaca *et.al* (61) han reportado un ejemplo de conversión lisogénica en *P. aeruginosa* producida por el fago FIZ15 que al lisogenizar a la cepa PAD1 (Lisógena PIZ15), le confiere los fenotipos SM^R, aumento en la adhesión a CBH, resistencia a SHN y resistencia a la superinfección por el mismo fago.

Para obtener fagos mutantes deficientes en la promoción de la conversión lisogénica, se mutagenizó a PIZ15 con EMS, obteniéndose las mutantes *con*, a las cuales se les midió la adhesión a CBH. La

adhesión de *con1* fue similar a la de PA01 y la adhesión de *con2* fue similar a la de PIZ15 (Tabla 1).

Para determinar dónde se encontraba la mutación *con* se aisló el fago de cada una de estas mutantes y se lisogenizó nuevamente a la cepa PA01, a éstas últimas lisógenas, llamadas *cond*, se les midió la adhesión a CBH. La adhesión de la lisógena *con1d* fue bastante similar a la de PA01 y la adhesión de la lisógena *con2d* fue similar a la de PIZ15 (Tabla 2).

Estos resultados sugieren que la mutante *con1* y la lisógena *con1d* contienen un profago mutante deficiente en la promoción de la conversión lisogénica, ya que éste es incapaz de aumentar la adhesión de su lisógena a CBH (fenotipo conferido por el profago FIZ15 silvestre), mientras que la mutación *con2* muy probablemente se localiza en el cromosoma bacteriano, ya que el fago aislado de esta lisógena se comporta como el tipo silvestre FIZ15 cuando lo reintroducimos en PA01 por lisogenización.

Por otra parte, el incremento en la adhesión de las cepas *con* y *cond* a CBH (Tabla 2) causado por el KCl, creemos que se debe a que el ión potasio altera el gradiente electroquímico de la membrana al provocar la salida de protones, lo que quizá origina un rearrreglo de los componentes de la membrana externa, que conduce a una mayor exposición de los sitios de enlace de la superficie bacteriana (Adhesinas) a los receptores celulares

epiteliales. Sin embargo el efecto del potasio aparentemente no está relacionado con la presencia o ausencia del profago FIZ15 o si éste se encuentra mutado o no, ya que este ión estimula de igual manera tanto a la cepa silvestre PA01 como a las lisógenas PIZ15, *con* y *cond*. Así mismo el efecto estimulador del potasio sobre la adhesión de estas cepas se vio inhibido cuando a las cepas bacterianas se les desacopló la fosforilación oxidativa con el 2,4 D (Tabla 3), el cual es un compuesto que rompe el gradiente electroquímico de la membrana por introducción de protones y con ello quizá origina un rearrreglo de los componentes de la membrana externa, provocando probablemente la menor exposición de los sitios de unión bacteria-célula.

Por ser la resistencia al SHN otro de los fenotipos conferidos por el profago FIZ15 a su lisógena, se determinó el efecto bactericida del SHN sobre las cepas *con* y *cond*.

Las cepas *con1* y *cond* presentan una sobrevivencia similar a la de PA01 y las cepas *con2* y *con2d* presentan una sobrevivencia similar a PIZ15. Esto sugiere fuertemente que la mutación *con1* se encuentra sobre el cromosoma del fago ya que no fue capaz de aumentar la resistencia al suero en esta lisógena, y la mutación *con2* se encuentra sobre el cromosoma bacteriano ya que el profago de la lisógena *con2* se comporta como el tipo silvestre FIZ15.

Como se mencionó anteriormente el fago FIZ15 al lisogenizar a la cepa PA01 le causa un cambio superficial a nivel del propio receptor para el fago, el cual le confiere una resistencia a la superinfección por el mismo fago. Para saber si persiste este cambio superficial en las cepas *con* y *cond*, se midió la adsorción del fago FIZ15 a la cepa silvestre PA01 y a las lisógenas PIZ15, *con* y *cond*.

