

PSEUDOMONA AUREOGINOSA

Modificaciones de la Resistencia a la Endotoxina producidas por el trauma térmico en ratones

JORGE B. IGREDA, MANUEL BOCANEGRA y NICOLÁS VELARDE *

El tratamiento de extensas y severas quemaduras (más del 10%) de la superficie corporal, en las últimas décadas ha logrado significativos avances (1). Estos éxitos se han obtenido particularmente en el tratamiento del shock, permitiendo una notable disminución de la mortalidad precoz.

Entre los equipos de investigadores que han contribuido notablemente en estos avances, tenemos a los que integran el Proyecto Perú de Investigación en Quemados (Perú Burns Project y Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina) cuyos trabajos experimentales (2, 3) y clínicos (4, 5) constituyen pilares fundamentales en este campo.

Sin embargo, la evidencia clínica demuestra que gran número de pacientes que sobreviven a la fase aguda del trauma, fallecen posteriormente por infección sistémica (23, 24) debido principalmente a gérmenes gram negativos (18, 24). Experimentalmente este hecho ha sido igualmente estudiado. Rosenthal y colaboradores (2, 6) encontraron que la septicemia a gérmenes gram negativos, pero diferentes a los que usualmente contaminan a los humanos, es un importante factor en la muerte tardía de ratones quemados y que ciertos agentes quimioterápicos y seroterápicos son efectivos en la promoción de la supervivencia.

Esta incidencia de infecciones sistémicas en pacientes y animales que sufrieron quemaduras plantea la posibilidad de un cierto grado de susceptibilidad de hombres y animales quemados al desarrollo de infecciones sistémicas?

* Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La susceptibilidad de animales quemados ha sido estudiada por Goshi y asociados para el estafilococo aureus (7, 29) y, por Liedberg y otros para la seudomona aureoginosa (5, 8, 9, 19).

Existe pues clara evidencia que la resistencia natural a la infección es marcadamente disminuida por el trauma, ya sea por quemadura o por torniquete (19, 20, 38, 45).

Aún cuando no existe acuerdo unánime sobre las razones de esta disminuida resistencia, es probable que los siguientes factores jueguen un papel preponderante: 1) El extensivo daño de la piel como puerta de entrada de microorganismos patógenos y, 2) La disminución de la capacidad humoral tisular de defensa frente a bacterias de baja virulencia desde las áreas quemadas a otros tejidos donde existen normalmente sin provocar infección (17, 28, 29, 30, 31, 34). Estas dos interrogantes no han sido todavía resueltas.

Desde que la seudomona aureoginosa o sus productos tóxicos son altamente responsables de la mortalidad que se produce en pacientes quemados, no sólo en nuestro medio sino también en otros países (16, 17, 13) era importante determinar el grado de susceptibilidad que el trauma térmico provoca en pacientes a la acción de la endotoxina producida por la seudomona aureoginosa.

Estudios experimentales de Markley y colaboradores (33) en ratones quemados que recibieron endotoxina de E. Coli, demuestran que la letalidad por la endotoxina de esta bacteria gram negativa, es 1000 veces mayor en ratones quemados que en los no quemados.

El presente trabajo tiene como finalidad valorar experimentalmente en animales el grado de susceptibilidad producido por el trauma térmico, a la endotoxina gram negativa de la seudomona aureoginosa, desde que esto podría jugar importante rol en la producción del Shock al lado de los disturbios iónicos (27, 26, 23), y en la conformación de la compleja sintomatología observada durante el desarrollo de la septicemia a seudomona aureoginosa, cuyas lesiones histológicas aún no tienen comprobación.

ESTUDIO BIOLÓGICO DE LA PSEUDOMONA AUREOGINOSA

Como el presente trabajo trata de aplicación experimental de las endotoxinas de la seudomona aureoginosa en ratones quemados, creemos necesario hacer una breve revisión de las características de este germen.

El bacilo púrpura fue descubierto por Gessar en 1882, es un bacilo corto, de 1 -- 1.5 u de longitud por 0.5 u de ancho. Se presenta

reunido en pequeñas masas, se colorea bien con los derivados de anilina, pero no toma el gram, es móvil, no da esporas, es aerobio aunque hay algunas cepas anaerobias con las características éstas últimas que no dan pigmento, se desarrollan bien en todos los medios usuales de laboratorio a la temperatura de 37°C.

Entre sus propiedades biológicas tenemos que mueren a 55°C. durante una hora de exposición, siendo más resistentes que otros gérmenes gram negativos a los antisépticos usuales. El ácido láctico al 1% lo mata rápidamente de las lesiones superficiales. Producen una catalasa, una proteinasa y una creatinasa; la proteinasa explica la licuefacción de los tejidos destruidos por la endotoxina.

