



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

**"RESISTENCIA AL EFECTO BACTERICIDA DEL SUERO HUMANO
NORMAL EN *Pseudomonas aeruginosa*, MEDIADA POR
CONVERSION LISOGENICA"**

T E S I S

Que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGIA

presenta

CRUZ HERNANDEZ ANDRES

Los Reyes Iztacala, Edo. de México

1988



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.



ESCUELA NORMAL DE PROFESORES

PROFESIONALES ZACATECAS

ZACATECAS, QUERÉTARO

1954

Gracias a la vida ...

A Felisa, Aurelia y Lino

Agradecimientos :

A Yoncarlino, Maribel, Rosa, Aurelio y Alejandro

Por ser motivo y escuela para la vida.

A la Familia

Por que sabemos que no estamos solos.

A Rocio

Fiat agapimu sagapopoly

*A todos los que se preocuparon y creyeron en mí;
por que me enseñaron a preocuparme y creer en los demás.*

Gracias Maestros

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Bajo la asesoría de M. en C. Sergio Vaca Pacheco y con el apoyo de CONACYT (PCSABNA-020954).

I N D I C E

	Página
I.Introducción	
Generalidades de <u>Pseudomonas aeruginosa</u>	2
Estructuras del LPS.....	3
Activación de las vías clásica y alterna del complemento del suero humano.....	5
Mecanismo de acción bactericida y bacteriolítica.....	7
Secuencia de eventos después de la exposición al suero.....	8
Bacteriófagos.....	10
II.Antecedentes.....	14
III.Hipótesis y objetivo.....	18
IV.Material y métodos	
Soluciones y medios de cultivo.....	19
Cepas.....	20
Fagos.....	20
Obtención de lisados de alto título.....	21
Titulación de lisados.....	21
Mutagénesis con ácido nitroso.....	21
Aislamiento y purificación de fagos.....	22
Prueba de inmunidad para fagos.....	22
Prueba de resistencia al suero.....	22
Adsorción de fagos.....	23
Obtención de una mutante espontánea de PAO1 resistente a un fago.....	23

Obtención de una mutante espontánea de PAO1	
resistente al suero.....	24
V.Resultados.....	26
VI.Discusión.....	40
VII.Conclusiones.....	45
VIII.Perspectivas.....	46
IX.Bibliografía.....	47

*Todo organismo por insignificante,
raro o peligroso que parezca
goza del don más preciado
de todos: LA VIDA*

INTRODUCCION

Generalidades de Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo, patógeno oportunista; que infecta a pacientes inmunodeprimidos, drogadictos, leucémicos, pacientes tratados con inmunosupresores y personas con quemaduras graves entre otros(6,17,38). Es responsable del 10 al 20% de las infecciones nosocomiales(35); en los hospitales se le ha encontrado en las soluciones óticas , colirios , jabones, antisépticos ,lavabos ,material de cirugía y las manos del personal (11,40); y debido a su gran capacidad metabólica se ha reportado que es capaz de sobrevivir y multiplicarse en agua destilada(12).

Casi todas las cepas de Pseudomonas aeruginosa aisladas de pacientes hospitalizados presentan resistencia a uno o varios antibióticos, que esta conferida por la presencia de plásmidos (7,8,19). Este microorganismo es responsable de múltiples padecimientos en humanos, tales como septicemia, infecciones pulmonares, queratitis, sepsis, hemorragias, conjuntivitis y es capaz de causar hasta la muerte(34). Todo esto provocado por los múltiples factores de virulencia que presenta; entre los que destacan: /

FACTOR	EFEECTO
Exotoxina A	Inhibe síntesis de proteínas(46)
Elastasa	Degrada 7 de los 9 componentes del complemento(48)
Proteasas	Destruyen barreras anatómicas(48)
Leucocidina	Degradación de leucocitos(46)
Glucocalix	Evita la fagocitosis por macrófagos(34)
Pili o fimbria	Determinan la adhesión a células bucoepiteliales(47)
Flagelo	Ayuda a la movilidad del organismo, facilitando la invasión del huésped(29)
Lipopolisacárido (LPS)	Resistencia al efecto bactericida del Suero Humano Normal (10,46).

Dado que el LPS es considerado como factor principal para la resistencia al efecto bactericida del Suero Humano Normal(SHN) es necesario conocer la composición de dicha estructura.

Estructura del LPS

Consiste de tres regiones: Lípido A, un oligosacárido denominado "Core" y una cadena de polisacáridos O-específicos (Fig.1).

La región 1 o Lípido A es la parte de la molécula que puede presentar una interacción hidrofóbica con lipoproteínas, esta embebido a la membrana externa de la célula. Consiste de glucosamina-fosfato y ácidos grasos, de los cuales el más abundante es el ácido B-hidroximirístico. Esta región es responsable de las propiedades endotóxicas del LPS.

La región 2 o "Core" está unida al lípido A por medio de un componente carbohidrato; que es típico para las bacterias gram negativas; el ácido 2-ceto-3-desoximannulosuctónico (KDO). Se han descrito tipos diferentes de "Core" a razón de la variación por la síntesis del oligosacárido.

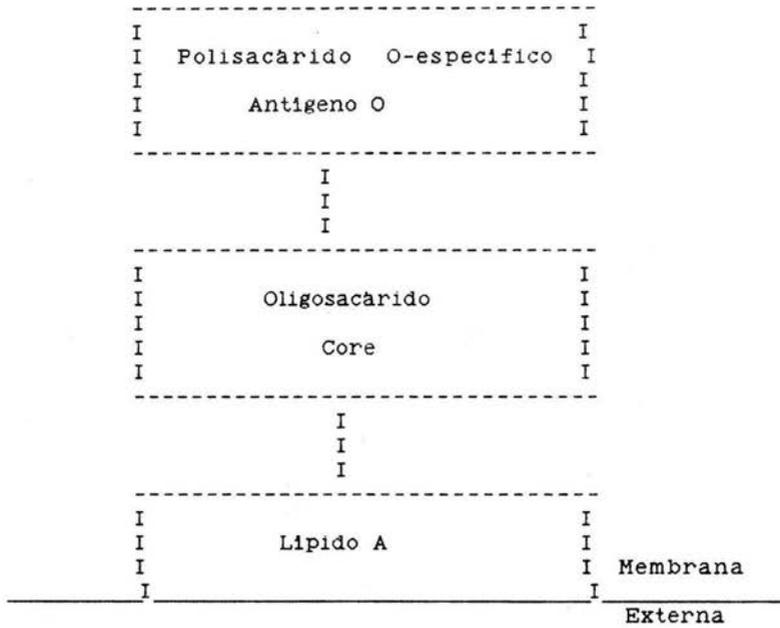


Fig. 1 Diagrama esquemático de la estructura general de un LPS bacteriano (32).

Región 3, polisacárido O-específico o antígeno O consiste de unidades repetidas de oligosacáridos y es esencial en todos los polisacáridos bacterianos. La composición y estructura de la región 3 son la base química de la especificidad serológica de las bacterias gram negativas. La variabilidad estructural incrementa grandemente en los compartimentos más exteriores de la molécula del LPS (24,32,34).

El suero contiene los factores que ayudan a la defensa del hospedero, de los cuales el más importante en la acción bactericida es el complemento, revisaremos su mecanismo de acción.

Activación de la vía clásica y alterna del complemento del suero humano.

El complemento es un sistema secuencial de 9 proteínas séricas, dotadas de actividad enzimática que cumple funciones biológicas importantes, de las cuales la más conocida es la hemólisis y bacteriolisis. Estas funciones pueden seguir dos caminos: la vía clásica en presencia de anticuerpos o la vía alterna en ausencia de los mismos (fig.2).