El fago FIZ15 fue incapaz de adsorberse a las cepas *con2* y *con2d* (Tabla 5), así mismo fue incapaz de multiplicarse en ellas (Tabla 7), lo que indica que en estas lisógenas aún persiste el cambio superficial conferido por el profago FIZ15, de tal manera que estas lisógenas son resistentes. Por el contrario en las cepas *con1* y *cond*, el fago si se adsorbe (Tabla 5), de modo que la incapacidad de crecimiento en ellas (Tabla 7) se debe no a la resistencia si no a la inmunidad conferida por el profago FIZ15; el cual, por supuesto, ya no modifica su propio receptor.

BIBLIOGRAFIA

1. ARP, L.H. 1988. Bacterial infection of mucosal surfaces: an overview of cellular and molecular mechanisms. In virulence mechanisms of bacterial pathogens. JAMES, A.R.(Ed). American Society For Microbiology pp 3-19.
2. BEACHEY, H.E., 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. Rev. Infect. Dis. 143:325-343.
3. BERKA, R.M. & M.L. VASIL, 1982. Phospholipase C (heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*; purification and preliminary characterization. J. Bacteriol. 152:239-245.
4. BODEY, G. P; R. BOLIVAR; V. FAINSTEIN & L. JADEJA, 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 5:279-313.
5. CARLSON, D.M. & L.W. MATHEWS, 1966. Polyuronic acids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Biochemistry 5:2817-2822.
6. CERVANTES-VEGA, C.; J.CHAVEZ & M.G.RODRIGUEZ, 1986. Antibiotic susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie Van Leeuwenhoek 52:319-324.
7. CERVANTES-VEGA, C.; J. CHAVEZ; N.A. CORDOVA; P. MORA & J.A. VELASCO, 1986. Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Microbios 48:159-163.
8. CHAKRABARTY, A. M., 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. Ann. Rev. Genet. 10:7-30.
9. DIMITRACOPOULOS, G. & P.F. BARTELL, 1980. Slime glycoproteins and the pathogenicity of various strains of *Pseudomonas aeruginosa* in experimental infection. Infect. Immun. 30:402-408.
10. ENRIQUEZ, E.F., 1992. Caracterización genética parcial del bacteriofago F1215 de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de licenciatura en Biología, ENEP Iztacala UNAM.
11. FICK, R.B.; R.S. BALTIMORE; J.B.L. GEE & H.Y. REYNOLDS, 1982. Characterization of an IgG protease produced by mucoid (M) and non-mucoid (NM) strains of *Pseudomonas aeruginosa* (abstract No. 374) En: Program & abstracts of the 22nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, D. C.; American Society for Microbiology.
12. FREI, E.R.; H. LEVIN; G.P. BODEY; E.E. MORSE & E.J. FREIREICH, 1965. The nature and control of infections in patients with acute leukemia. Cancer Res. 25:1511-1515.