Los pigmentos son los productos metabólicos más característicos. Este grupo *seudomona* produce un pigmento fluorescente verde amarillento que es soluble en agua, pero no en cloroformo (La fluorasina) y otro pigmento verde azulado, la piocianina que se extrae de la solución acuosa por el cloroformo. Algunas cepas sintetizan un pigmento rojo la piorrubina, la cual es soluble en agua, pero insoluble en cloroformo.

En cuanto a su estructura antigénica diremos que no existe acuerdo común, pero estudios preliminares hechos por un grupo de investigadores (Mayr Harting y Muñoz J.), señalan que las especies del género *seudomona* se podrían clasificar en grupos por sus antígenos O y H.

Su tipificación final no está bien definida y existen 2 tendencias actuales: 1) Serología y 2) Fagos.

Habitante ocasional del intestino del hombre y diversas especies animales, también se halla en la piel. Puede existir en el aire y el suelo. Los cultivos esterilizados por filtración y calor son tóxicos para el conejo (38).

BREVE DESCRIPCION DEL CUADRO DE SEPTICEMIA A SEUDOMONA AUREOGINOSA

Clínicamente el cuadro de infección séptica se inicia generalmente entre el tercero y quinto día después del accidente, sin existir estrecha correlación con la extensión o profundidad de la superficie corporal comprometida. Sin embargo, su aparición es más frecuente en quemaduras extensas y profundas.

Infección Focal. En las áreas quemadas se observa secreción verde amarillenta o verde azulada, según sea el tipo de pigmento que

predomine (necrosis focal), acartonado, disminuyendo desde este momento la secreción. Concomitantemente puede o no existir fiebre. Estos síntomas generalmente aparecen entre el 3º y 4º día después del accidente.

Infección Sistémica. La temperatura se eleva hasta 40°C., hay gran excitación, delirio, sed intensa, vómitos alimenticios, polipnea, taquicardia, distensión abdominal, oliguria y a veces diarrea. Esto dura de 24 a 36 horas, después de las cuales la temperatura desciende a menos de 36°C., y la presión arterial igualmente puede descender.

Concomitantemente se observa la formación de "nódulos" subdérmicos, dolorosos, de color rojo al principio, violáceo después, del diámetro y tamaño generalmente de una arveja que ocasionalmente presenta una flictena.

Estos nódulos se ulceran en su parte central llenándose de secreción serosa al mismo tiempo que aumenta en su base tomando un color rojo vinoso.

Al final de esta fase la temperatura continúa por debajo de 36°C, la polipnea se acentúa, la distensión abdominal aumenta, hay taquicardia y ocasionalmente anuria, y el sensorio se encuentra comprometido. Rápidamente se llega al coma con o sin shock y muerte.

Entre estos agentes, los Drs. Rosenthal y Millican demuestran el rol protector de la gamma globulina contra la infección (12, 13) y, posteriormente, Kefalides Et Al (14), reducen la mortalidad tardía principalmente en niños quemados menores de 3 años, mediante el empleo de plasma y gamma globulinas.

Pero, aún cuando con el empleo de gamma globulinas o plasma se reduce la mortalidad tardía en niños quemados, la aparición de infecciones sistémicas producidas por bacterias gram negativas y especialmente la *seudomona aureoginosa*, ha creado un serio problema en la terapéutica de estos pacientes. Esta infección ha sido demostrada ser generalmente fatal cuando se trata convencionalmente con antibióticos a los cuales este microorganismo es sensible. Este problema que no solamente es nuestro, sino que actualmente está difundido en otros centros de quemados surgieron cuidadosa evaluación.

Desde hace varios años se está probando un antisuero polivalente en nuestro medio, preparado en conejos y caballos, contra la *seudomona aureoginosa*, el cual ha sido empleado con relativo éxito (15, 16). Igualmente Feller y colaboradores (53) han empleado el antisuero preparado en humanos para la profilaxia de esta infección.

PROBLEMA ACTUAL DE LA MORTALIDAD PRODUCIDA POR QUEMADURAS

El problema actual de la mortalidad producida por quemaduras se circunscribe a: 1) Disurbio de líquidos y electrolitos o período de choque (las primeras 48 horas) y 2) Las infecciones que complican la evolución natural de los pacientes, como mortalidad tardía (Posteriormente a las 48 horas) (22).

Mortalidad por Shock. La evidencia experimental del disturbio de líquidos y electrolitos como una causa principal de la mortalidad durante el período de choque, está respaldado ampliamente por los trabajos experimentales de Rosenthal, Tabor y Millican quienes demuestran que una terapia con grandes volúmenes de soluciones salinas isotónicas de cloruro de sodio sin potasio, previenen la muerte del 85% de ratones con quemaduras extensas, de más o menos el 70% de superficie corporal y por 7 segundos. (19, 21, 27).

