

## SEPTICEMIA A PSEUDOMONA AERUGINOSA

### Evaluación experimental de la Seroterapia Hiperinmune

MANUEL BOCANEGRA C., \* MANUEL KIYAN T., FIDEL HINOSTROZA Ñ.,  
NICOLÁS VELARDE Z., y AUGUSTO BAZÁN A.

**Trabajo realizado en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina, y del Hospital del Niño de Lima, financiado por la donación G. M. 03123-15 del Instituto de Salud Pública de los Estados Unidos de Norteamérica.**

En pacientes con graves quemaduras, los disturbios hemodinámicos iniciales constituyeron, en el pasado, el principal problema terapéutico. Sin embargo, actualmente, gracias a un mejor conocimiento de la fisiopatología de estos disturbios se ha logrado reducir notablemente la mortalidad por shock, esto es, aquella que se produce dentro de los 60 primeras horas siguientes al trauma térmico, (32), (34), (36), (42), (43), (48). Actualmente, es la infección local o sistémica la principal amenaza, en la evolución posterior, de los pacientes quemados, siendo ésta última la que causa mayor letalidad entre ellos. Los gérmenes responsables de estas infecciones sistémicas son en su gran mayoría Gram Negativos y entre ellos, la *Pseudomona Aeruginosa* ocupa lugar preferencial, (1), (3), (6), (8), (22), (23), (28), (33), (49). Esta observación clínica ha sido igualmente confirmada en animales de experimentación, (37), (40), (41), (52).

El empleo de antibióticos de conocida actividad antibacteriana in vitro, en la prevención o tratamiento de estas sepsis en pacientes con quemaduras extensas, es decepcionante, y podría, tal vez, originar cepas resistentes a tales antibióticos, (3), (21), (29), (33), (55).

No existe hasta ahora una explicación satisfactoria para los fenómenos anteriormente expuestos. Experimentalmente ha sido posible de-

---

\* Profesor Asociado del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la U. N. M. S. M.

mostrar que el trauma térmico hace muy lábiles a los animales a una gran variedad de gérmenes o a sus toxinas, (18), (27), (35), (37), (40), (46), pero, aún es inexplicable: a) la causa misma de esta labilidad; b) la especial afinidad por gérmenes Gram Negativos; c) la casi exclusiva incidencia de la *Pseudomona Aeruginosa* en humanos; y d) la ineficacia de la antibioterapia.

Con el uso de la inmunoterapia inespecífica, primero en animales (38), (45), (46), y posteriormente en humanos (17), (21), (22), se han obtenido resultados promisorios, pero, aún lejos de resolver definitivamente el problema. En nuestro medio, desde 1956 se viene empleando sueros hiperinmunes heterólogos "Antisuero", preparados en conejos o caballos, en el tratamiento de la septicemia a *Pseudomona Aeruginosa*. Resultados preliminares de este estudio revelan que el "antisuero", es parcialmente eficaz (7). Experiencias igualmente alentadoras han sido observadas experimentalmente en animales, por Millican (39), y Jones (20), y posteriormente por Feller (11), en humanos, con el uso de sueros homólogos y vacunas.

El éxito parcial del "antisuero" heterólogo como agente terapéutico puede deberse a múltiples factores como son: su capacidad antibacteriana y antitóxica, dosis, precocidad de su aplicación, virulencia de la cepa infectante, etc. Era pues necesario reevaluar el "antisuero" frente a estos múltiples aspectos, especialmente en aquéllos más importantes, su actividad antibacteriana y su actividad antitóxica.

El presente trabajo está orientado a investigar experimentalmente este problema, y de sus resultados se desprende que, si bien el "Antisuero" heterólogo es eficaz para combatir las infecciones sistémicas a *Pseudomonas Aeruginosas* producidas en ratones quemados, su actividad antitóxica es nula, lo cual podría explicar los hallazgos clínicos observados con su empleo en este tipo de sepsis.

## MATERIAL Y METODOS

### *Animales de experimentación.*

Se utilizaron ratones albinos, cepa suiza, hembras de 18 a 20 grs. (35 a 40 días de edad), proporcionados por los Institutos de Higiene y Fiebre Aftosa de Lima.

Previa anestesia con éter (10 a 20 segundos), se sumergieron las patas posteriores de los animales hasta la altura de los ilíacos, en agua caliente a 70°C, durante 7 segundos. Con este sistema se obtiene una

quemadura total de la piel (3º grado), de una extensión aproximada al 30% de la superficie corporal.

#### *Endotoxina bacteriana.*

Como "endotoxina bacteriana" se usó el sobrenadante de un caldo de cultivo (100 cc. Brain Heart Infusión), sembrado con una de las cepas de *Pseudomona Aeruginosa* que más frecuentemente se aislan de la sangre de los pacientes quemados que fallecen con tal septicemia (T-488, Verder), (6), (51), e incubado a 37°C durante 72 horas. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación del caldo de cultivo a 3.000 r.p.m., durante 20 minutos y, posteriormente, se esterilizó a través de un filtro Seitz (Filtzed N° 32566, con un poro de 0.1 micras).

La "endotoxina" así obtenida se distribuyó en tubos estériles (70 x 10 mm.), y se guardó en 4°C hasta el momento de su uso.

#### *Suero heterologo hiperimmune.*

Los cuatro tipos serológicos (51), de *Pseudomona Aeruginosa* que más frecuentemente infectan a los niños quemados en nuestro país (T-488, 369, 359 y Lawson), (6), (7), se emplearon como antígenos para la elaboración del suero hiperimmune en caballos.