La vía clásica es iniciada usualmente por una interacción entre complejos antígeno-anticuerpo, que involucran IgM o IgG y C1: este componente del complemento es compuesto por 3 subunidades distintas C1q, C1r, y C1s y circula como un complejo dependiente de calcio. Cambios conformacionales críticos en C1q,

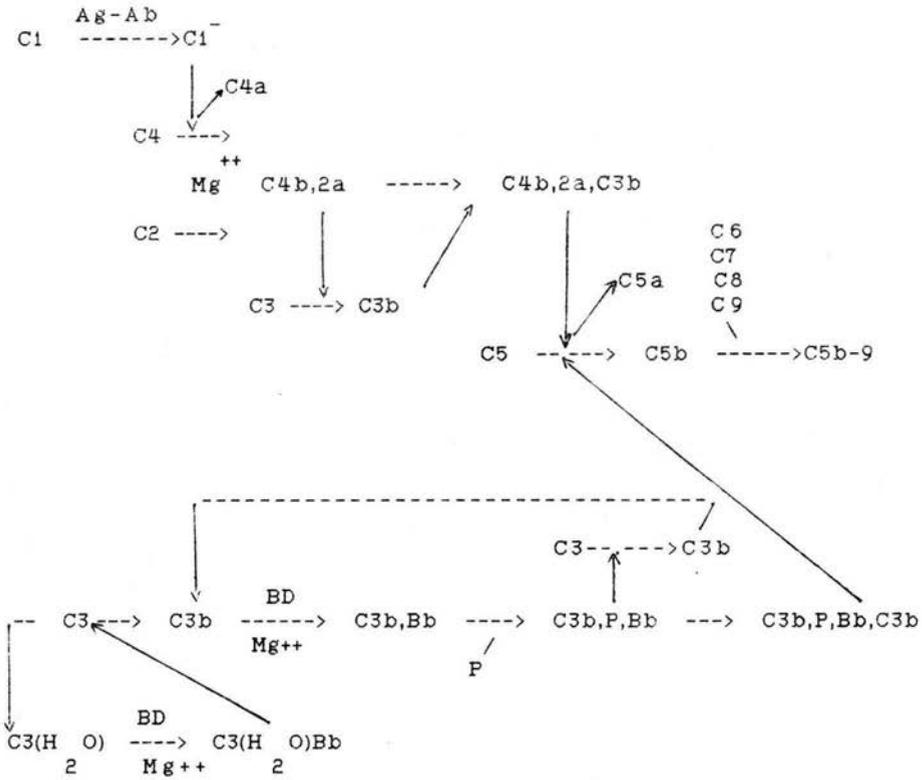


Fig.2 Representación esquemática de la activación de la vía clásica y alterna del complemento (42) .

traen una conversión de las proenzimas C1r y C1s a C1r- y C1s- moléculas con actividad de serin-proteasa. C1⁻ rompe a C4 y C2 para generar la enzima C4b,2a que rompe a la molécula C3.

Por ruptura de C3 se forman los fragmentos C3a y C3b; este último se une al complejo C4b,2a para formar la "convertasa C5" o complejo C4b,2a,3b que rompe a C5 en C5a y C5b provocando además el ensamble de un complejo transmembranal estable que incluye a C5b, C6, C7, C8 y C9; conocido también como MAC (Complejo de ataque a la membrana).

La vía alterna es activada cuando el factor D se presenta en una forma activa en la sangre, rompe las moléculas del factor B que se asocian a C3 en presencia de magnesio, formando el complejo inestable C3b, Bb que también actúa sobre C3. Este complejo puede unirse al factor P (properdina) en presencia de magnesio para formar un complejo más estable al cual puede unirse un fragmento C3b adicional y dar origen a la "convertasa C5 de la vía alterna", compuesta por el complejo C3b, P, Bb, C3b. Rompe a C5 que se ensambla con C6, C7, C8 y C9 y se forma en complejo transmembranal estable C5b, C6, C7, C8 y C9 (42).

Mecanismo de acción bactericida y bacteriolítica.

Se ha sugerido que la depositación de las proteínas MAC (complejo de ataque de la membrana), sobre la superficie de las bacterias sensibles es la causa principal de la muerte por suero y es prerrequisito para mediar la bacteriolisis por lisozima.

El MAC es un complejo estable (P.M. 2,050 Kd), de las proteínas terminales del complemento y su fórmula es $(C5b,C6,C7,C8,C9)_2$ ó $(C5b-C9)_2$. Puede resultar de la activación de la vía clásica o de la vía alterna; ambas vías pueden ser activadas simultáneamente. El ensamble del MAC involucra la transformación de moléculas hidrofílicas dentro de un complejo, capaz de integrarse dentro de las bicapas lipídicas.

El complejo es un cilindro de 150 a 160 Å de largo (fig.3) con un diámetro interno de 100 Å que está "rodeado" por un anillo externo cuyo diámetro es de 200 a 220 Å.

Se inserta en la membrana hidrofóbica interna, se conduce como complejo proteínico integral de la membrana, penetrando a través de ella para formar un canal que destruye la integridad membranar. El canal puede incrementar el paso de iones a través de la bicapa (40).

Secuencia de eventos después de la exposición al suero.

Periodo latente: los elementos del MAC se ensamblan en el sitio de la lesión primaria, en las membranas externa e interna.

Inhibición de la síntesis de macromoléculas: Se liberan las enzimas fosfatasa alcalina y 5' nucleotidasa, asociadas con el espacio periplásmico, esta liberación es independiente de la formación del MAC.

Integración del MAC: en área de la bicapa fosfolipídica

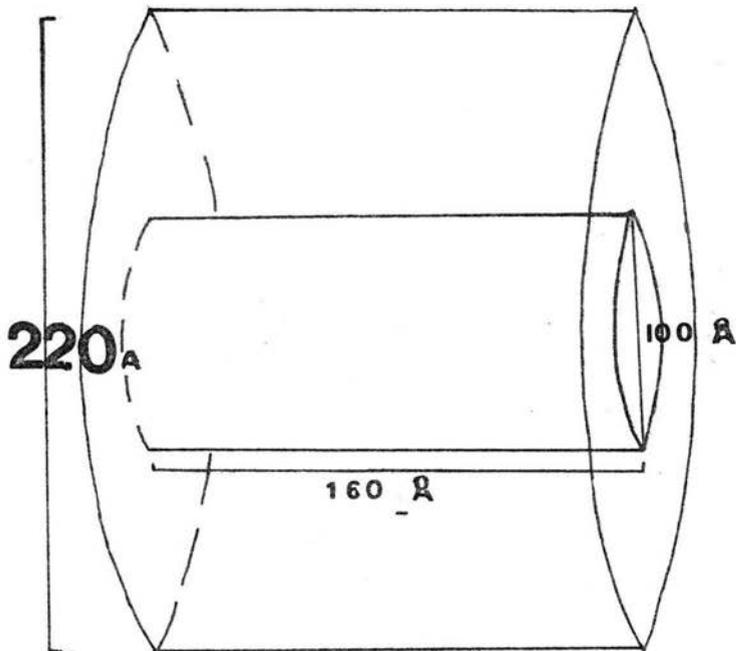


Fig.3 Esquema representativo de la estructura formada por el
MAC

externa, que son perforadas y excluidas por hidrólisis del peptoglicano debido a la acción de lisozima (Esto provoca el efecto letal del complemento).

Rompimiento de la membrana citoplasmática, inhibición del transporte de azúcares, aminoácidos y algunos iones. El suero puede funcionar por la disipación del potencial eléctrico de la membrana. MAC se inserta a través de la doble membrana de la bacteria haciendo un canal transmembranal, alterando las propiedades de la membrana y provocando la muerte celular (42).

Hasta aquí el mecanismo de defensa del hospedero, ahora revisaremos algunos aspectos relacionados con el ciclo de vida de los virus bacterianos.

Bacteriófagos

Se han detectado dos tipos de bacteriófagos en referencia a su ciclo de vida : líticos y temperados (fig 4).