Además Oldstones (20) en experimentos en ratones que han recibido endotoxina después de un tratamiento subletal con torniquete, demuestra que la administración profiláctica de una solución salina isotónica reduce la mortalidad de los mismos.

Las evidencias contradictorias de Prizmeil (36) probablemente se debieran a un inadecuado empleo de soluciones salinas en animales a quienes se les quemó con agua hirviendo por 30 segundos a 3 minutos, pero dejan entrever la existencia de probables factores concomitantes al desequilibrio de fluidos.

Igualmente Carthy (25), trata de demostrar la importancia del empleo de sangre y plasma en el tratamiento de los quemados y reporta que el 100% de un pequeño grupo de ratas con quemaduras fatales de la región dorsal, producida por agua hirviendo, fueron salvadas durante el período de choque con la administración intravenosa combinada de sangre, plasma, lactato de sodio y cloruro en solución, e insisten que la profilaxia antibiótica no fue efectiva e incluso produjo efectos contraproducentes (10, 11).

Mortalidad tardía. Millican (12, 19) demuestra el rol de la infección en la mortalidad tardía y señala el valor de ciertos agentes terapéuticos en la supervivencia de animales quemados, los efectos terapéuticos de estos agentes presumiblemente es derivado de su acción antibacteriana (12, 19, 6).

MATERIAL Y METODOS

Material. En este trabajo se emplearon ratones albinos suizos, hembras, proporcionados por el Instituto de Higiene, con un peso de 18 a 20 gramos; todos ellos tuvieron libre acceso a comida y agua en todas las oportunidades. Durante el experimento permanecieron en sus respectivas jaulas las que se esterilizaban y flameaban cada 24 horas.

Anestesia. Fue producido por éter anestésico (May Packert D) el cual era colocado en un algodón embebido en el fondo de un recipiente de vidrio, por encima del mismo se colocó una malla de alambre para que el ratón no se mojara con el anestésico. El tiempo de anestesia fue de 10 a 20 segundos aproximadamente.

Técnica de quemadura. La quemadura fue producida al sumergir el ratón en un recipiente conteniendo agua a una temperatura de 70°C., para lo cual se tomaba al ratón con 2 pinzas del tercio distal de los miembros anteriores e introduciendo en el recipiente las extremidades posteriores y el rabo hasta la altura de ambos ilíacos (aproximadamente 30% de superficie corporal), el tiempo de permanencia del ratón en el agua fue de 7 segundos.

Una vez realizada la quemadura los ratones se colocaban en una caja de latón previamente esterilizada y conteniendo viruta estéril.

Obtención de toxinas. La obtención de la endotoxina de la *seudomona aureoginosa* se realizó según la siguiente técnica: Se tuvieron cultivos de *seudomona aureoginosa* T-488 (Verder) en 100 ml de caldo (Brain Heart Infusión) a 37°C por 72 horas, al final del cual se centrifuga a más 4°C., a 3,000 r.p.m. por 20 minutos y el sobrenadante se esteriliza a través de un filtro de Seitz Filtered N° 32506 con un poro de 0.1 μ .

Este filtrado se guarda en varios tubos en nevera a 4 - 10°C y contiene la endotoxina de la *seudomona aureoginosa*.

Se empleó la cepa T-488 por ser la *seudomona aureoginosa* que más frecuentemente produjo infecciones sistémicas en el servicio de quemados del Hospital del Niño en los últimos años (38).

Grupos de Experimentación. Se hicieron los siguientes grupos de experimentación:

Grupo I. Ratones sanos a quienes se les inoculó 0.5 ml. de toxina de *seudomona aureoginosa* intraperitonealmente.

Grupo II. Ratones a quienes se les quemó 30% de superficie corporal, tal como se describe en párrafos anteriores, y 30 minutos después fueron inyectados intraperitonealmente con 0.5 ml. de caldo estéril para hemocultivo (Brain Heart Infusión).

Grupo III. Ratones quemados igual que el grupo II, a quienes 30 minutos después se les inyectó 0.5 ml. de toxina de la *seudomona aureoginosa* intraperitonealmente.

Grupo IV. Ratones quemados igual que los grupos II y III, a los cuales 24 horas después de efectuada la quemadura se les inyectó 0.5 ml. de toxina de *seudomona aureoginosa* intraperitonealmente.

RESULTADOS

Se realizaron en total cinco experimentos, obteniéndose los resultados que se expresan en la tabla N° 1 y el diagrama N° 1.