Estas cepas se sembraron en caldo nutriente (100 cc. Brain Heart Infusión), e incubaron a 37°C, durante 18 a 20 horas. Después de éste tiempo las bacterias se separaron por centrifugación, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron en un pequeño volumen de solución salina isotónica (Na.Cl.). Esta suspensión bacteriana fue sembrada en agar simple preparado en botellas planas de 300 a 500 cc. de capacidad e incubadas nuevamente a 37°C por 18 a 20 horas. Luego se cosecharon los gérmenes con suero fisiológico (Na.Cl. 0.9%) y se lavaron 3 veces consecutivas con alícuotas frescas de éste mismo suero en la centrífuga refrigerada. La suspensión final se ajustó a una densidad óptica de 0.40-0.45 con una longitud de onda de 650 mu en el espectrofotómetro Beckman Modelo B, lo cual permite obtener  $1.7 \times 10^9$  gérmenes vivos por centímetro cúbico (38).

Con esta suspensión se inició la inmunización de los animales (4 caballos) aplicando como primera dosis 2 cc. subcutáneos en el cuello del animal. Al cuarto día (segunda dosis), se inyectó 5 cc. de esta suspensión por vía endovenosa (yugular), y luego con intervalos de 4 días se aplicaron dosis sucesivas de 10, 20 y 30 cc. de la suspensión (10).

Después de la última dosis, se esperó una semana para hacer una sangría de prueba y determinar en esta muestra el título de hemaglutinación bacteriana contra *Pseudomona Aeruginosa*, considerándose el suero como eficaz cuando se obtuvieron títulos sobre 1/64,000.

Entonces se hizo el sangrado simultáneo de estos animales (1.000 cc. por cada animal), en frascos al vacío y estériles. El suero fue separado por centrifugación y luego se procedió al fraccionamiento proteico con sulfato de amonio al 50%. La gamma globulina así precipitada se separó por centrifugación, se redisolvió en cloruro de sodio al 0.9% y luego se dializó frente a esta misma solución para eliminar totalmente el exceso de sulfato de amonio. Esta solución de gamma globulina hiperinmune fue finalmente ampollada en fracciones de 10 cc. en condiciones estériles y se guardó en nevera a 4°C hasta el momento de su uso (9). La cantidad de gamma globulina contenida en el dializado final del "antisuero" fue de 6 grs. %.

#### *Gérmenes infectantes.*

Se usó la misma suspensión de *Pseudomona Aeruginosa* (1.7 x 10<sup>9</sup> gérmenes vivos/cc.), empleada para la inmunización de los caballos.

#### *Métodos de experimentación.*

Se hicieron un total de 10 experimentos, en cada uno de los cuales se puso siempre un grupo "control" de animales simplemente quemados pero no inoculados. En estos animales, así como también en aquellos que recibieron inoculaciones intraperitoneales diversas, se anotó cuidadosamente la mortalidad acumulativa durante las 72 primeras horas siguientes al trauma térmico. El volumen de los inóculos fue siempre el mismo en cada grupo de comparación.

Estos experimentos se han clasificado para su mejor análisis en los siguientes grupos:

GRUPO I. (Control), Setentiséis animales, simplemente quemados.

GRUPO II. Veintinueve animales quemados e inyectados intraperitonealmente con 1 cc. de una mezcla de 0.5 cc. de "toxina bacteriana" y 0.5 cc. de caldo de cultivo estéril, 30 minutos después del trauma térmico.

GRUPO III. Treintiocho animales quemados e inyectados intraperitonealmente con 1 cc. de un incubado de "Toxina-Antisuero" (0.5 cc. de "toxina bacteriana" y 0.5 de "antisuero", no diluido) a 37°C durante 30 minutos.

GRUPO IV. Treintiseis animales quemados e inyectados intraperitonealmente con 0.5 cc. de "antisuero", no diluido, 24 horas antes del trauma térmico y con 1 cc. de una mezcla de partes iguales de "toxina bacteriana" y caldo de cultivo estéril, 30 minutos después del mismo.

GRUPO V. Cincuentiocho animales quemados e inoculados intraperitonealmente con 0.5 cc. de una solución al milésimo (1/1000) de la suspensión original de "gérmenes infectantes" ( $1.7 \times 10^9$  gérmenes vivos/cc.), en suero fisiológico (Na.Cl. 0.85%), 30 minutos después de la quemadura.

GRUPO VI. Sesenta animales quemados en las mismas condiciones del grupo V, pero que además fueron inyectadas intraperitonealmente con 0.5 cc. de una dilución al centésimo (1/100) de "antisuero" en suero fisiológico, cuatro horas antes de la quemadura.

GRUPO VII. Cincuenta animales similares al grupo VI, pero que en lugar del "antisuero" recibieron intraperitonealmente 0.5 cc. de una solución al centésimo (1/100) de gamma globulinas humanas, cuatro horas antes de la quemadura.

Como puede apreciarse, el objeto de estos grupos de experimentación fue observar el efecto del "antisuero" heterólogo sobre la actividad letal de la *Pseudomona Aeruginosa* o sus toxinas en pericotes quemados y, además, compararlo con aquel producido por las gamma globulinas humanas.