En el ciclo de vida lítico existen 3 pasos secuenciales:

1. Adsorción: El fago se fija a la bacteria reconociendo receptores específicos en la superficie bacteriana (23,24).

2. Periodo de latencia o fase vegetativa: Poco después de la inyección o entrada del material genético viral, se inicia la expresión de los genes tempranos del fago que codifican para proteínas involucradas principalmente en el cese de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas bacterianas y en la síntesis de los ácidos nucleicos virales. La síntesis de estos ácidos

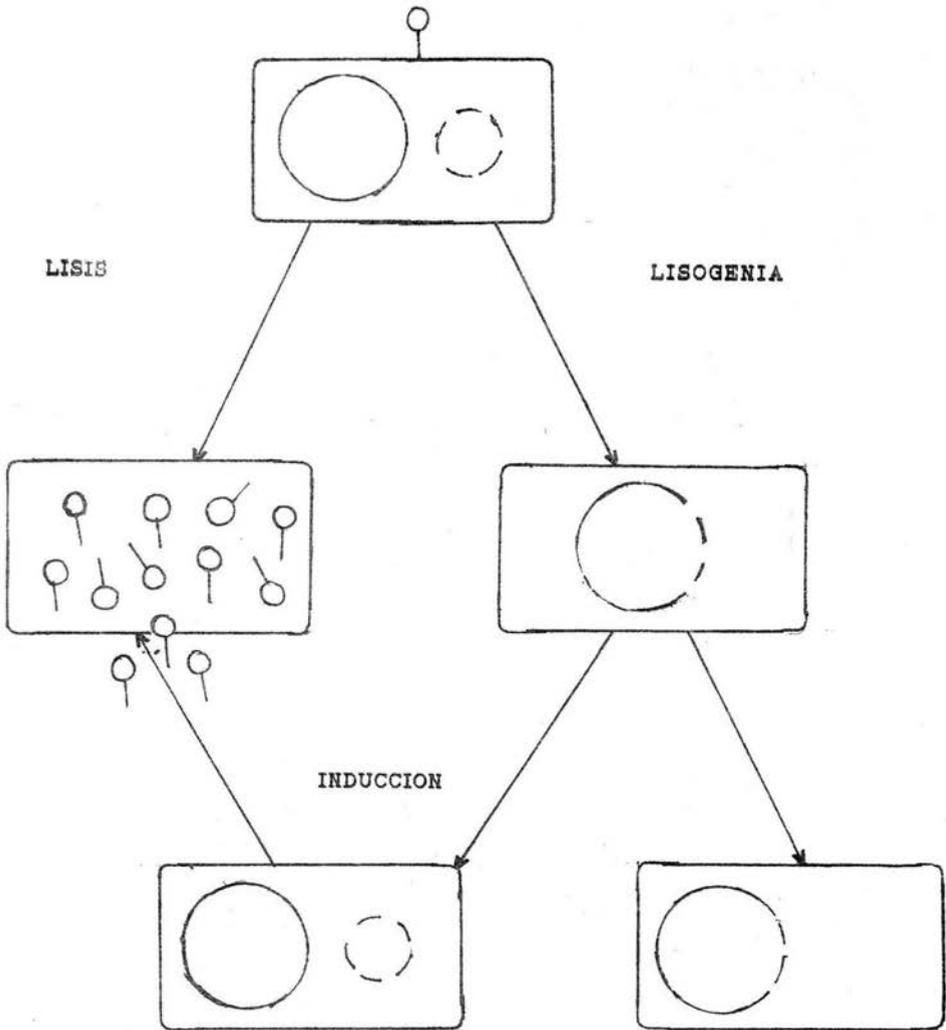


Fig.4 Ciclo de vida de los bacteriófagos líticos y temperados

nucleicos coincide con la transcripción de los genes tardíos del fago, involucrados en la síntesis de proteínas estructurales fágicas, para de esta manera generar nuevas partículas infecciosas.

3.Lisis:Rompimiento de la célula por acción de enzimas líticas codificadas por genes virales tardíos, liberándose las nuevas partículas infecciosas (26).

En el ciclo de vida de un fago lisogénico o temperado, éste infecta a la bacteria de una manera similar al fago lítico, sin embargo, una vez inyectado el ácido nucleico éste puede incorporarse al cromosoma bacteriano o mantenerse como plásmido en el interior celular recibiendo el nombre de profago y la cepa portadora es una lisógena (41). Esto es posible gracias a que reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis por acción de una proteína con actividad represora codificada por el genoma viral(Lisogenia),aunque se debe considerar que un estímulo externo como la luz ultravioleta puede provocar que el fago entre al ciclo lítico (Inducción) a razón de la inactivación del represor,y termine lisando a la bacteria produciendo nuevas partículas infecciosas (41).

En Pseudomonas aeruginosa se ha encontrado una frecuencia de lisogenia, en cepas clínicas, cercana a 100% (20). Se desconoce que factores determinan la alta frecuencia de lisogenia en esta bacteria, sin embargo se ha detectado que algunas cepas lisógenas; aparte de la habilidad que tienen para producir fagos

y la inmunidad a la super infección por fagos homólogos, presentan una serie de modificaciones conocidas como conversión lisogénica, en la cual la bacteria lisogena adquiere una nueva serie de características fenotípicas que son codificadas por el genoma del fago (20).

ANTECEDENTES

La resistencia al suero en bacterias, consiste en la disminución de la sensibilidad al efecto del mismo en ensayos que contienen cantidades excesivas del sistema bactericida (42). Se ha establecido que el suero normal de animales presenta un efecto bactericida sobre varias especies bacterianas como: Escherichia coli , Salmonella Typhi , Neisseria gonorrhoeae, Shigella dysenteriae , Klebsiella pneumoniae y Pseudomonas aeruginosa entre otros. 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 (28,34).

Los plásmidos; aparte de conferir la resistencia a antibióticos como estreptomycin, ampicilina y 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, tal es el caso de los plásmidos R1, R100 y R6,5 que traen consigo modificaciones al LPS y la aparición de proteínas nuevas en la membrana externa (27,31,36,37). El plásmido Col V, no favorece la resistencia a antibióticos, pero codifica para una proteína (Colicina V) de la membrana externa, responsable de la resistencia al efecto bactericida del suero de conejo, suero de cobayo y suero humano normal en cepas de E.

E.coli y Salmonella typhimurium portadores de Col V (5,27,31, 36,37.)

De estos plásmidos que confieren resistencia al suero el más estudiado es R6,5 y uno de sus productos: la proteína tra T (2,27,28,42) que se encuentra en la membrana externa, probablemente como lipoproteína unida al peptidoglucano con una amplia distribución en la superficie de la célula bacteriana. La proteína tra T reduce la unión de los elementos del complemento por la interferencia en el ensamble del MAC, este mecanismo de resistencia es sugerido también para proteínas como colicina V y es válido para E.coli y los géneros Salmonella, Shigella y Klebsiella (28). La proteína tra T disminuye además la fagocitosis por macrófagos de ratón (2).

Otro factor que se sugiere contribuye a la resistencia al suero es el antígeno capsular K1 codificado por algunas cepas de E.coli y que disminuye además la fagocitosis por macrófagos de ratón (1,28).

Para la resistencia al suero por bacteriófagos solo conocemos un trabajo, donde al lisogenizar a la cepa K-12 de E.coli con el fago λ se incrementa la resistencia al efecto bactericida (30).

Para Pseudomonas aeruginosa han sido elaborados trabajos para describir el efecto del suero en cepas clínicas y caracterizar el comportamiento con respecto al suero según el fenotipo de dichas cepas (18,45). Se encontró que la estructura

que contribuye a la resistencia al suero es el LPS; de esta manera se ha evaluado como factor de virulencia bacteriano (10), determinando así que cambios en el LPS traen consigo cambios en la sensibilidad al efecto del suero (15,38,39)

En nuestro laboratorio hemos encontrado, que la presencia de fagos en cepas de Pseudomonas aeruginosa manifiesta cambios con respecto a una cepa libre de fagos; de esta manera encontramos que el fago FIZ15 (Fago de Iztacala # 15) le confiere a la cepa PAO1 (libre de fagos, estudiada bioquímica y genéticamente y de uso internacional) un incremento en la movilidad y la adhesión a células bucoepiteliales humanas al lisogenizar dicha cepa (3). También encontramos que incrementa la resistencia a fagocitosis por macrófagos de ratón, pues los valores de fagocitosis de la cepa PIZ15 (Lisógena para el fago FIZ15) se ven disminuidos hasta un 50% con respecto al valor de PAO1 (3). Debido a que el complemento participa en la fagocitosis por macrófagos, como en la muerte por suero (42).

*Si le das un pez a un hombre
le darás de comer un día,
pero si le enseñas a pescar
comerá toda su vida.*

Proverbio chino.

HIPOTESIS

¿El fago FIZ15 aumenta la resistencia al efecto bactericida del Suero Humano Normal, al lisogenizar a la cepa PAO1?

OBJETIVO

Conocer el fenómeno de resistencia al efecto bactericida del suero humano en Pseudomonas aeruginosa por efecto de la conversión lisogénica, mediada por el fago FIZ15 .