Analizando estos resultados podemos decir que:

1° El grado de mortalidad para el grupo de ratones sanos e inoculados con endotoxina de *seudomona aureoginosa* fue de 3% a las 36 horas y de 15% a las 48 horas.

2° En el grupo de ratones quemados que recibieron 0.5 ml. de caldo de cultivo estéril intraperitonealmente, se encontró 2.9% de mortalidad a las 12 horas, esta mortalidad aumenta progresivamente hasta un 17.6% a las 48 horas y estaría en relación con el mismo trauma térmico, desequilibrio hidrosalino y posteriormente a infecciones sobreagregadas.

3° El grupo III, presenta una mortalidad muy alta 12 horas después de la inyección de la toxina de *seudomona aureoginosa* I. P. y corresponde a 88%. Desde este momento la letalidad aumenta en forma progresiva hasta llegar a 94% a las 48 horas.

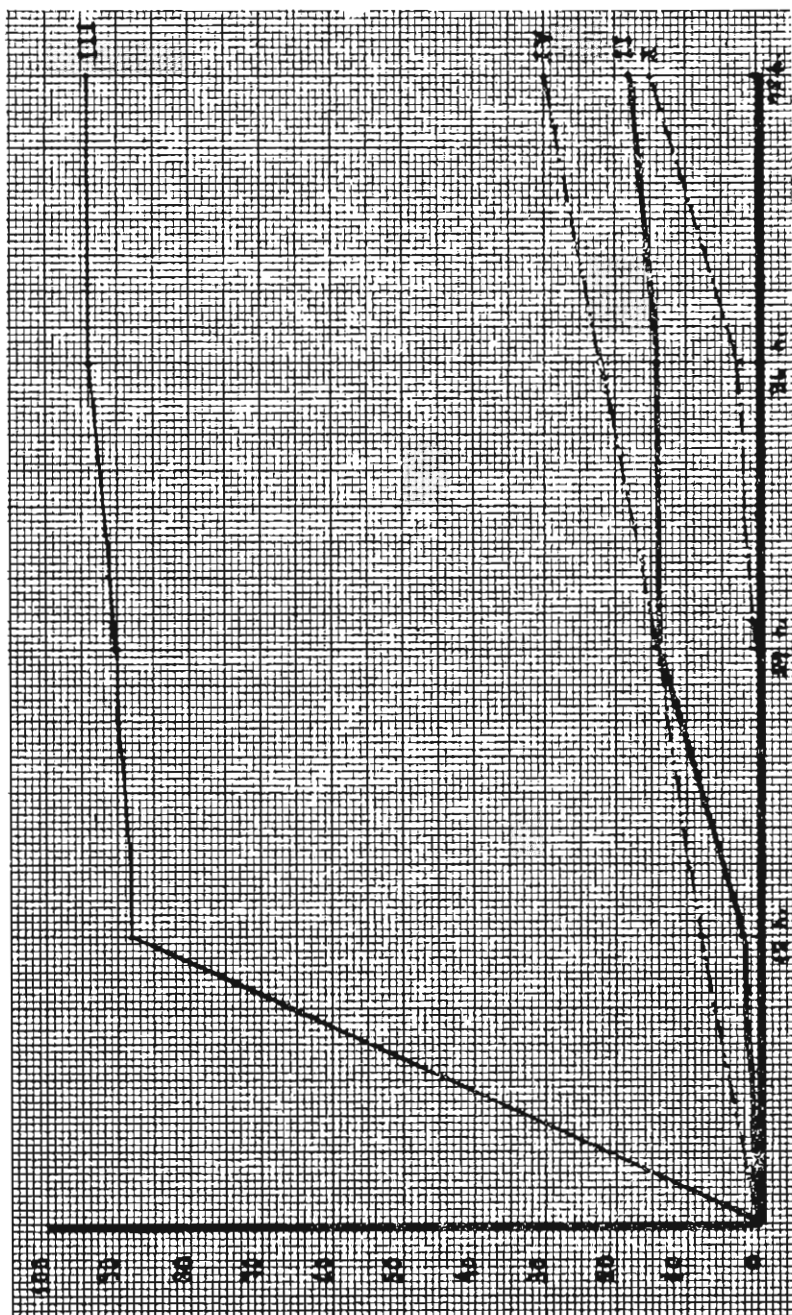
La diferencia de mortalidad entre los grupos II III son altamente significativos, a las 12 horas el valor de $p = -0.01$ y a las 48 horas $p = -0.01$.

4° El grupo de ratones quemados que recibieron endotoxina de *seudomona aureoginosa* 24 horas después de producido el trauma térmico se encontró 14% de mortalidad a las 24 horas, luego asciende hasta llegar a 30% a las 48 horas. Analizando la mortalidad de los grupos II y IV dentro de las primeras 24 horas, se observa que son iguales: 14.5% y 14% respectivamente.