Una apreciación cabal de estos efectos hacía imprescindible la inclusión de grupos controles que evidenciaron: a) La capacidad letal de las quemaduras por si mismas, Grupo I; y b) el incremento de esta letalidad por adecuadas dosis de gérmenes vivos (Ps. A.) o sus toxinas, grupos II y V, respectivamente.

## RESULTADOS OBTENIDOS

Aún cuando los resultados individuales de los 10 experimentos tienen amplias variaciones, como sucede generalmente en este tipo de es-

tudios, un análisis de los grupos de experimentación, Tablas 1 y 2, claramente evidencia lo siguiente:

1. En las condiciones experimentales descritas, las quemaduras practicadas en los ratones produjeron una mortalidad acumulativa, promedio del 8% en las primeras 12 horas siguientes al trauma térmico, la cual se incrementó progresivamente hasta llegar al 28% al finalizar las 72 horas de observación (Tabla 1, Grupo I).

Este tipo de quemaduras con una mortalidad total que solamente alcanza al 28%, permite estudiar de un lado el efecto injuriente de cualquier tipo de infección, en nuestro caso particular de la *Pseudomona Aeruginosa* o sus toxinas, superimpuesta al trauma térmico y de otro, la eficacia de cualquier método o agente terapéutico ("antisuero" o Gamma Globulinas Humanas), usado para combatir el efecto de tales infecciones o toxinas. El parámetro de comparación sería el cambio en la mortalidad acumulativa promedio en estas dos últimas condiciones.

2. La inyección intraperitoneal de 0.5 cc. de "endotoxina bacteriana" a estos animales (Tabla 1, Grupo II), incrementó la mortalidad acumulativa promedio del 28% al 93% al final de las 72 primeras horas siguientes al trauma térmico y la diferencia entre ambas mortalidades tiene valor estadístico ( $p < 0.01$ ). Esta mayor letalidad se hizo presente desde las primeras horas de observación llegando al 90%, 12 horas después de producida la quemadura y la inoculación.

Se debe señalar que, aún cuando la mortalidad acumulativa en estos animales fue muy alta y precoz, solamente llegó al 100% en los experimentos 1 y 2 y que en los experimentos 3 y 4 alcanzó cifras de 80 a 90% respectivamente. Esto evidenciaría que el volumen de "toxina bacteriana" inoculada representa una dosis muy cercana a la dosis máxima letal, pero que en ningún caso constituye una excesiva sobredosis.

3. La inyección intraperitoneal de una mezcla de 0.5 cc. de "toxina bacteriana" y 0.5 cc. de "antisuero" no diluido, incubadas al 37°C durante 30 minutos (Tabla 1, Grupo III), no modificó sustancialmente ni la precocidad (74% a las 12 horas), ni el alto grado de mortalidad total (82% a las 72 horas), observados en el grupo de animales que solamente recibió "toxinas" (Tabla 1, Grupo II). La diferencia entre las mortalidades acumulativas de estos grupos a las 72 horas no tiene valor estadístico  $P = 0.10$ .

4. El uso profiláctico de 0.5 cc. de "antisuero" no diluido, 24 horas antes del trauma térmico y de la inoculación de la "endotoxina bac-

Tabla Nº 1. "Antisuero" y "Endotoxina" (Ps. A.) en ratones quemados

| Grupo  | Exp. Nº | Nº Rat. | MORTALIDAD ACUMULATIVA          |     |    |     |    |     |    |     |
|--|---------|---------|---------------------------------|-----|----|-----|----|-----|----|-----|
|  |         |         | Horas después de la Inoculación |     |    |     |    |     |    |     |
|  |         |         | 12                              |     | 24 |     | 48 |     | 72 |     |
|  |         | Nº      | %                               | Nº  | %  | Nº  | %  | Nº  | %  |     |
| I<br>Ratones Quemados<br>30%<br>"control"                        | 1       | 6       | 0                               | 0   | 0  | 0   | 1  | 17  | 1  | 17  |
|  | 2       | 4       | 1                               | 25  | 1  | 25  | 1  | 25  | 1  | 25  |
|  | 3       | 5       | 2                               | 40  | 2  | 40  | 3  | 60  | 3  | 60  |
|  | 4       | 10      | 3                               | 30  | 3  | 30  | 4  | 40  | 4  | 40  |
|  | 5       | 10      | 0                               | 0   | 2  | 20  | 4  | 40  | 6  | 40  |
|  | 6       | 8       | 0                               | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  | 7       | 10      | 0                               | 0   | 2  | 20  | 4  | 40  | 4  | 40  |
|  | 8       | 7       | 0                               | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   | 2  | 22  |
|  | 9       | 8       | 0                               | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  | 10      | 8       | 0                               | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  |         | 76      | 6                               | 8   | 10 | 13  | 17 | 23  | 21 | 28  |
| II<br>Ratones Quemados<br>"Endotoxina"                           | 1       | 8       | 7                               | 85  | 8  | 100 | 8  | 100 | 8  | 100 |
|  | 2       | 6       | 6                               | 100 | 6  | 100 | 6  | 100 | 6  | 100 |
|  | 3       | 5       | 4                               | 80  | 4  | 80  | 4  | 80  | 4  | 80  |
|  | 4       | 10      | 9                               | 90  | 9  | 90  | 9  | 90  | 9  | 90  |
|  |         | 29      | 26                              | 90  | 27 | 93  | 27 | 93  | 27 | 93  |
| III<br>Ratones Quemados<br>"Endotoxina-Antisuero"                | 1       | 10      | 6                               | 60  | 6  | 60  | 6  | 60  | 6  | 60  |
|  | 2       | 8       | 7                               | 85  | 7  | 85  | 7  | 85  | 8  | 100 |
|  | 3       | 10      | 8                               | 80  | 9  | 90  | 9  | 90  | 9  | 90  |
|  | 4       | 10      | 7                               | 70  | 7  | 70  | 8  | 80  | 8  | 80  |
|  |         | 38      | 28                              | 74  | 29 | 76  | 30 | 79  | 31 | 82  |
| IV<br>Ratones Quemados<br>"Endotoxina-Antisuero<br>Profiláctico" | 1       | 9       | 8                               | 89  | 8  | 89  | 8  | 89  | 8  | 89  |
|  | 2       | 7       | 7                               | 100 | 7  | 100 | 7  | 100 | 7  | 100 |
|  | 3       | 10      | 10                              | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 |
|  | 4       | 10      | 4                               | 40  | 4  | 40  | 4  | 40  | 4  | 40  |
|  |         | 36      | 29                              | 81  | 29 | 81  | 29 | 81  | 29 | 81  |