Para abordar estos cuestionamientos mediremos la sobrevivencia al efecto del SHN de la lisógena FIZ15 comparativamente a la cepa PAO1. Si FIZ15 muestra un incremento en la resistencia al efecto del SHN, entonces la siguiente etapa sería tratar de determinar si el incremento se debe a un cambio superficial inducido por FIZ15.

MATERIAL Y MÉTODOS

Soluciones y Medios de Cultivo

CN: Caldo Nutritivo.

(Caldo Nutritivo Bloxon 8 g., agua destilada 1000 ml.)

AN: Agar nutritivo

(CN. +Agar bacteriológico 1.5%)

AS: Agar suave 0.6%

(Agar bacteriológico 6g, Peptona de caseína Bloxon 10g, NaCl Baker 2.5g y agua destilada 1000 ml.)

CST: Caldo de Soya y Tripticasa

(Caldo de Soya y Tripticasa Bloxon 30g y agua destilada 1000 ml.)

BA: Buffer ácido.

(Sulfato de Magnesio 40 mM, Acetado de sodio 0.25 M, pH 4.25)

NaNO₂ : Nitrito de sodio Baker 35 mg/ml

SM:

(Gelatina 0.5g, Cloruro de sodio 5.85g y agua destilada 480.5 ml. ajustando a pH 7.4, se esterilizó y agregó 4.5ml de TRIS 1M pH 7.4 y 2.5 ml de Sulfato de magnesio 1M).

PBS: Buffer de Fosfatos.

(60 ml. de KH₂PO₄ 150 mM , 380 ml. de Na₂HPO₄ , 440 ml de NaCl 145 mM, ajustando a pH 7.2)

Cepas

PAO1

Cepa control sin fagos donada por E. W. Holloway, Monash University, Australia .

FIZ15

PAO1 lisogenizada con el fago FIZ15

PAO1/FIZ15

Mutante espontanea PAO1 resistente al fago FIZ15 c

PAO1-Ser II

Mutante espontanea PAO1 resistente al efecto bactericida del suero.

PAO1 (D)

3

PAO1 lisogenizada con el fago D
3

Fagos

D

3

Bacteriófago temperado de Pseudomonas aeruginosa con receptor antígeno-O específico, donado por B.W.Holloway, Monash University, Australia.

D c

3

Mutante deficiente en represión, obtenido por mutagénesis del fago D con HNO₂ ,
3 2

FIZ15

Bacteriófago temperado obtenido a partir de una cepa clinica de P. aeruginosa

FIZ15c

Mutante deficiente en represión, obtenido por mutagénesis del fago FIZ15 con HNO₂
2

Para cumplir con los objetivos planteados se realizó la siguiente metodología:

Obtención de lisados de alto título

Se mezclaron 0.3 ml. de cepa indicadora (PAO1) crecida durante la noche en CN a 37 C más 0.1 ml. de CaCl 1 M , más una placa del fago en un volumen de 10 ml. de CN. Se incubó la mezcla a 37 C con agitación hasta lisis (4-5 horas). Se centrifugó a 15000 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante para eliminar residuos de lisis y se almacenó en tubo estéril a 4 C (Se obtuvieron lisados con títulos de 10^{10} y 10^{11} ufp).

Titulación de lisados.

Se diluyeron los lisados en SM (10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8}), se mezclaron 0.1 ml. de la dilución de fagos más 0.1 ml. de bacteria indicadora crecida durante la noche a 37 C en CN, se agragaron 3 ml. de AS formando un tapiz sobre una caja de AN, se incubó a 37.C y se contó el número de ufp (Unidades formadoras de placa) relacionando con el factor de dilución.

Título (ufp/ml): No. de placas X 10^x X Factor de dilución.

Mutagénesis con ácido nitroso.

Se mezclaron volúmenes de BA, solución de fagos con alto título y nitrito de sodio fresco en proporciones 9:1:1 respectivamente, en tubo de ensayo estéril, se agitó e inmediatamente se extrajo una alícuota y se diluyó en SM más TRIS pH 7.7 0.1M para detener la reacción. Se repitió el procedimiento a los 10, 20 y 30 minutos. Se prepararon diluciones y se titularon los fagos

sobrevivientes. Por último se calculó la fracción sobreviviente:

Fracción Sobreviviente = Fagos a t / fagos iniciales.

Aislamiento y purificación de fagos.

Con un palillo estéril se picó el centro de una placa de fagos y se hizo un rayado suave sobre una caja de petri con AN, se mezclaron 0.1 ml de cepa indicadora más 3 ml de AS. La mezcla se esparció suavemente, se dejó solidificar y se incubó a 37 °C para obtener placas aisladas. Este procedimiento se repitió 3 veces mínimo hasta comprobar el fenotipo del fago, tomando una placa aislada en cada repetición.

Prueba de inmunidad para fagos.

Se mezcló 0.1 ml. de una solución con un título de 10^5 fagos y 0.1 ml. de bacterias, crecidas durante la noche en CN, se agregaron 3 ml. de AS, se mezcló y se vació sobre una caja de petri con AN para formar un tapiz. Se incubó 18 h a 37 °C y se contó el número de ufp que aparecen incluyendo un control con PAO1.

(Un fago no puede formar placas en su lisógena por que esta produce un represor citoplasmático que evita la infección por otro fago una vez que ha sido lisogenizada)

Prueba de resistencia al suero.

Se tomó 10 ml. de bacterias en fase exponencial (5×10^8 células/ml.) obtenidas de cepas crecidas durante la noche en CST, se lavaron 2 veces y se diluyeron 1/10 con PBS (5×10^7 bacterias/ml.), se mezclaron 0.1 ml de bacterias con SHN fresco en concentraciones de 0,75 y 80% a un volumen final de 4 ml. con PBS. Las mezclas se incubaron a 37 °C con agitación durante 3

horas, se diluyó y se determinó el número de ufc (Unidades formadoras de colonia) sobrevivientes por cuenta viable en AN. El % de sobrevivencia se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de Sobrevivencia} = \frac{\text{ufc en el tubo con suero}}{\text{ufc en el tubo sin suero}} \times 100$$

Adsorción de fagos.

Para medir la adsorción de los fagos a las bacterias se mezclaron 2.5×10^8 bacterias de fase exponencial en CN, con 10^5 fagos (Multiplicidad de infección = 0.05) en un volumen total de 0.6 ml. A diferentes tiempos (0,5 y 12 minutos) se tomaron alícuotas de 50 μ l y son diluidas en una mezcla de 0.45 ml. de CN y 0.1 ml. de cloroformo para lisar las bacterias no infectadas, se diluyó, se tituló e incubó a 37 °C para contar el número de ufp (fagos no adsorbidos) y calcular la adsorción con la fórmula:

$$\% \text{ de adsorción} = 1 - \left(\frac{\text{Fago libre}}{\text{Fago total}} \right) \times 100$$

Obtención de una mutante espontánea de PAO1 resistente a un fago.

Se espatularon 10^9 fagos (FIZ15c o D c) sobre AN dejando secar la caja, enseguida se espatularon 10^7 bacterias de fase exponencial, se dejó secar y se incubó a 37 °C. Se Purificaron por estria de 10 a 15 colonias de bacterias sobrevivientes y se incubó, repitiendo el aislamiento de colonias tres veces. Se comprobó el fenotipo de resistencia al fago por la incapacidad de formación de placas de lisis. Los candidatos a mutantes se picaron sobre un tapiz de PAO1 para eliminar la posibilidad de que fueran lisógenas, en cuyo caso se observaría un halo de lisis al rededor de la colonia en

el tapiz .No se obtuvieron lisógenas entre los candidatos debido a que el fago que se usó para seleccionar las mutantes es incapaz de lisogenizar (Fago mutante de placa clara).

Obtención de una mutante espontánea de PAO1 resistente al suero

7

Se mezclaron 10 bacterias con SHN al 80% en PBS y se incubó a 37 C con agitación durante 12 horas. Al día siguiente se tomó una alícuota y se mezcló en SHN al 80 % en PBS. La mezcla se incubó con agitación durante 12 horas. Se repitió el procedimiento una vez más para finalmente obtener colonias aisladas por estria en AN, las cuales fueron purificadas por estria 3 veces. Por último, se confirmó el fenotipo resistente al suero utilizando el ensayo descrito anteriormente.

*"Nunca te enorgullezcas de los frutos de tu inteligencia.
Solo eres dueño del esfuerzo que pusiste en su cultivo".*

Jacinto Canek.

