

La serotipia de pseudomonas aeruginosa en el Hospital Universitario de Maracaibo *

Dr. Alfredo Villalobos C.

Profesor Agregado
Cátedra de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad del Zulia

Coautor: Lic. María Villasmil Santos

Profesora Asistente.
Cátedra de Microbiología
Facultad de Medicina
Universidad del Zulia

* Título de página: (*Pseudomonas aeruginosa*).

Trabajo presentado para optar al ascenso a **Profesor Asociado** en el escalafón de Profesores de L.U.Z.

Veredicto aprobado en: Sesión del Consejo de la Facultad de Medicina N° 35-77 del 08-12-77.

AGRADECIMIENTO:

Al Dr. Helman Serrano P., por sus comentarios y sugerencias.

Al personal de la Cátedra de Microbiología.

Al personal de la Sección de Bacteriología del Hospital Universitario de Maracaibo.

Al Dr. J. Yuzuru Homma del Departamento de Bacteriología del Instituto de Ciencias Médicas de la Universidad de Tokyo-Japón.

A la Sra. Yolanda Izarra por haber aceptado la responsabilidad en su eficaz labor como secretaria.

CONTENIDO:

Portada	159
Agradecimiento	160
Contenido	160
Lista de Ilustraciones	160
Símbolos y Abreviaturas	161
Introducción	162
Materiales y Métodos	162
Resultados	165
Discusión	170
Resumen	170
Referencias Bibliográficas	173

LISTA DE ILUSTRACIONES:

CUADRO N° 1: Lista comprativa de serotipos de *Pseudomonas aeruginosa* en los diferentes esquemas.

CUADRO N° 2: Tipo de muestra de donde se aislaron las cepas.

CUADRO N° 3: Serotipos encontrados en nuestro estudio.

CUADRO N° 4: Distribución de serotipos de acuerdo al tipo de muestra.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS:

TSI Triple Azúcar Hierro;
 Agar F Agar Fluoresceína;
 Agar P Agar Pyocianina;
 CHCl₃ Cloroformo;
 ml. mililitro;
 PBS Amortiguador Fosfato Salino;
 NaN₃ Azida de Sodio;
 rpm. revoluciones por minuto;
 nm. nanómetro;
 mm. milímetro;
 NT No Tipiables;
 cols. colaboradores.

INTRODUCCION:

El empleo sistemático de procedimientos y técnicas que permiten subclasificar las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, ha permitido adquirir conocimientos bastante precisos sobre el origen de las infecciones ocasionadas por esta bacteria y sobre todo en la manera de diseminarse en el medio hospitalario^{1,2}.

Entre estos procedimientos contamos actualmente con la pyocinotipia, la lisotipia y la serotipia, los cuales constituyen los llamados marcadores epidemiológicos²⁻²³.

El valor de la pyocinotipia parece estar bien establecido en el estudio de infecciones nosocomiales, sobre todo después de poder en la actualidad subclasificar al pyocinotipo-1 de Gillies y Govan⁸, el mas frecuentemente encontrado en la mayoría de los estudios^{2-10,12,13,17,19-23}

La lisotipia es otro tipo de marcador epidemiológico también reconocido como un medio bastante efectivo de diferenciación, a menudo hasta un grado no posible con los otros procedimientos, sin dejar de reconocer los inconvenientes que representa el mantenimiento de una colección de fagos y la inestabilidad de los patrones de lisis, trayendo esto último como consecuencia dificultades en la interpretación de los resultados ^{8,24}.

Por su parte la serotipia tiene también sus inconvenientes, ya que aparte de la necesidad de preparación de los antisueros, está el hecho de que el número de serotipos existentes es insuficiente para la precisión que se requiere en este tipo de estudio epidemiológico^{2,8}.

Del análisis de las ventajas y desventajas que presentan estos marcadores epidemiológicos, se desprende que el primero de dichos procedimientos resulta el más simple y accesible a nuestros laboratorios de Bacteriología; sin embargo, en algunas situaciones puede proporcionar resultados erróneos, teniendo que recurrir a otros marcadores más estables a objeto de determinar si los cambios de pyocinotipo fueron el resultado de una infección con una cepa diferente, o si fue debido a un cambio en la producción de pyocina por la cepa original^{8,25}.

Uno de los marcadores a los cuales se recurre para dilucidar estos casos lo constituye la serotipia, la cual combinada a la pyocinotipia y/o la lisotipia proporciona uno de los mejores procedimientos para la diferenciación de cepas epidémicas^{26,27}.

Existen varios esquemas para la serotipia de *Pseudomonas aeruginosa*, basados en la clasificación de las cepas de acuerdo a los antígenos somáticos "O", los cuales son mostrados en el Cuadro N° 128-32.

El propósito del presente trabajo es el conocer cuales son los serotipos más frecuentes de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, aisladas a partir de diferentes muestras clínicas en el Hospital Universitario de Maracaibo, siguiendo la técnica y el esquema de Homma³².