Valor de p para las diferencias de mortalidades entre los siguientes grupos:

|           |        |          |        |           |        |
|-----------|--------|----------|--------|-----------|--------|
| I vs II   | < 0.01 | I vs III | < 0.01 | I vs IV   | < 0.01 |
| II vs III | 0.1    | II vs IV | 0.1    | III vs IV | 0.7    |

Tabla N° 2. Antisuero e Infección (Ps. A.)<sup>\*</sup> en ratones quemados

| Grupo  | Exp. N°<br>N° Rat. |    | MORTALIDAD ACUMULATIVA          |    |    |    |    |     |    |     |
|--|--------------------|----|---------------------------------|----|----|----|----|-----|----|-----|
|  |                    |    | Horas después de la Inoculación |    |    |    |    |     |    |     |
|  |                    |    | 12                              |    | 24 |    | 48 |     | 72 |     |
|  |                    | N° | %                               | N° | %  | N° | %  | N°  | %  |     |
| V<br>Ratones Quemados<br>Ps. A. *              | 5                  | 10 | 0                               | 0  | 3  | 30 | 10 | 100 | 10 | 100 |
|  | 6                  | 9  | 0                               | 0  | 1  | 11 | 7  | 78  | 8  | 89  |
|  | 7                  | 10 | 0                               | 0  | 5  | 50 | 9  | 90  | 10 | 100 |
|  | 8                  | 10 | 0                               | 0  | 6  | 60 | 9  | 90  | 10 | 100 |
|  | 9                  | 8  | 0                               | 0  | 0  | 0  | 6  | 75  | 8  | 100 |
|  | 10                 | 8  | 0                               | 0  | 1  | 13 | 8  | 100 | 8  | 100 |
|  |                    | 55 | 0                               | 0  | 16 | 29 | 49 | 89  | 54 | 98  |
| VI<br>Ratones Quemados<br>Ps. A. * - Antisuero | 5                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  | 6                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 2  | 20  |
|  | 7                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  | 8                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 1  | 10  |
|  | 9                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  | 10                 | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 0  | 0   |
|  |                    | 60 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 0  | 0   | 3  | 5   |
| VII<br>Ratones Quemados<br>Ps. A. * - G. G. ** | 6                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 3  | 30  | 3  | 30  |
|  | 7                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 1  | 10  | 2  | 20  |
|  | 8                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 2  | 20  | 3  | 30  |
|  | 9                  | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 1  | 10  | 4  | 40  |
|  | 10                 | 10 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 2  | 20  | 4  | 40  |
|  |                    | 50 | 0                               | 0  | 0  | 0  | 9  | 18  | 16 | 32  |

Valor de p para las diferencias de mortalidades entre los siguientes grupos:

|         |        |          |        |           |        |
|---------|--------|----------|--------|-----------|--------|
| I vs V  | < 0.01 | I vs VI  | < 0.01 | I vs VII: | 0.50   |
| V vs VI | < 0.01 | V vs VII | < 0.01 | VI vs VII | < 0.01 |

\* Pseudomonas Aeruginosa.

\*\* Gamma Globulinas Humanas.



teriana" (Tabla 1, Grupo IV), tampoco modificó ni la precocidad (81% a las 12 horas), ni la elevada mortalidad total (81% a las 72 horas), observadas en los dos grupos anteriores quienes recibieron "toxina" sola, Grupo II (93% a las 72 horas), o una mezcla de "toxina-antisuero", Grupo III (82% a las 72 horas). Las diferencias entre las mortalidades de estos grupos no tienen valor estadístico (III vs. IV p: 0.7, II, vs. IV p: 0.1).

5. La infección producida por inoculación intraperitoneal de gérmenes vivos de Ps. A. (0.5 cc. de una suspensión que contiene  $1.7 \times 10^9$  gérmenes/cc. tabla 2, Grupo V) en animales quemados incrementó la mortalidad acumulativa a las 72 horas, del 28% (Tabla 1, Grupo I) hasta el 98% (Tabla 2, Grupo V). La diferencia entre ambas mortalidades tiene valor estadístico ( $p < 0.01$ ). De otro lado, este incremento en la mortalidad acumulativa se hizo presente muy precozmente, 12 horas después del trauma y de la inoculación de gérmenes (29%), y se incrementó progresivamente hasta alcanzar el 80% a las 48 horas, sin embargo no llegó a tener durante las primeras 24 horas la magnitud observada con la inyección intraperitoneal de "toxina" (Tabla 1. Grupos II, III y IV).