RESULTADOS

Fagocitosis por macrófagos de ratón.

Como se mencionó en los antecedentes, el bacteriófago FIZ 15 incrementa la resistencia a la fagocitosis, cuando se encuentra como profago en la cepa PAO1.

En la tabla 1 se observan los valores de fagocitosis por macrófagos de ratón, se nota un decremento en los valores para la lisogena PIZ 15 de hasta un 50% con respecto a la cepa patrón, sin fagos, PAO1. Este cambio en la resistencia a la fagocitosis por macrófagos sugiere un cambio en la resistencia al efecto bactericida del SHN, es sabido que el complemento participa en ambos procesos de manera determinante (1.2.42)

Prueba de resistencia al suero para PAO1 y PIZ 15.

Los datos para caracterizar la resistencia al efecto bactericida del SHN para las cepas PAO1 y PIZ15 se reportan en la Tabla 2, como % de sobrevivencia. Se observa que la lisogena PIZ15 presenta un incremento; en la resistencia al efecto bactericida del suero; de 5 y 20 veces (aproximadamente) a las concentraciones de 75 y 80% respectivamente, con referencia a la cepa patrón, coincidiendo con la hipótesis planteada. La siguiente pregunta que abordamos fue conocer a que nivel es el cambio inducido por el fago FIZ15 sobre PAO1.

Prueba de inmunidad para fagos.

Los resultados de la tabla 3 nos muestran que los fagos FIZ 15 y D3 plaquean de una manera óptima sobre la cepa PAO1, libre de

TABLA 1

Fagocitosis por macrófagos de ratón.

Cepa	% Fagocitosis
PAO1	56.7 ± 6 (4)
PIZ 15	29.4 ± 4 (4)

Se mezclaron 2×10^6 macrófagos peritoneales de ratón con 2×10^6 bacterias en un volumen final de 2 ml. Después de incubar por 1 hora con agitación, las mezclas fueron centrifugadas y el número de bacterias sobrevivientes se calculó por cuenta viable. (Tomada de referencia 3.)

TABLA 2

Resistencia al efecto bactericida del SHN de las cepas PAO1 y PIZ 15.

Cepa	% de Supervivencia	
	75% SHN	80% SHN
PAO1	9.3 ± 1.3	1.0 ± 0.1
PIZ 15	57.9 ± 0.1	20.7 ± 1.3

Se mezclaron 10^7 bacterias de fase exponencial con SHN ajustando a 4 ml. con PBS, se incubó durante 3 hrs., se diluyó y espatuló para calcular las ufc. Los datos se reportan en % de supervivencia.

TABLA 3

Prueba de inmunidad para los fagos FIZ15 y D3

Cepa	Fago	
	FIZ 15	D 3
PAO1	+	+
PIZ 15	-	-
PAO1(D3)	-	-

El ensayo consiste en mezclar 10^5 fagos con 10^{10} bacterias
 incubar a 37°C y contar las ufp. El simbolo + significa 10^3 - 10^4
 ufp. y - significa ausencia de ufp.

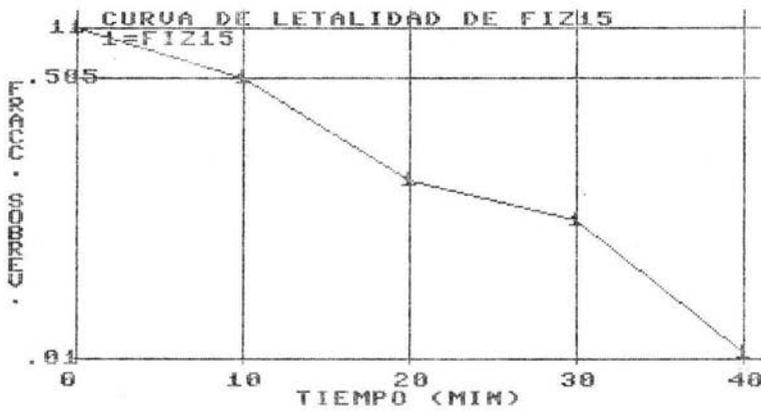
fagos, no así sobre las lisógenas FIZ15 y PAO1(D₃), donde no aparecieron ufp de ninguno de los dos fagos sobre su lisógena y la del otro. Esto plantea dos opciones: Una es que compartan la la misma inmunidad, es decir, el mismo represor actúe sobre ambos fagos y la otra es que compartan un mismo receptor los fagos, conociendo que el fago D₃ se adsorbe específicamente al antígeno-O (23).

Una forma de probar el cambio ocasionado por el profago a nivel del receptor es midiendo la eficacia que tengan los fagos para reconocerlo y adsorberse a la cepa silvestre y sus lisógenas. Para medir adsorción recordaremos que se mezclan fagos con bacterias y a distintos tiempos se cuantifica el fago no adsorbido por titulación; una fracción pequeña de la población de lisógenas libera fagos espontáneamente, los cuales aumentarían artificialmente el número de fagos no adsorbidos, pues los fagos FIZ15 y D₃ presentan un fenotipo de placa turbia que es igual al fenotipo de los fagos que salen de las lisógenas, pues estas se construyeron con los fagos FIZ15 y D₃. Para resolver este problema decidimos obtener mutantes de placa clara para distinguirlos de aquellos liberados espontáneamente.

Mutagénesis con ácido nitroso

La gráfica 1 muestra la curva de letalidad del fago FIZ15 por tratamiento con ácido nitroso. Se observa muerte lineal, disminuyendo el título del fago en aproximadamente medio logaritmo cada 10 minutos. La frecuencia de mutantes con fenotipo de placas claras fué de 1% a los 20 minutos. En el

GRAFICA 1



Se mezclaron BA, Na NO y una solución de fagos en proporciones 9:1:1 y se incubó, se extrajeron alicuotas a los diferentes tiempos incluyendo tiempo cero.

control sin tratar la frecuencia de placas con fenotipo claro
 -5
 fué menor de 10 y se obtuvo una figura similar para el fago D3
 (dato no mostrado). Se purificó una placa de fenotipo claro para
 hacer lisados de alto título y usarlos en la adsorción de los
 fagos a las cepas patrón y lisógenas.

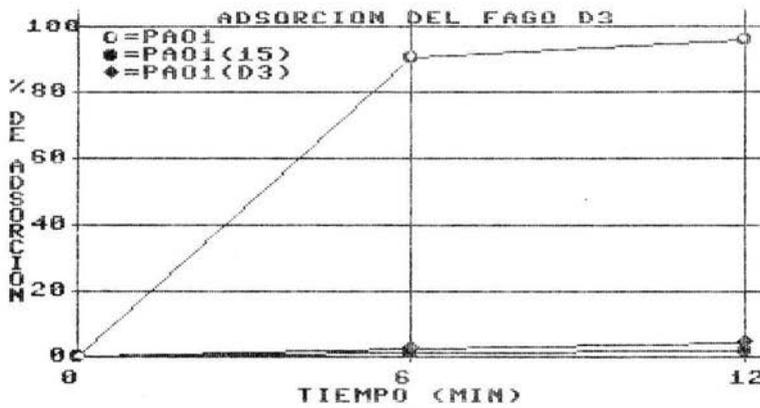
El fenotipo claro se obtiene por que el tratamiento con ácido
 nitroso causa una mutación que evita la función represora para
 la vía lítica, provocando que los fagos silvestres que podían
 sintetizar el represor y hacer lisogenia, ahora sean líticos por
 ausencia de la función del mismo. La placa turbia lo es porque en
 el centro de ella sobreviven lisógenas inmunes y la placa clara
 es una lisis total que no permite el crecimiento de las lisógenas.

Adsorción de los Fagos FIZ15c y D3c a la cepa control PAO1
 y las Lisógenas PIZ 15 y PAO1 (D3).

Si las lisógenas han sufrido un cambio superficial en el
 receptor para los fagos, estos no deben ser capaces de adsorberse
 a ellas, pero si a la cepa silvestre PAO1 que no ha sufrido
 modificaciones en el receptor para el fago.