- 13 GIBBONS, R.J.; J.VAN HOUTE, 1980. Bacterial adherence and the formation of dental plaques. En E.H.BEACHEY (Ed) Bacterial adherence. CHAPMAN & HALL. London; Methuen New York, pp 60-104.
14. GRAY, G.L.; R.M. BERKA & M.L. VASIL, 1981. A *Pseudomonas aeruginosa* mutant nonderepressible for orthophosphate-regulated proteins. J. Bacteriol. 147:675-678.
15. HOIBY, N., 1977. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C Suppl. 262.
16. HOLDER, I.A.; R.C. WHEELER & T.C MONTIE, 1982. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: Animal protection studies. Infect. Immun. 35:220-228.
17. HOLLOWAY, B. W. & G.N. COOPER, 1962. Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 84:1321-1324.
18. HOLLOWAY, B.H., 1974. Genetic organization of *Pseudomonas*. En CLARKE, P.H. & M.H. RICHMOND (eds), Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*, Wiley, London. pp. 63-82.
19. HOLLOWAY, B.W. & V. KRISHNAPILLAI. 1975. Bacteriophages and bacteriocytes. En P.H. CLARKE and M.H. RICHMOND (ed) Genetics and biochemistry of *Pseudomonas*. JOHN, W. pp. 99-132.
- 20 JAWETZ, E. 1987. Microbiología Médica. 12a ed. El Manual Moderno. México. pp 253-255.
21. JENSEN, S.E.; I.T. FECYCZ; G.W. STEMKE & J.N. CAMPBELL, 1980. Demonstration of a cell-associated, inactive precursor of an exocellular protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Can. J. Microbiol. 26:87-93.
22. JOHANSON, V.G. & D.E. WOODS, 1979. Association of respiratory tract colonization with adherence of Gram-negative bacilli to epithelial cells. J. Infect. Dis. 139:667-673.
23. JOHNSON, M.K. & D. BOESE-MARRAZZO, 1980. Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 28:1028-1033.
24. KAWAHARAJO, K.; C. ABE; J.Y. HOMMA; M. KAWANE; T. GOTOH; N. TANAKA & K. MORIHARA, 1974. Corneal ulcers caused by protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 44:435-442.
25. KAWAHARAJO, K.; J.Y. HOMMA; Y. AOYAMA; E. OKADA & K. MORIHARA, 1975. In vivo studies on protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 45:89-100.
26. KURIOKA, S. & P.V. LIU, 1967. Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase activity. J. Bacteriol. 93:670-674.

27. KUZIO, J. & A.M. KROPINSKY, 1983. O-antigen conversion in *P. aeruginosa* PA01 by bacteriophage D3. J. Bacteriol. 155:203-212.
28. LEPLA, S. H., 1976. Large-scale purification and characterization of the exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 14:1077-1086.
29. LIU, P. V., 1979. Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. En DOGGETT, R. G. (ed.) *Pseudomonas aeruginosa*. Academic Press. pp. 102-135.
30. LOWBURY, E.J.L., 1974. Ecological importance of *Pseudomonas aeruginosa*: Medical aspects. En CLARKE, P.H. & M.H. RICHMOND (eds.), *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*. Wiley, London. pp. 91-94.
31. LURIA, S.E., 1977. *General Virology*: 3a. Edición, Ed. JOHN W. & SONS. Nueva York. E.E.U.U. pp. 577.
32. MOLL, A.; P.A. MANNING & K.N. TIMMIS, 1980. Plasmid determined resistance to serum bactericidal activity: A major outer membrane protein, the tra T gene product, is responsible for plasmid specified serum resistance in *Escherichia coli*. Infect. and Immun. 28:359-367.
33. MONTENEGRO, M.A.; D. BITTER; J.K. TIMMIS; M.E. MONTENEGRO; F.C. CABELLO; S.C. SABYAL & D.N. TIMMIS, 1985. The tra T gene sequences, serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of *Escherichia coli* and other gram-negative bacterial. J. Gen. Microbiol. 131:1511-1521.
34. MONTIE, T.C.; R.C. CRAVEN & I.A. HOLDER, 1982. Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: Isolation and characterization. Infect. Immun. 35:281-288.
35. MORIHARA, K.; H. TSUZUKI & K. ODA, 1979. Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of human plasma alpha-1 proteinase inhibitor. Infect. Immun. 24:189-193.
36. NAKAHARA, H.; T. ISHIKAWA; Y. SARAI; I. KONDO; H. KOZUKUE & S. SILVER, 1977. Linkage of mercury, cadmium, and arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 33:975-976.
37. NIKAS, T., 1987. Genetic approaches to the study of pathogenesis. 87 ASM annual meeting, Atlanta, GA. USA. pp.132.
38. OLSON, B.; R.A. WINSTEIN; C. NATHAN; W. CHAMBERLIN & S.A. KAVIN, 1984. Epidemiology of endemic *Pseudomonas aeruginosa*: Why infection control efforts have failed. J. Infect. Dis. 150:808-816.