6. La inyección intraperitoneal de medio centímetro cúbico de una dilución de "antisuero" al 1%, 4 horas antes del trauma térmico y de la infección con Ps. A., protegió totalmente a estos animales del efecto letal de esta sepsis desde que descendió la mortalidad del 98% del grupo anterior (tabla 2, Grupo V) hasta el 5% a las 72 horas de observación. La diferencia entre ambas mortalidades es estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ). Además, esta mortalidad total del 5% es inferior a la observada en el grupo de animales solamente quemados (Tabla 1, Grupo I "control") la cual como se sabe llegó al 28%, diferencia en mortalidad que igualmente tiene significado estadístico ( $p < 0.01$ ).

Este último hecho sugiere dos posibilidades: 1) Que el "antisuero" corregiría los desequilibrios hemodinámicos propios de la quemadura, y 2) que la mortalidad observada en el grupo de animales solamente quemados, se debería en parte a infecciones sistémicas contra las cuales el "antisuero" empleado tendría algún efecto. Como se verá posteriormente, esta última hipótesis es la más probable desde que las gamma globulinas humanas no redujeron la mortalidad observada en los animales solamente quemados.

7. Cuando en lugar del "antisuero" se usaron gamma globulinas humanas, igualmente diluidas al 1% (Tabla 2, Grupo VII) se evi-

denció también un retardo en la mortalidad, la cual llegó al 32% a las 72 horas, en comparación con el 98% observado en el grupo de animales, quemados e infectados, sin tratamiento (Tabla 2, Grupo V). Las diferencias entre estas mortalidades tiene significado estadístico ( $P < 0.01$ ). Sin embargo, el descenso en la mortalidad total en estos animales (32%) no es sustancialmente diferente a la observada en aquellos que fueron quemados solamente, (p. 0.5), (28%) a las 72 horas (Tabla 1, Grupo I "Control") ( $P: 0.5$ ).

Si se compara la actividad protectora del "antisuero" y de los gamma globulinas humanas contra la acción letal de la Ps. A. en animales quemados, se observa que el "antisuero" ejerce una acción más vigorosa, 5% de mortalidad total en este último grupo en comparación con el 32% que ocurre en el que recibió gamma globulinas humanas. La diferencia entre estas mortalidades tiene valor estadístico ( $p < 0.01$ ). De esta comparación podría deducirse a priori, que el antisuero sería aproximadamente 6 veces más poderoso ( $32/5$ ) que las gamma globulinas humanas, y si se considera que la concentración de estas globulinas fue originalmente del 16% en relación con sólo el 6% contenido en el "antisuero", esta mayor actividad podría elevarse hasta 18 veces más. Sin embargo, este análisis no puede aceptarse como válido si no se soporta en pruebas experimentales adecuadas. De todos modos, este hecho indica que un porcentaje de los animales únicamente quemados pudo infectarse con Ps. A. durante el período de observación.

## DISCUSION

La incidencia de infecciones sistémicas producidas por gérmenes gram negativos en el hombre se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, (1), (3), (6), (8), (22), (28), (33), (49), (50). Hecho sorprendente es que, dentro de estos gérmenes existen especies cuyo poder patógeno es pobre, pero que, frente a determinadas condiciones del huésped adquieren notable virulencia, produciendo infecciones sistémicas en su gran mayoría fatales, tal el caso de la *Pseudomona Aeruginosa*, la cual constituye actualmente una seria amenaza en pacientes o animales con severas quemaduras y con deshidratación aguda o shock, (16), (18), (19), (22), (25), (26), (33), (37), (40), (47), (53).

En nuestro país, en especial en el Hospital del Niño en Lima, la incidencia de pacientes hospitalizados con quemaduras graves es alta, y, es en estos niños que la septicemia a *Pseudomona Aeruginosa* se hace

presente, produciendo una elevada mortalidad, la cual alcanza un promedio del 40%, igual experiencia reportan otros centros de tratamiento de quemaduras, (1), (6), (11), (14), (26), (28), (50).

Este hecho no tiene aún una explicación satisfactoria, sin embargo, trabajos clínicos y experimentales evidencian una incrementada susceptibilidad de los pacientes o animales quemados a la acción patógena de estos gérmenes, (1), (11), (37), (40), (52). El papel que juegan las alteraciones de la resistencia específica e inespecífica y la probable existencia de alguna toxina circulante en individuos quemados como factores condicionantes de esta mayor susceptibilidad, son problemas aún no resueltos y materia de activos trabajos de investigación, (1), (4), (5), (12), (13), (15), (18), (24), (25), (27), (30), (31), (35), (37), (47), (53), (54).

Esta mayor susceptibilidad de los pacientes quemados para desarrollar infección sistémica a gérmenes Gram Negativos, unido al hecho de que el empleo de una amplia variedad de antibióticos contra estas sepsis y, en especial, contra las producidas por la *Pseudomona Aeruginosa*, era poco eficaz y tal vez contraproducente, (19), (21), (29), (55), condujo al uso, en nuestro medio, desde 1956, de la inmunoterapia específica heteróloga (3), con sueros hiperinmunes preparados en conejos o caballos. Informes aún no publicados sobre este estudio revelan que con el uso de tales antisueros sobrevivieron el 32% de 40 pacientes quemados, quienes desarrollaron septicemias a *Pseudomona Aeruginosa*, en comparación con una sobrevivencia del 1% de 96 pacientes con igual sepsis y que fueron tratados con dosis adecuadas de los antibióticos usualmente empleados en estos casos y para quienes la *Pseudomona Aeruginosa* era sensible, (Colimicina, Polimixina y Geramcina), (7).