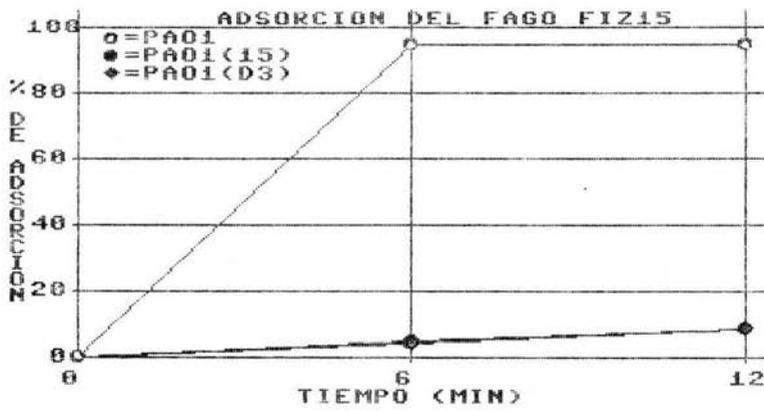
En la gráfica 2 y 3 podemos observar un comportamiento similar
 para los fagos D3c y FIZ 15c, es decir, se adsorben a valores
 cercanos al 100 % en PAO1 a los 5' y 12', no así a las lisógenas
 PIZ 15 y PAO1 (D3) donde la adsorción es a valores menores del 9%
 para ambos fagos a los 5 y 12 minutos, esto nos indica que los
 cambios inducidos por los profagos son a nivel del receptor, que
 es el antígeno-O.

GRAFICA 2



Se mezclaron ⁵ 10 fagos con ⁸ 10 bacterias y se extrajeron alícuotas a los diferentes tiempos para titular los fagos no adsorbidos.

GRAFICA 3



El ensayo es el mismo que el citado al pie de la gráfica 2

Estos resultados sugirieron que el incremento en la resistencia al efecto bactericida del suero de la cepa FIZ 15, se debe al cambio superficial inducido por el profago FIZ 15 a nivel de su receptor (antígeno-O). Para confirmar lo planteado decidimos obtener dos mutantes espontáneas de la cepa PAO1:

A) Una mutante resistente a FIZ 15 (PAO1/FIZ15) y

B) Una mutante resistente al efecto bactericida del suero (PAO1-Ser II).

De acuerdo a nuestra hipótesis los fenotipos de estas mutantes debieron ser: la resistente al fago debe ser resistente al suero y ninguna de las dos debe permitir la adsorción de FIZ 15, ni D3.

Prueba de Resistencia al suero de PAO1/FIZ15 y PAO1-Ser II .

El resultado de resistencia al efecto bactericida del suero para las mutantes PAO1/FIZ15 resistente al fago y PAO1-Ser II resistente al suero se presenta en la tabla 4 . Aquí observamos que la cepa PAO1/FIZ15 fué 10 y 36 veces más resistente a las concentraciones de 75 y 80% de SHN con respecto a la cepa silvestre PAO1; así también la cepa PAO1-Ser II presenta una resistencia aumentada 4 y 15 veces sobre PAO1 a concentraciones de 75 y 80% de SHN.

Así se confirma la primer parte de la hipótesis:

Un cambio en el receptor al fago trae un incremento en la resistencia al suero.

Adsorción de los fagos FIZ 15c y D3c a las cepas PAO1/FIZ15 y PAO1-Ser II.

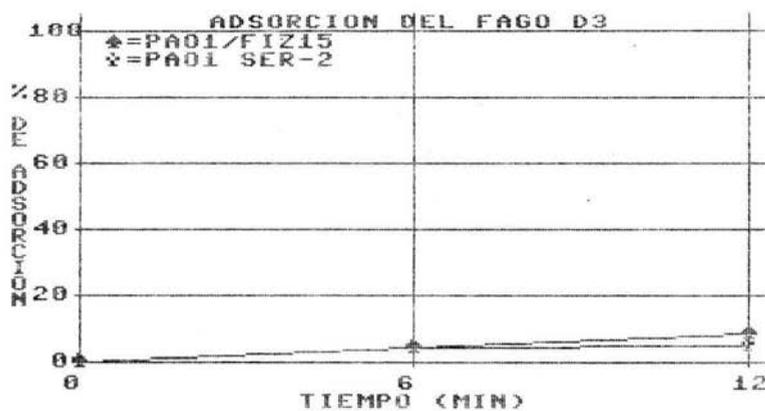
TABLA 4

Resistencia al efecto bactericida del SHN de las mutantes espontáneas PAO1-Ser II y PAO1/FIZ15.

Cepa	<u>%de sobrevivencia</u>	
	75% SHN	80% SHN
PAO1	9.3 ± 1.8	1 ± 0.1
PAO1-Ser II	38.9 ± 9	15 ± 3
PAO1/FIZ15	100 ± 0	36 ± 1

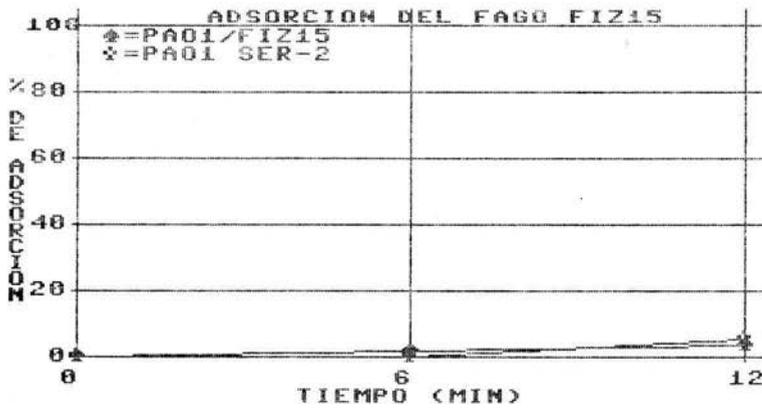
7
se mezclaron 10 bacterias de fase exponencial con SHN ajustando a 4 ml. con PBS, se incubó durante 3 hrs., se diluyó y espatuló para calcular las ufc. los datos se reportan en % de sobrevivencia.

GRAFICA 4



El ensayo es el mismo que el citado al pie de la gráfica 2

GRAFICA 5



El ensayo es el mismo que el citado al pie de la gráfica 2

Al medir la adsorción a estas cepas encontramos (Gráficas 4 y 5) que los fagos FIZ 15c y D3c presentan valores por debajo del 10% de adsorción para ambas.

Estos resultados junto con los anteriores confirman que el bacteriófago FIZ 15 aumenta la resistencia al suero de la cepa PIZ 15 al causar un cambio superficial a nivel de su propio receptor.

*"Hemos cambiado el conocimiento por la emoción;
que es también una manera de penetrar en las cosas".*

Emilio Abreu Gómez

DISCUSION

Los resultados presentados nos indican que al lisogenizar a la cepa PAO1 con el fago FIZ15 trae consigo cambios a nivel del receptor del fago, pues al intentar plaquear a los fagos D3 (antígeno o-especifico) y FIZ15 sobre las lisógenas PAO1(D3) y PIZ 15 estos no lo hacen, esto se ve apoyado por el trabajo de Kusio y Kropinski;(23) quienes reportan que al lisogenizar a la cepa PAO1 con el fago D3, cuyo receptor es el antígeno-O sufre modificaciones en el sitio de reconocimiento del fago; evitando así la reinfección de algún otro fago con receptor en el antígeno O sobre la lisógena PAO1(D3). Aunque este reporte indica cambios sutiles que consisten de una acetilación repetida en el antígeno O y el cambio de enlaces α 1-4 a enlaces β 1-4 de los azúcares del mismo, son suficientes para evitar que el fago D3 se adsorba a su lisógena, no ocurriendo esto en la cepa PAO1 donde el fago D3 se adsorbe eficientemente hasta valores cercanos al 100%.

La idea de medir adsorción al fago FIZ 15 contra su lisógena y la del fago D3, así como a la cepa silvestre PAO1, es con el fin de caracterizar el cambio superficial que le induce a la bacteria al lisogenizarla. El comportamiento similar en adsorción de los fagos nos indica que ambos fagos comparten un receptor antígeno O-especifico que podría ser el mismo o encontrarse uno muy cercano de otro. Es conocido que varios fagos pueden presentar receptores en el antígeno-O, podemos incluir a los fagos 21, P1, T3, T4 y T7 de E.Coli con esta propiedad (24).