39. ORSKOV, I; F. ORSKOV; B. JANN & K. JANN, 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. Bacteriol. Revs. 41:667-710.
40. PALLERONI, N.J., 1975. General properties and taxonomy of the genus *Pseudomonas*. En CLARKE, P.H. & M.H. RICHMOND (eds.), *Genetics and Biochemistry of Pseudomonas*. Wiley, London. pp.86-94
41. PAVLOSKIS, D. R. & A. H. SHAKELFORD, 1974. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in mice: localization and effect on protein synthesis. Infect. Immun. 9:540-546.
42. POLLACK, M., N.S. TAYLOR & L.T. CALLAHAN III, 1977. Exotoxin production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. immun. 15:776-780.
43. POLLACK, M., 1984. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Infect. Dis. 6:S617-S625.
44. PRUITT, B.A., 1974. Infections caused by *Pseudomonas* species in patients with burns and in other surgical patients. J. Infect. Dis. 130:S8-S13.
45. RABIN, E.R.; C.D. GRAVER; E.H. VOGEL; R.A. FINKELSTEIN & W.A. TUBUSH, 1961. Fatal *Pseudomonas* infection in burned patients. A Clinical, bacteriologic and anatomic study. N. Engl. J. Med. 265:1225-1231.
46. RAMPHAL, R. & G.B. PIER, 1985. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide in adherence to tracheal cells. Infect. Immun. 47:1-4.
47. REYNOLDS, H.Y.; A.S. LEVINE; R.E. WOOD; C.H. ZIERDT; D.C. DALE & J.E. PENNINGTON, 1975. *Pseudomonas aeruginosa* infections: persisting problems and current research to find new therapies. Ann. Inter. Med. 82:819-831.
48. RHAME, F.S., 1980. Ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. En SABATH, L.D. (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers. Bern Stuttgart Vienna. pp. 74-86.
49. RIVERA, M. & M.B. NICOTRA, 1982. *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain. Its significance in adult chest diseases. Am. Rev. Respir. Dis. 126:833-836.
50. SCHARMAN, W., 1976. Formation and isolation of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 93:283-291.
51. SCHARMAN, W.; F. JACOB & J. POSTENDORFEER, 1976. The cytotoxic action of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on human polymorphonuclear leukocytes. J. Gen. Microbiol. 93:303-308.

52. SCHULTZ, D.T. & K.D. MILLER, 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. Infect. Immun. 10:128-135.
53. SCHWARZMANN, S. & J.R. BORING III, 1971. Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 3:762-767.
54. SENSAKOVIC, J. W. & P. F. BARTELL, 1974. The slime of *Pseudomonas aeruginosa*: biological characterization and possible role in experimental infection. J. Infect. Dis. 129:101-109.
55. SUMMERS, A. O. & G. A. JACOBY, 1978. Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 13:637-640.
56. TAYLOR, P.W., 1983. Bactericidal and Bacteriolytic activity of serum against gram-negative Bacteria. Microbiol. Rev. 47:46-83.
57. TAYLOR, P.W., 1988. Bacterial Resistance to complement. In virulence Mechanisms of Bacterial pathogens. JAMES A. ROTH, (ed). American Society for Microbiology. pp 107-116.
58. VACA, S. & C. CERVANTES-VEGA, 1988. Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30:87-90.
59. VACA, S.; G. MARTINEZ, A. CRUZ & J. ESCOBAR, 1988. Decreased sensitivity to phagocytosis and serum bactericidal effect induced by FIZ 15 bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30:277-281.
60. VACA, S.; F. ARGÜELLO; D. ARENAS; R. MORENO & G. MARTINEZ, 1989. Potassium ions stimulate adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Rev. Lat-amer. Microbiol. 31:305-309.
61. VACA, S.; J. ARCE; F. ARGÜELLO; D. ARENAS & G. OLIVER. 1989. FIZ 15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Rev. Lat-amer. Microbiol. 31:1-5.
62. WOODS, D.E.; D.C. STRAUS; W.G. JOHANSON Jr.; V.L. BERR & J.A. BASS, 1980. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. Infect. Immun. 29:1146-1151.
63. ZIERDT, C.H. & R.J. WILLIAMS, 1975. Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis of the pancreas. J. Clin. Microbiol. 1:521-526.