Aún cuando este resultado es alentador, plantea importantes interrogantes frente a su limitada actividad para combatir eficazmente estas septicemias. Dentro de los variados factores que pueden ponerse en juego para explicar este fenómeno, se deben mencionar: Título antibacteriano, dosis, vías de administración, oportunidad de su aplicación y, finalmente, la condición clínica del huésped. Recientemente, Liu, (28), ha descrito experimentalmente el incrementado poder invasivo de microorganismos gram negativos de escasa virulencia cuando se asocian con toxinas gram negativas homólogas o heterólogas, en este caso la seroterapia sería menos efectiva. Fuera de este rol condicionante de la sepsis no se ha evaluado el papel letal de la toxina por si misma.

En niños la evidencia clínica de que sus áreas quemadas son seriamente colonizadas con *Pseudomona Aeruginosa* antes de que aparez-

can síntomas de septicemia y la escasa correlación clínico-patológica en pacientes que murieron 4 a 5 días después de iniciada la septicemia, nos hizo pensar que, tal vez, alguna toxina de la *Pseudomona Aeruginosa* jugaría un rol muy importante en la configuración del cuadro clínico de la sepsis, y que, tal vez, este hecho sería decisivo para explicar el éxito sólo parcial del antisuero heterólogo en la clínica.

Los experimentos aquí descritos evidencian la falta de actividad antitóxica del antisuero frente a su notable poder antibacteriano. Este hallazgo abonaría la hipótesis planteada de que la toxina de *Pseudomona Aeruginosa* juega un papel importante en el condicionamiento de situaciones que hacen al antisuero ineficaz o incrementan la letalidad de estas sepsis en los niños quemados, y, de otro lado, sugiere que tal vez el empleo de un "antisuero" adecuado, con igual poder antitóxico y antibacteriano, ayudaría a solucionar el problema terapéutico de las infecciones sistémicas producidas por la *Pseudomona Aeruginosa* en la clínica.

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se condicionaron experimentos en ratones quemados de tal manera que, con adecuadas cantidades de gérmenes vivos de *Pseudomona Aeruginosa* o de sus toxinas, se produjeran mortalidades tan altas como del 80 a 100%, después de las 72 horas de producida la quemadura y el inóculo.

A estos animales, así estandarizados se les trató con gamma globulina de caballos (6%), inmunizados contra *Pseudomona Aeruginosa*, "antisuero", diluidas al centésimo y con gamma globulinas humanas al 16%, igualmente diluidas al centésimo. El grado de protectividad conferida por estos dos tipos de gamma globulina frente a los inóculos se evaluó por el descenso de la mortalidad que produjeron, en cada caso. De los resultados obtenidos de tales experimentos se dedujo:

1. El "antisuero" aplicado profiláctica o terapéuticamente no tiene ningún poder protectivo contra la acción letal provocada por las toxinas de la *Pseudomona Aeruginosa* inoculadas en ratones quemados.
2. El "antisuero" tiene acción protectora específica contra la infección a *Pseudomona Aeruginosa* provocada en estos animales.
3. Las Gamma Globulinas Humanas, tienen acción protectora inferior a aquella ejercida por el antisuero específico contra la sepsis a *Pseudomona Aeruginosa*.

4. La falta de actividad del antisuero frente a las toxinas de la *Pseudomona Aeruginosa* explicaría el éxito, solamente parcial, del uso de este "antisuero" en la clínica y sugiere un rol importante de las toxinas bacterianas en la configuración del cuadro clínico de estas sepsis.

### SUMMARY AND CONCLUSIONS

Experiments were conducted in burned mice in such a way that adequate quantities of live *Pseudomona Aeruginosa* germs or their toxins produced a mortality as 80 to 100% seventy-two hours after the burn and inoculation.

These standardized animals were given Anti-*Pseudomona Aeruginosa* Hyperimmune Horse Gamma Globulin (6%). "Antiserum", diluted to a hundredth or Human Gamma Globulin (16%) equally diluted. In each case, the protective activity resulting from these two types of gamma globulin treatment were evaluated by reduction of mortality. From the results obtained, the following was deduced:

1. The "anti-serum" applied prophylactically or therapeutically gives no protection against the total lethal action caused by the *Pseudomona Aeruginosa* toxins inoculated in burned mice.

2. The "anti-serum" has a specific protective action against *Pseudomona aeruginosa* sepsis provoked in these animals.

3. The Human Gamma Globulin has an inferior protective effect against that sepsis as compared to the specific anti-serum.

4. The lack of anti-serum activity against the *Pseudomonas Aeruginosa* toxins injected in burned mice, would explain its partial success in the treatment of *Pseudomona Aeruginosa* septicemia in burned patients.