Se han reportado trabajos para Klebsiella pneumoniae (43) y Pseudomonas aeruginosa (10) donde al obtener cepas resistentes con cambios en el receptor para un fago, obtenemos cambios en la composición y estructura de la región antígeno-O del LPS; además estos cambios inducen modificaciones en el comportamiento con respecto a la sensibilidad al efecto bactericida del suero. En Klebsiella cepas resistentes al fago FC-3 son más sensibles al efecto del suero, y en Pseudomonas una mutante resistente al fago E 79; obtenida de cepa silvestre resistente al suero: muestra un fenotipo de sensibilidad al suero debida a la ausencia de una fracción del antígeno-O. Así es claro que el antígeno-O juega un papel importante en la sensibilidad al efecto bactericida del suero.

La modificación en el antígeno-O creemos que es más drástica en la cepa PAO1/FIZ15 resistente al fago, con modificaciones en el receptor del mismo, pues el incremento en la resistencia al efecto bactericida del SHN es mayor en esta cepa que en la lisógena PIZ15 y aún que la cepa PAO1-Ser II seleccionada como resistente al suero, además un cambio en la sensibilidad al suero trae un cambio en el receptor del fago, pues la cepa PAO1-Ser II que nunca fue seleccionada contra un fago no permite que se adsorban los fagos FIZ 15c y D3c.

El efecto de la lisogenización en la resistencia al efecto bactericida del suero de la cepa PIZ 15, podríamos sugerir se debe a un incremento en el tamaño de la cadena de azúcares del antígeno-O del LPS, esto basado en reportes para Klebsiella

pneumoniae (43), se encontró que una cepa con una cadena de LPS grande presenta un incremento en la resistencia al suero con respecto a cepas isogénicas con un LPS reducido. Así mismo con este bacilo gram negativo se ha reportado ya que el factor principal de la resistencia es el antígeno-O (44), pues al suplementar el ensayo de muerte con las fracciones de LPS, se observó que la fracción por suero correspondiente al antígeno-O protegía más a una cepa sensible del efecto del suero, evitando la muerte de esta, no así las fracciones correspondientes al "Core" y el "Lípido A" donde la cepa sensible no era protegida de la muerte por el efecto del suero. En Pseudomonas aeruginosa, Schiller en 1984 (38) seleccionó cepas resistentes al suero a partir de cepas sensibles y comparó la composición del LPS en ambos grupos de cepas; encontrando en el patrón electroforético la presencia de un número mayor de bandas de alto peso molecular en los carriles de las mutantes resistentes, no así en las silvestres sensibles, dichas bandas correspondían a la región del antígeno-O del LPS. Las modificaciones además incluían cambios en los serotipos de las cepas resistentes con respecto de las sensibles.

En otro reporte Cryz en 1984 (10) describe que al seleccionar una mutante sensible al efecto del suero obtenida de una cepa resistente al mismo, la disminución en la resistencia se debe a la ausencia de banda de la región del antígeno-O observada en un patrón electroforético y en una cromatografía en columna, además al inocular a ratones para la prueba de DL 50 con ambas cepas, la mutante sensible no provoca muerte a los organismos

infectados, no ocurriendo en las cepas resistentes quienes si matan a los ratones de modo que la resistencia al suero es un importante factor de virulencia de este microorganismo.

Hasta aquí puede quedar la idea que la modificación en el LPS evita la activación del MAC, pero la resistencia no es quizá por esta razón, Schiller en 1986 (39) determinó el consumo y fijación de C3, C5 y C9 del complemento a una cepa de Pseudomonas aeruginosa encontró que los niveles de consumo de estos factores en cepas resistentes se ve incrementado al doble del consumo de una cepa sensible en un lapso de una hora, esto puede ser por la presencia de un mayor número de determinantes antigénicos en el LPS, solo que la cantidad de moléculas de C3, C5 y C9 que se encontraban unidas a la cepa resistente eran solo el 10% del número de moléculas unidas a la superficie de la membrana externa de la cepa sensible. Así pues la resistencia no se debe únicamente a la inactivación del complemento, sino a la obstrucción de los sitios de unión del MAC, evitando la lesión capaz de provocar el efecto bactericida y bacteriolítico.

Un incremento en el tamaño de la cadena del antígeno-O puede traer consigo aparte del bloqueo de la unión del MAC, una disminución en la fluidez de la membrana que es un prerrequisito para favorecer la muerte por suero de un organismo (42).

La capacidad de un organismo para evadir los mecanismos de defensa de su hospedero le permitirán sobrevivir y diseminarse en el mismo provocando una infección sistémica que puede ser letal para el hospedero.

*Lo que hace más importante a tu Rosa
es el tiempo que le has dedicado a ella.*

A.S.Exupery

CONCLUSIONES

De lo discutido anteriormente podemos concluir:

1) Al lisogenizar a la cepa PAO1 con el fago FIZ 15 trae consigo un incremento en la resistencia a fagocitosis por macrófagos de ratón y al efecto bactericida del SHN.

2) El cambio por efecto de la lisogenización es a nivel del antígeno-O que es el receptor del fago FIZ 15.

Y sugerimos además que:

A) La modificación puede consistir en un incremento en el tamaño de la región del antígeno-O del LPS, por un aumento en la cadena de ácidos grasos y azúcares.

B) Un incremento en el tamaño del antígeno-O produce consigo un bloqueo estérico de los elementos del MAC a los sitios de lesión entre la membrana externa y la membrana citoplasmática sin afectar la formación del complejo.

C) El LPS es un factor que contribuye a la resistencia al suero en Pseudomonas aeruginosa.

D) La resistencia al suero está dada por la presencia de estructuras sobre o cercanas a la superficie bacteriana y que son capaces de interferir en la formación, fijación o activación del MAC.

E) La resistencia al suero es un importante determinante de la virulencia, pues de la capacidad que tengan para evadir el sistema de defensa del hospedero, será la diseminación en este.

PERSPECTIVAS

1. Estudiar la química del LPS de PAO1 y PIZ 15 para concluir más acertadamente acerca de los cambios en el antígeno-O .
2. Averiguar cual de las vías (clásica o alterna) participa en la función bactericida contra Pseudomonas aeruginosa.
3. Caracterizar el gene o genes que inducen a la conversión lisogénica para tratar de ahondar en este fenómeno.
4. Tratar a PIZ 15 con difenilamina para observar el efecto del suero al disminuir la síntesis de ácidos grasos, se sabe que este compuesto inhibe la síntesis del antígeno-O (13)
5. Usar antisueros comerciales para detectar diferencias en los serotipos de PAO1 y PIZ15 por efecto de conversión lisogénica (Se ha hecho fagotipia para ambas cepas, pero no presentan diferencia alguna, dato no mostrado (17)).

BIBLIOGRAFIA

1. Agüero, M.C. y F.C. Cabello (1983). "Relative contribution of Col V plasmid and K1 antigen to the pathogenicity of Escherichia coli". Infect. and Immun. 40:359-368.
2. Agüero, M.E., A. Lieselotte, A.G. De Luca, K.N. Timmis y F.C. Cabello (1984). "A plasmid encoded outer membrane protein, tra T, enhances resistance of Escherichia coli to fagocytosis". Infect. and Immun. 46:740-746.
3. Arce, G.J.; D. Arenas; F. Arguello y S. Vaca (1987). "El bacteriófago FIZ15 aumenta la adhesión de Pseudomonas aeruginosa a células bucoepiteliales humanas mediante un mecanismo que requiere energía". Resúmenes del VII coloquio de investigación. ENEF-Iztacala UNAM, Noviembre 23 al 27.
4. Arenas, A.D. (1985). "Aislamiento y caracterización de un bacteriófago transductor de Pseudomonas aeruginosa: construcción de un fago transductor con un marcador de resistencia a ampicilina y represor termosensible". Tesis de Licenciatura en Biología, E.N.E.P. Iztacala, UNAM. 44p
5. Binns, M.M.; D.L. Davies y K.G. Hardy (1979). "Cloned fragments of the plasmid Col V, I-K94 specifying virulence and serum resistance". Nature 279:778-781.
6. Bodey, G.P. et al. (1983). "Infections caused by Pseudomonas aeruginosa". Rev. infect. Dis. 5:270-313.
7. Chakrabarty, A.M. (1976). "Plasmids in Pseudomonas". Ann. Rev. Genet. 10:7.
8. Cervantes, V.C. y L.E. Sosa (1981). "Análisis de plásmidos que confieren resistencia a antibióticos en cepas de Pseudomonas aeruginosa de origen clínico". Resúmenes del XII Congreso Nacional de Microbiología Mérida Yucatán. pp 10.
9. Costerton, J.W.; M.R. Brown y J.M. Sturgess (1979). "The cell envelope, its role in infection". En Pseudomonas aeruginosa: CLINICAL MANIFESTATIONS OF INFECTION AND CURRENT THERAPY. Academic Press. Nueva York, EE.UU. pp. 41-62.
10. Cryz, S.J.; T.L. Pitt y R. Germanier (1984). "Role of Lipopolisaccharide in virulence of Pseudomonas aeruginosa". Infect. and Immun. 44:508-513.
11. Davis, B.D. et al (1981). TRATADO DE MICROBIOLOGIA ;2a.ed; Salvat editores; Barcelona, España. 1599 pp.