Grupo	Nº Exp.	Nº Rat.	MORTALIDAD							
			Tiempo (horas) después de la Inoculac.							
			12		24		36		48	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
I. Ratones sanos + 0.5 ml. de endotoxina de Ps. Aureoginosa.	1	6	0	0	0	0	0	0	2	33.3
	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	7	0	0	0	0	1	14.2	2	28.5
	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	10	0	0	0	0	0	0	1	10
		33	0	0	0	0	1	3%	5	15%
II. Ratones quemados 30% + 0.5 ml de caldo estéril + 30 minutos.	1	6	0	0	2	33.3	2	33.3	3	15.0
	2	6	1	16.6	2	33.3	2	33.3	2	33.3
	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	7	0	0	1	14.2	1	14.2	1	14.2
	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
		34	1	2.9	5	14.7%	5	14.7%	6	17.6%
III. Ratones quemados 30% + 0.5 ml. de toxina de Ps. Aur. + 30 minutos.	1	11	11	100%	11	100%	11	100%	11	100%
	2	9	8	88.8	8	88.8	8	88.8	8	88.8
	3	10	9	90	10	100	10	100%	10	100%
	4	10	7	70	7	70	8	80	8	80
	5	10	9	90	9	90	10	100	10	100%
		50	44	88%	45	90%	47	94%	47	94%
IV. Ratones quemados 30% + 0.5 ml. de toxina de Ps. Aur. + 24 horas.	1	11	2	18	4	36.3	4	36.3	4	36.3
	2	9	0	0	0	0	1	11.1	2	22.2
	3	10	1	10	1	10	2	20	4	40
	4	10	0	0	0	0	0	0	1	10
	5	10	1	10	2	20	4	40	4	40
		50	4	8%	7	14%	11	22%	15	30%

RESULTADOS ESTADÍSTICOS

				12 h.	48 h.
II vs. III	—	PV	—0.01	—0.01	
II vs. IV	—	PV	—0.90-0.95	—0.05-0.02	



I = Ratonés sanos más toxina 0.5 ml. I.P. (33)

II = Ratonés quemados más 0.5 ml. caldo + 30 minutos (34)

III = Ratonés quemados más 0.5 ml. Toxina I.P. + 30 minutos (50)

IV = Ratonés quemados más 0.5 ml. Toxina I.P. + 24 horas (50).

La mortalidad encontrada en el grupo IV a las 48 horas parece corresponder a la suma de los resultados de los grupos I y II, pero esta suposición se puede descartar desde que la endotoxina no produce mortalidad en los ratones sanos durante las primeras 24 horas.

Comparando estadísticamente los resultados de los grupos II y IV encontramos: valor de $p = 0.90 - 0.95$ a las 12 horas y $p = 0.05 - 0.02$ a las 48 horas (40).

De los resultados de este trabajo podemos concluir, que el trauma térmico sensibiliza al organismo a la inyección de la endotoxina de *seudomona aureoginosa* y que este poder de sensibilización disminuye con el transcurso del tiempo, es decir, que, cuando se inyecta la endotoxina más cerca de producido el trauma térmico la sensibilidad es mayor.

DISCUSION

El presente trabajo demuestra el aumento de la susceptibilidad de los ratones quemados a las endotoxinas de la *seudomona aureoginosa*, con mayor intensidad dentro de las primeras 12 horas y que disminuye en las 36 horas subsiguientes.

Esta susceptibilidad podría explicarse como debida a una falla de los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos, tales como la depresión de la capacidad fagocítica del RES (46, 47), aumento de la permeabilidad capilar (32), y el shock producido por Trauma Térmico.

Hay pocos estudios sobre el rol de shock traumático en la baja de las defensas del huésped a la infección, Miles (29) demuestra que los cuyes chocados por diferentes métodos fueron más susceptibles a la infección por: estafilococo aureus por un cierto período que los cuyes que estaban normales. Estudios en animales de experimentación expuestos a la irradiación o choque hemorrágicos han mostrado una reducción en la resistencia normal del huésped (30, 31).

El papel desempeñado por el shock en las modificaciones de los mecanismos de defensa inespecíficos como un factor principal es referido por Blattberg et al (50) y Fine (44).

La sorprendente reducción de las defensas de las ratas a la *seudomona aureoginosa* según los estudios de Mac Ripley (17) y en nuestro caso a las endotoxinas de la misma, sería debido probablemente a la alteración o deterioro de los mecanismos de defensa normales del huésped adversamente afectados por el choque producido por la quemadura y el trauma.