### BIBLIOGRAFIA

1. Altemier, W. A. "Infections". Research in Burns. Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9. Washington, D. C. 1962.
2. Artunson, G. "Pathophysiological Aspects of the Burn Syndrome with Special Reference to Liver Injury and Alteration of Capillary Permeability". Act. Chr. Scand. Suppl. 274, 1961.
3. Bazán, A. "Estudio Clínico Experimental de las Infecciones a *Pseudomona Piocianica* en el Quemado". Rev. Hosp. del Niño. 70: 1-15, 1957.
4. Blatteberg, B., Levy, M.: "Mechanism of Depression of RES in Shock". Am. J. Physiol. 203: 11, 1953.
5. Blatteberg, B., Levy, M.: "Formation of a RES Depressing Substance in the Ischemic Intestine". Am. J. Physiol. 203: 11, 1953.

6. Bocanegra, M., Hinostroza, F., Bazán, A., Velarde, N., Yoza, V., Rosenthal, S. M.: "Convalescent Burns Plasma Therapy for Severely Burned Children *Ann. Surg.* 163: 462, 1966.
7. Bocanegra, M.: Trabajo en preparación.
8. Boisset B., G.: "Anatomía Patológica de la Infección a Bacilo Píocianico". *Rev. Hospital del Niño* 77: 7, 1959.
9. Cushing, L. E. and Campbell, D. H.: "Principles of Immunology" Mc Craw-Hill, Book Co., Inc. N. Y. USA. 1960.
10. Edwards, P. R., Ewing, W. H.: "Identification of Enterobacteriaceae". Burgers Publishing Company 2th. Edic. 1962.
11. Feller, I. and Ichiro, K.: "Pseudomona Vaccine and Hyperimmune Plasma in the Treatment of Burned Patients". *Surg. Forum* XV: 46, 1964.
12. Fine, J.: "The effect of Peripheral Vascular Collapse on the Bacterial Defense Mechanisms". *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 66: 329, 1956.
13. Fine, J.: "Endotoxins in Traumatic Shock". *Fed. Proc.* 20: 166, 1961.
14. Forkner, Jr., C. E.: "Pseudomonas Aeruginosa Infections". *Modern Medical Monography* 22, 1960. N. Y. and London.
15. Frank, E. D., Mac Donald, J. V., Palmerio, C., Scheinburger, F. D., and Fine, J.: "Effect of Hemorrhagic Shock on Viability of Invading Bacteria". *J. Prec. Sec. Exp. Biol. and Med.* 106: 394 1961.
16. Geppert, L. J., Baker, H. J., Capple, B. I. and Pulask, E. S.: "Pseudomonas Infection in Infants and Children". *J. Ped.* 4: 555, 1952.
17. Harlan Stene, H., Graber, C. E., Martin, J. D., Kole, L.: "Evaluation of Gamma Globulin for Prophylaxis against Burn Sepsis". *Surg.* 58: 810, 1965.
18. Igreda, J. B., Bocanegra, M., Velarde, N.: "Pseudomona Aeruginosa, Modificaciones de la Resistencia a la Endotoxina producida por el Trauma Térmico". *Ann. Facultad de Medicina. Lima, Perú.* 49: 440, 1966.
19. Jawetz, E.: "Infection with Ps.A. Treated with Polyxin B" *Arch. Int. Med.* 89: 90, 1952.
20. Jones, J. R. and Lowbury, F.: "Antiserum for Prophylaxis Against Infection with Pseudomona Aeruginosa (Pyocyanea)". *Second International Congress for Research in Burns, Edinburgh, Sep. 1965.*
21. Kefalides, N., Arana, J., Bazán, A., Stastny, P.: "Clinical Evaluation of Antibiotics and Gamma Globulin in Septicemia Following Burns". *Research in Burns. Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9, Washington, D. C., 1962.*
22. Kefalides, N., Arana, J., Bazán, A., Bocanegra, M., Stastny, P., Velarde, N.: "Role of Infection in Mortality from Severe Burns. Evaluation of Plasma, Gamma Globulin, Albumin and Saline Solution therapy in a Group of Peruvian Children". *Bew Eng. Med.* 267: 317-389, 1962.
23. Kohn, J.: "A study of Pseudomona Pyocianea Gross Infection in a Burns Unit". *Second International Congress for Research in Burns. Edinburgh, Sep. 1965.*
24. Landy, M. "Increase in Resistance Following Administration of Bacterial Lipopolisaccharides". *Ann. N. Y. Acad. Ss.* 66: 2929, 1956.