12. Favero, M. S. et al (1981). "Pseudomonas aeruginosa growth in distilled water from hospitals". Science 173:863-838.
13. Feingold, O. S. (1969). "The serum bactericidal reaction IV. Phenotypic conversion of Escherichia coli from serum resistance to serum-sensitivity by diphenylamine. J. of Infect. Dis. 120:437-444.
14. Fietta, A.; E. Romero y A. G. Siccardi (1977). "Effect of some R factors on the sensitivity of rough Enterobacteriaceae to human serum" Infect. and Immun. 18:278-282.
15. Fine, D. P.; S. R. Marney Jr.; D. G. Colley; J. S. y R. M. Desprez (1972). "C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA". J. Immunol. 109:807-809.
16. Gilardi, G. L. (1979). "Medical Microbiology". En Pseudomonas aeruginosa, THE ORGANISM, DISEASES IT CAUSES, AND THEIR TREATMENT. Ed. L. D. Sabath, Hans Huber Publishers; Benn Stuttgart, Vienna. pp 25-30.
17. Gutiérrez, G. R. (1984). "Tipificación con fagos de Pseudomonas aeruginosa". Tesis de licenciatura en Biología E. N. E. P. Iztacala, U. N. A. M.; 43 pp.
18. Hancock, E. W. ; (1983). "Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum sensitive, nontypable strains deficient in Lipopolisaccharide O side chains" Infect. and Immun. 42: 170-177.
19. Hoibi, M. (1977). "Pseudomonas aeruginosa infections in cystic fibrosis". Acta pathol. Microbiol. Scand. Sect. C. Suppl. 262.
20. Holloway, B. W. y V. Krishnapilla ; (1975). "Bacteriophages and Bacteriocins". En GENETICS AND BIOCHEMISTRY OF Pseudomonas. Ed. P. H. Clarke y M. H. Richmond John Willey and Sons. pp 99-132.
21. Hovde, C. J. y B. H. Gray (1986). "Characterization of a protein from normal human polymorphonuclear leukocytes with bactericidal activity against Pseudomonas aeruginosa". Infect. and Immun. 54:142-148.
22. Jarrell, K. F. y A. M. Kropinski (1981). "Isolation and characterization of a bacteriophage specific for the Lipopolisaccharide of rough derivatives of Pseudomonas aeruginosa strain PAO1" J. Virol. 38 : 529-538.
23. Kuzio, J. y A. M. Kropinski; (1983). "O-antigen conversion in Pseudomonas aeruginosa PAO1 by bacteriophage D3". J. Bacteriol. 155 : 203-212 .

24. Luria, S.E. et al(1977). GENERAL VIROLOGY : 3a edicion, Ed.John Willey & Sons:Nueva York.E.E.U.U.577 pp.
25. Luzar, M.A. y T. C.Montie (1985). "A virulence and altered physiological properties of cistic fibrosis strains of Pseudomonas aeruginosa". Infect. and Immun. 50:572-576.
26. Mathews, C. (1977). " Reproductions of large virulent bacteriophage" . En Comprehensive Virology 3 :179-294.
27. Moll, A. ; P. A. Manning y 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.
28. Montenegro, M.A.; D.Bitter; J.K.Timmis; M.E.Montenegro;F.C. Cabello; S.C. Sabyal y K.N. Timmis (1985). "The trat T gene sequences,serum resistance and pathogenicity-related factors in clinical isolates of Escherichia coli and other gram negative bacteria". J. Gen. Microbiol. 131:1511-1521.
29. Montie, T.C;D.Doyle-Huntzinger; R. C. Craven e I.A. Holder (1982)."Loss of virulence asociated with absence of flagelum in an isogenic mutant of Pseudomonas aeruginosa, in the bourned mouse model".Infect. and Immun. 38:1296-1298.
30. Muschel, L. H.; L. A. Ahl y L. S.Baron (1968). "Effect of lisogeny on serum sensitivity". J. Bacteriol. 96:1912-1914.
31. Ogata,R.T. y R.P. Levine (1980)."Characterization of complement resistance in Escherichia coli conferred by the antibiotic resistance plasmid R100". J. of Immun.125:1494-1498.
32. Orskov,I; F. Orskov; B. Jann y K. Jann. (1977) "Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of Escherichia coli. Bacteriol. Rews. 41:667-710.
33. Pérez, P. I. ; J. A. Hopkins y M. J. Blaser (1986). "Lipopolisaccharide structures in Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa and Vibrio cholerae are immunologically related to Campylobacter spp.". Infect. and Immun.51:204-208.
34. Pollack,M.(1984)."The virulence of Pseudomonas aeruginosa Rew. of Infect. Dis. 6 : 5617-5626.
35. Pruitt,B.A.Jr.(1979)."Infections of burns and other wounds caused by Pseudomonas aeruginosa" En Pseudomonas aeruginosa, THE ORGANISM, DISEASES IT CAUSES AND THEIR TREATEMENT. Ed. L.D. Sabath, Hans Huber Publishers : Bern Stuttgart,Vienna.pp55-71.

36. Reynard, A. M. y M. E. Beck (1976). "Plasmid mediated resistance to the bactericidal effects of normal rabbit serum." *Infect. and Immun.* 14:848-850.
37. Reynard, A.M.; M.E. Beck y R.K. Cunningham (1978). "Effects of antibiotic resistance plasmids on the bactericidal activity of normal rabbit serum". *Infect. and Immun.* 19:861-865.
38. Schiller, N.S; D.R. Hackley y A. Morrison (1984). "Isolation and characterization of serum resistant strains of Pseudomonas aeruginosa derived from serum sensitive parental strains ". *Current Microbiology*. 10:185-190.
39. Schiller, N. L. y K. A. Joiner (1986). "Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa". *Infect. and Immun.* 54:689-694.
40. Stanier, R. Y. ; E. A. Adelberg y J. L. Ingraham (1984) *MICROBIOLOGIA*; 4a edición. Ed.Reverte; Barcelona ,España 836 pp.
41. Stent, S.G. y R. Calendar (1978). *MOLECULAR GENETICS, ANS INTRODUCTORY NARRATIVE*. 2a edición: W.H. Freeman and Company.
42. Taylor, P.W. (1983). "Bactericidal and Bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria". *Microbiol. Rev.* 47:46-83.
43. Tomás J.M., V.J. Benedi., B. Ciurana y J. Jofre. (1986). "Role of capsule and O antigen in resistance of Klebsiella pneumoniae to serum bactericidal activity". *Infect. and Immun.* 54:85-89.
44. Tomás, J.M. y B. Ciurana (1987). "Role of Lipopolisaccharide and complement in susceptibility of Klebsiella pneumoniae to nonimmune serum". *Infect. and Immun.* 55 : 2741-2746.
45. Thomassen, M.J. y C.A. Demko (1981). "Serum bactericidal effect on Pseudomonas aeruginosa; isolates from cystic fibrosis patients". *Infect. and Immun.* 33 : 512-518.
46. Vaca P.S. y C. Cervantes. (1988). "Factores de virulencia en Pseudomonas aeruginosa". *Rev Latamer. Microbiol.* (En prensa).
47. Woods, D.E., et al. (1980). "Role of Pili in Adherence of Pseudomonas aeruginosa to mammalian epithelial cells." *Infect. and Immun.* 29:1146-1151.
48. Wretling, B., y O.R. Pavloskis (1983). "Pseudomonas aeruginosa elastase and its role in Pseudomonas infections". *Rev. Infect. Dis.* 5:998-1004.