Liedberg (9) demostró y cuantificó en cuyes quemados, el aumen-

lo de su susceptibilidad a la infección por *Ps. Aur.* en comparación con los animales normales.

Artunson (32) ha demostrado en las ratas quemadas que, la permeabilidad capilar está aumentada en las áreas quemadas como en las no quemadas, de este modo una posible explicación para el aumento de la susceptibilidad de los ratones quemados a la endotoxina inyectada intraperitonealmente estaría sugerido por los trabajos de Artunson (45, 38).

Mac Ripley (17) en sus trabajos observó que las quemaduras producen un cambio dramático en la susceptibilidad de las ratas a la *seudomona aureoginosa* y, este período de incremento de la susceptibilidad dura más o menos 24 horas.

Igualmente Millican (19) demostró que tal aumento de la susceptibilidad de los ratones quemados era sistémico, y posteriormente halló que, dicho aumento de la susceptibilidad era máximo en las primeras 24 horas y luego disminuía progresivamente de intensidad hasta que, a los 8 días de la injuria, la resistencia del ratón quemado al inóculo de *Ps. Aur.* era similar al ratón normal (50).

Otro factor responsable del aumento de susceptibilidad del ratón quemado a la endotoxina de la *Ps. Aur.* estaría dado por la depresión de los mecanismos de defensa específicos, tal presunción se apoya en el efecto protector inducido por la *gamma globulina*, tanto experimental (12, 13, 14) como clínica (14), profiláctica y, terapéuticamente, disminuyendo la mortalidad tardía y la incidencia de septicemia.

Por la quemadura también se alteraría la resistencia inespecífica, y en este aspecto Dobson (46) ha logrado evidencias fundamentales. Realizó un estudio completo de la actividad fagocítica en perros quemados y encontró una notable disminución de dicha capacidad, que empezaba inmediatamente después de la quemadura y que progresivamente se iba acentuando hasta llegar a un mínimo de fagocitosis a las 8 horas en que era 14% de lo normal.

Igualmente, Liedberg (9), a pesar de que no pudo encontrar diferencias en la actividad bactericida del plasma de animales quemados y normales, comprobó que los cuyes quemados en contraste con los normales, habían perdido su capacidad para esterilizar el torrente sanguíneo cuando eran inoculados con *seudomona aureoginosa*. Estos hallazgos nos permiten afirmar que la quemadura produce alteraciones en el RES.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo están de acuerdo con los trabajos de Markley (38) y colaboradores, los cuales al estu-

diar los efectos de la endotoxina de la *E. Coli* en ratones quemados, encuentran que las endotoxinas de esta bacteria son más letales en los ratones quemados que en los sanos.

De este modo, podemos definir la mayor susceptibilidad de los ratones quemados a la endotoxina de la *seudomona aureoginosa*, como el resultado del poder tóxico de la misma endotoxina y de otro lado, la depresión sistémica de los mecanismos de defensa. Y su posible importancia en el desarrollo del cuadro de septicemia por *seudomona aureoginosa*.

SUMARIO

Se comprobó un marcado incremento del índice de mortalidad de los ratones quemados a quienes se les inyectó la endotoxina de *seudomona aureoginosa* 30 minutos después de producido el trauma térmico, cuando la toxina fue inyectada 24 horas después del trauma térmico el índice de mortalidad es menor.

Los factores que contribuyen al aumento de la susceptibilidad de los ratones quemados por el trauma térmico a la endotoxina de la *seudomona aureoginosa*, estarían dados por: 1) El shock, 2) Disminución de los mecanismos de defensa específicos e inespecíficos y 3) Al mismo poder tóxico de la endotoxina.

CONCLUSIONES

1º El trauma térmico sensibiliza al organismo a la endotoxina de la *seudomona aureoginosa* inyectada intraperitoneal 30 minutos después de producido el trauma térmico.

2º En estas condiciones experimentales la mayor mortalidad se observo durante las primeras 12 horas, aún cuando siguió incrementándose discretamente en las 36 horas siguientes.

3º Experimentalmente cuando se inyectó la toxina de *seudomona aureoginosa* 24 horas después de producido el trauma térmico, se encontró un ligero aumento del índice de mortalidad de los ratones quemados.

4º En las primeras 24 horas los ratones sanos son altamente resistentes a la endotoxina de la *seudomona aureoginosa*.

5º El caldo de cultivo estéril, no modifica la muerte por shock en los ratones quemados.

6º Los resultados obtenidos entre la comparación de los grupos I y III, II y IV a las 48 horas, tienen valor estadístico.