25. Lechtic, G. A.: "Respuesta Celular al Trauma Térmico y su Modificación por Activadores Inespecíficos del RES". Tesis Bach. Facultad de Med. Univ. Nac. de Trujillo. 1965.
26. Liedberg, N. C. F., Reis, E. and Artz C. P.: "Infection in Burns, III Septicemia a Common Cause of Death". *Surg. Gyn. Obst.* 99: 151, 1954.
27. Liedberg, G. C.: "Antibacterial Resistance in Burns, II. The Effect on Inespecific Humoral Defense Mechanisms, Phagocytosis and the Development of Bacteremia, An Experimental Study in the Guinea Pig". *Act. Chr. Scand.* 121: 351, 1961.
28. Liu Chun, Hsiang, Hsu Chien-Yin, Ch'en Hsing-Min and Shu Chum: "Studies on Septicemia in Extensive Burns". *Chinesse Medical Journal.* 83: 779, 1964.
29. Lowbury, F.: "Prevention and Treatment of Infection in Burns". *Research in Burns.* Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9, Washington, D. C. 1962.
30. Malm. O. J.: "Burns Toxins and Convalescent Serum". *Research in Burns.* Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9, Washington, D. C. 1962.
31. Malt, R. and Cope, O.: "Antibody Production After Certain Forms of Trauma". *Surg.* 39: 959, 1956.
32. Markley, K., Bocanegra, M., Bazán, A., Temple, R., Chiappori, M., Morales, G. Carrión, A.: "Evaluación Clínica de la Terapia Salina en el Shock por Quemaduras". *Ann. Facultad de Med. de Lima, Perú.* 38: 1182, 1955.
33. Markley, K., Gurmendi, G., Mori Chávez, P. and Bazán, A.: "Fatal Pseudomonas Septicemia in Burned Patients". *Ann. Surg.* 145: 175, 1957.
34. Markley, K., Bocanegra, M. Bazán, A., Temple, R., Chiappori, M., Carrión, A.: "Clinical Saline Solution Therapy in Burn Shock. II Comparison of Plasma Therapy with Saline Solution Therapy". *J. A. M. A.* 170: 1633, 1959.
35. Markley, K.: "Importance of infection and Hots Resistance on Mortality Saline Solution Therapy in Burn Shock". II. Comparison of Plasma Therapy with Saline Solution Therapy. *J. A. M. A.* 170: 1633, 1959.
36. Markley, K., Kefalides, N. A.: "Further Studies in the Evaluation of Saline Solutions in the Treatment of Burns Shock". *Research in Burns.* Ed. T. by C. P. Pub. N° 9 Washington, D. C. 1962.
37. Mc. Ripley, J. R. and Garrison, A. M.: "Increased Susceptibility of Burned Rats to Pseudomona Aeruginosa". *Proc. Sec. Exp. Biol. and Med.* 115: 336, 1964.
38. Millican, R. C., Rust, J., Rosenthal, S. M.: "Gamma Globulin Factors". Protective Against Infections from Pseudomona and other Organisms". *Science* 136: 509, 1957.
39. Millican, R. C. M. and Rust, J.: "Efficacy of Rabbit Pseudomona Antiserum in Experimental Ps.A. Infection". *J. Inf. Dis.* 107: 389, 1960.

40. Millican, R. C.: "Role of the Infection on the Delayed Deaths of Mice Following Extensive Burn Injury". Research in Burns. Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9, Washington, D. C. 1962.
41. Millican, R. C., Rosenthal, S. M., Rust, J., Jansky, R. C.: "Effects of Chloramphenicol Human Gamma Globulina and Burn Convalescent Serum on the Delayed Deaths of Mice Following extensive Burn Injury". Ann. Surg. 157: 20, 1963.
42. Moyer, C. A., Margraf, H. W. and Monafó, W. A., Jr.: "Burn Shock and Extravascular Sodium Deficiency Treatment with Ringer's Solutions Lactate". Arch. Surg. 90: 799, 1965.
43. Phillips, A. W., Cope, O.: "Analysis of the Effect of Burn Therapy on Burn Mortality". Research in Burn. Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9, Washington, D. C. 1962.
44. Rosenthal, S. M.: "Experimental Chemoterapy of Burns and Shock, III Effects of Systemic Therapy on Early Mortality" U. S. A. Public Health Reports. 58: 513, 1943.
45. Rosenthal, S. M., Millican, R. C., Rust, J.: "A Factor in Human Gamma Globulin Preparations Active Against Ps. A. Infections". Prec. Soc. Exp. Biol. and Med. 94: 214. 1957.
46. Rosenthal, S. M.: "The Protective Effects of Human Gamma Globulin Against Infection by Ubiquiteus Microorganism in Mice". Immunity and Resistance Infection in Early Infancy". Report of the Twenty-ninth Ross Pediatric Research Conference, pág. 90, 1959.
47. Schweimbur, F. and Fine, J.: "The Effect of Transitory Vascular Collapse on Sensibility to Endotoxin". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88: 589, 1955.
48. Sorensen, B. and Sejren, P.: "Saline Solution in the Treatment of Burns Shock". Act. Chr. Scand. 129, 1965.
49. Tai Tze-Ying, Wang Fu, Juan Man, Ch'en Yi and Chin-T'ao: "Pseudomonas Aeruginosa Septicemias". Chinese Med. J. 83: 395, 1964.
50. Tumbusch, W. T., Vohel, J. R. M., Butkiewicz, J. V., Graber, C. D., Larson, D. K., Mitchel, Jr., E. T.: "The Rising Incidence of Pseudomonas Septicemia Following Burn Injury" Research in Burns. Edit. by C. P. Artz. AIBS. Pub. N° 9, Washington, D. C. 1962.
51. Verder, E., Evans, J.: "A proposed Antigenic Schema for the Identification of Strains of Pseudomonas Aeruginosa". J. Inf. Dis. Sep-Oct. 1961.
52. Verder, E., Rosenthal, S. M., Millican, R. C., Rust, J.: "Role of Infection in the Delayed Deaths of Mice Following Extensive Burn Injury". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108: 501, 1961.
53. Warner, G. F., Dobson, E. L.: "Disturbance in the Reticulo Endothelial System Following Thermal Injury". Amer. J. Phys. 179: 93, 1954.
54. Weir, D.: "Immunological Reaction after Tissue Injury Second International Congress for Research in Burns. Edinburg, Sep. 1965.
55. Yow, E. M.: "Development of Proteus and Pseudomonas Infections During Antibiotic Therapy". J. A. M. A. 149: 1184, 1952.