BIBLIOGRAFIA

1. Phillips, A. W., and Cope, O. An analysis of the effect of burn therapy on burn mortality. En *Research in Burns* (pp. 1 -5). Edit. by Curtis P. Artz, Amer. Inst. Biol., Washington, 1962.
2. Rosenthal, S. M. Experimental Chemotherapy of burns and shock. III. Effects of Systemic Therapy on early mortality. *Public Health Report*. 58: 513 - 22, 1943.
3. Rosenthal, S. M. Experimental Chemotherapy of burns and shock. IV. Production of traumatic shock in mice. V. Therapy with mouse serum and sodium salts. *Public Health reports*. 1429 - 36, 1943.
4. Markley, K., Bocanegra, M., Bazán, A., Temple, A., Chiappori, M., Morales, G., Carrión, A. La evaluación clínica de la terapia salina en el shock por quemaduras. *Ann. Fac. Med. (Perú)*. 38: 1182 - 94, 1955.
5. Millican, R. C. Fluid Electrolytes and Plasma Proteins Disturbance in shock. *The Biochemistry response to Injury. Symposium Blackwell Sc. Oxford* (pp. 269 - 73). 1960.
6. 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 - 7, 1961.
7. Goshi, K., Cluff, L. E., Johnson, J. E., Conti, C. R. Studies on the Pathogenesis of Staphylococcal Infection. II. The effect of non-Specific Inflammation. *J. Exp. Med.* 113: 249 - 57. 1961.
8. Altmaier, W. A. Infections en *Research in Burns* (pp. 411 - 3). Edit. by Curtis P. Artz, Amer. Inst. Biol., Washington. 1962.
9. Liedberg, C. F. Antibacterial resistance in burns. I. The effects of intraperitoneal infection on survival and the frequency of septicemia. *Ann. Experimental study in the guinea pig. Acta Chir. Scandinav.* 120: 88 - 90, 1960.
10. Lowbury, E. J. L. Prevention and Treatment of infections in burns. en *Research in Burns* pp. 242 - 7). Edit. by Curtis P. Artz, Amer. Inst. Biol., Washington, 1962.
11. Yow, E. M. Development of Proteus and Pseudomonas infections during antibiotic Therapy. *JAMA* 149: 1184 - 88, 1952
12. Millican, R. C., Rosenthal, S. M., Rust, J., Jansky, R. C. Effect of chloramphenicol, human gamma globulina and burn convalescent serum on the late deaths of burn mice. *Ann. surg.* 157: 20 - 6, 1963.
13. Rosenthal, S. M., Millican, R. C., and Rust, J. A. Factor in human gamma globulina preparations active against pseudomona aureoginosa infections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 94: 214 - 17. 1957.
14. Kefalides, Arana, Bazán, Stastny. Clinical evaluation of antibiotics and gamma globulina in septicemias following burns. en *Research in Burns* (pp. 219 - 27), First Nat. Congres. Edit. by Curtis P. Artz., 1960.
15. Millican, R. C., Rust, J. Efficacy of rabbit pseudomonas antiserum in experimental pseudomonas aureoginosa infection *J. Inf. Dis.* 107: 389 - 94. 1960.

16. Mc. Meel Wallace. M. D., Wood, R., Senterfit, L. B. Passive immunization against pseudomonas infection of the cornea. *Trans. Amer. Acad. Opth. Otolaryng* 64: 486 - 92, 1960.
17. Mc. Ripley, J. R. and Garrison, A. W. Increased susceptibility of burned rats to pseudomona aureoginosa. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 115: 320 - 36, 1964.
18. Tumbush, Vogel, Butkiewiez, Graber, Larson and Mitchell. The rising incidence of pseudomonas septicemia following burn injury. en *Research in Burns* (pp. 235 - 41). Edit. by Curtis P. Artz, Amer. Inst. Biol. Washington, 1962.
19. Millican, R. C. Role de la infection in the delayed deaths of mice following extensive burn injury. en *Research in Burns* (pp. 195 - 202), Edit. by Curtis P. Artz, Amer. Inst. Biol. Washington, 1962.
20. Oldstone, M. B. A. Altered Reactivity to E. Coli endotoxin of mice subjected to sublethal tourniquet treatment. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 102: 256 - 58. 1959.
21. Rosenthal, S. M., Lillie, R. D. and Verder, E. Influence of chemotherapy on the delayed deaths following extensive burns in mice. *Fed. Proc.* 12: 387. 1952.
22. Markley, K. and Smallman, E. Factors Affecting shock mortality in mice burned by scalding. *Ann. of Surg.* 160: 146 - 59, 1964.
23. Liedberg, N. C. F., Reisse and Artz, C. P. Infection in burns. III. Septicemia as common cause of death. *Surg. Gynec. and Obst.* 99: 151 - 8, 1954.
24. Markley, K., Gurmendi, G., Mori Chávez, P. y Bazán, A. Fatal pseudomonas septicemias in burned patients. *Ann. surg.* 145: 175 - 81, 1957.
25. Mc. Carty, M. D. A comparison of plasma expandire with blood and plasma as a suplement to electrolyte solutions in the treatment of rats undergoing third degree burns of fifty percent of the body surface. *Ann. Surg.* 135: 546 - 51, 1952.
26. Rosenthal, S. M., Tabor, H. Electrolite change and chemotherapy in experimental burned and traumatic shock and hemorrhage. *Arch. Surg.* 51: 244 - 7, 1945.
27. Tabor, H., Rosenthal, S. M. and Millican, R. Distribution of administered fluid in mice subjected to tourniquete shock. *Am. J. Phisiog.* 167: 527 - 22. 1951.
28. Miles, A. A., Niven, J. S. F. The enhancement of infection during shock produce by bacterial toxins and other agents. *Brit. J. Exp. Pathol.* 31: 73 - 95, 1950.
29. Miles, A. A. Non specific defense reactions in bacterial infections. *N. Y. Acad. Sci.* 66: 356 - 69, 1956.
30. Frank, E. D., Mac Donald, J. V. Palmerio, C., Scheinburger, F. B., Fine. Effect of hemorrhagic shock of viability of invading bacteria. *J. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 106: 394 - 7, 1961.
31. Miller, C. P., Hammond, C. W., Anderle, S. A. Studies on suceptibility to infection following ionizing radiation. *J. Exp. Med.* 111: 773 - 84. 1960.

32. Artunson, G. Pathophysiological aspect of the burn syndrome with special reference to liver injury and alteration of capillary permeability. *Act. Chir. Scand. Suppl.* 274 - 76, 1961.
33. Markley, K., Smallman, E. and Evans, G. The role of infection and *E. Coli* in particular, on mortality of burned mice. From National Institute of arthritis and metabolic diseases. Laboratory of Biochemical Pharmacology, Bethesda Maryland U. S. A.
34. Fine, J. Endotoxins in traumatic shock. *Fed. Proc.* 20, Nº 2 Part. III. Supl. Nº 9: 166 - 72, 1960.
36. Prizmetal, M., Bergamm, M. C. and Hechter, O. A demonstration of types of burn shock. *J. Clin. Invest.* 23: 795 - 806, 1944.
38. Bocanegra Carrasco, Manuel. Citado por Lechting, C. (45).
39. Bazán Altuna, Augusto. Estudio clínico experimental y tratamiento de la infección a *seudomona piocianica* en el quemado. *Ac. Peruana de Cir.* 10: 97 - 108, 1957.
40. Hurtado, A. Métodos estadísticos. *Anales de la Facultad de Med.* 28: 125 - 306, 1945.
41. Markley, K. M., Bocanegra, M., Bazán, A., Temple, R., Chiappori, M., Morales, G., Carrión, A. La evaluación clínica de la terapia salina en el shock por quemaduras. *Ann. Fac. Med. (Perú).* 38: 1182 - 1193, 1955.
42. Millican, Rosenthal, S. M. Gamma globulina factors protective against infections from *seudomonas* and other organisms. *Science* 126: 509 - 11, 1957.
43. Wilson, Miles, Topley and Wilson's. *Principales of Bacteriology and immunity.* Fourth Ed. Williams and Wiljins Co., Baltimore U. S. A., 1957. T. II.
44. Fine, J. The effect of peripheral vascular collapse on the antibacterial defense mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Scie.* 66: 329 - 35, 1954.
45. Lechting Gutiérrez, A. Respuesta celular al trauma térmico y su modificación por activadores inespecíficos del RES. Tesis de Bachiller 1965. Trujillo - Perú.
46. Warner, G. F., Dobson, E. L. Disturbances in the Reticulo Endothelial System Following Thermal Injury. *Amer. J. Phys.* 179: 93 - 98, 1954.
47. Dobson, E. L. Factores Controlling Phagocytosis. *Phisiopathology of the RES.* Symposium p. 80 Ch-C. Thomas Springfield I - 11. U. S. A., 1957.
48. Blattberg, B., Levy, M. A. Humoral Reticuloendothelial depressive substance in shock. *Amer. J. Phys.* 203: 409 - 11, 1962.
49. Millican. En preparación. (Citado por Lechting, C. Tesis de Bachiller Facultad de Medicina de Trujillo, 1965).
50. Feller, M. D., F. A. C. S. and Ichiro Kamei, M. D. *Pseudomona* Vaccine and Hyeperimmune plasma in the treatment of burned patients. *Surgical Forum* XV: 46 - 50. 1964.