MATERIALES Y METODOS:

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a las cuales se les practicó serotipia:

CUADRO N° 1 LISTA COMPARATIVA DE SEROTIPOS DE PSEUDO-MONAS AERUGINOSA EN LOS DIFERENTES ESQUEMAS

ASOCIACION DE ESTUDIOS 1975	HOMMA	LANYI	HABS	LIU (Difco)	VERDER EVANS	FISHER	MEITERT
A	1	1	3	3	VI	—	5
	2		2	2		3	2
B	7	3		5	I		6
	13		5	16	X	7	16
	16			L			
C	3	5	7	7	VIII	6	3
	4	10	8	8			
D	4		9	9	IX	—	14
E	5	7	11	11	III	2	15
	6	11	4	4	—	—	8
G	8	4	6	6	II	1	1
	9	2	10	10		5	4
H	9						11
	10	6	1	1	IV	4	13
I	10						
	11	12	—	15	—	—	—
J	11						
	12	—	—	13	V	—	—
K	12	—	—	14		—	—
	14	13	12	12	VII	—	7
L	14						
	15	9	—	—	—	—	—
M	17	8	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	9
	—	—	—	—	—	—	10
—	—	—	—	—	—	—	12
	—	—	—	—	—	—	17

El material está representado por 87 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en su totalidad a partir de diversas muestras procesadas en el laboratorio de Bacteriología del Hospital Universitario de Maracaibo.

1.- Identificación de las cepas:

Las cepas aisladas fueron sembradas en el medio de Mac Conkey a objeto de verificar su estado de pureza. A partir de colonias aisladas se practicó un repique en un tubo conteniendo el medio TSI incubándolo a 35-37°C durante 18-24 horas. Si las reacciones en este medio correspondían a las de este microorganismo, se sometía la cepa a la identificación bioquímica utilizando los siguientes parámetros:

Prueba de la oxidasa según el método de Kovacs³³; motilidad al microscopio entre lámina y laminilla³⁴; producción de pigmentos, sembrándola en tubos, los cuales contienen los medios *Pseudomonas* Agar F (Difco) y *Pseudomonas* Agar P (Difco)³⁵; investigación de la vía de ataque de los carbohidratos, utilizando el medio OF-glucosa, según la técnica de Hugh y Leifson³⁶ y las reacciones en el medio de Sellers³⁷.

Las cepas caracterizadas de acuerdo a la sistemática anterior como *Pseudomonas aeruginosa*, fueron escogidas para la preparación del aglutinógeno utilizado en la serotipia.

2.- Serotipia:

2a.: Materiales Utilizados:

El equipo comercial utilizado para la serotipia, obtenido por cortesía del Dr. J. Yuzuru Homma, del Departamento de Bacteriología del Instituto de Ciencias Médicas de la Universidad de Tokyo-Japón, consta de 15 antisueros tipo específicos contenidos en viales, en volúmenes de 2.5 ml. con títulos de aglutininas (un recíproco de la dilución) de 40 ml.

Antes de proceder a la serotipia, a cada vial son agregados 7.5. ml. de una solución de PBS-Glycina pH 7.2 conteniendo 0.1% de NaN_3 , alcanzando títulos de aglutininas de 1/10.

2b.: Preparación del aglutinógeno:

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en estudio fueron sembradas en agar nutritivo e incubados a 37°C durante la noche; posteriormente el crecimiento bacteriano fue recogido en amortiguador fosfato salino PH: 7.2 y calentado a 120°C durante 120 minutos. Luego las células lavadas con PBS fueron utilizadas como aglutinógeno. La suspensión bacteriana fue centrifugada a 3000 rpm. por 20 minutos y las células resuspendidas en PBS conteniendo NaN_3 al 0.1% ajustándola a una concentración de 1.0 de densidad óptica (aproximadamente) a una longitud de 660 nm en un espectofotómetro con una cuveta de un diámetro interno de 10 mm.

2c.: Prueba de aglutinación:

En tubos serológicos con un diámetro interior de 8 mm. fueron colocados 0.2 ml. de cada uno de los 15 antisueros tipo específicos y 0.05 ml. de la solución de aglutinógeno.

Las mezclas fueron agitadas y luego incubadas a 37°C en baño de María, durante la noche después de lo cual se procedió a practicar la lectura.

El criterio de lectura para las reacciones positivas fue el siguiente: aquellos tubos donde se apreció un depósito de precipitado denso y sobrenadante claro (++) y cuando el sobrenadante era turbio (+).

RESULTADOS:

Las 87 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* de este estudio provienen en su totalidad del Hospital Universitario de Maracaibo, apreciándose en el Cuadro N° 2 los tipos de muestra de donde fueron aisladas.

El 49.51% de las cepas estudiadas fueron aisladas a partir de orina, exudados faríngeos, secreción traqueal y secreción de heridas operatorias. El resto de ellas está distribuido entre una amplia variedad de muestras.

Con la técnica empleada se logró el tipiaje del 85.06% de las cepas estudiadas y los 12 serotipos encontrados se muestran por orden de frecuencia en el Cuadro N° 3.

El 33.78% de las cepas tipiables correspondieron al serotipo T-5, siguiéndole en orden decreciente el serotipo T-10 con un 17.57% de frecuencia de aislamiento y los serotipos T-8, T-9, T-6 y T-14, correspondiéndole a cada uno el 6.76%.

De los serotipos T1, T-7 y T-3 se aislaron 4 cepas de cada uno (5.40%) mientras que 2 cepas (2.71%) correspondieron al serotipo T-2.

Solo se encontró una cepa correspondiente a los serotipos T-4 y T-13.

El Cuadro N° 4 permite apreciar la distribución de los serotipos de acuerdo al tipo de muestra. En cepas aisladas de orina el serotipo T-10 fue el más frecuentemente encontrado.

De los 4 serotipos T-1 encontrados en nuestro estudio 2 correspondieron a este tipo de muestra.

El serotipo T-5 fue el que con más frecuencia se encontró en cepas aisladas de exudado faringeo, observándose así mismo en 4 de las 6 cepas aisladas de secreción de heridas operatorias y en todas las obtenidas a partir de secreción ótica, muñón de amputación, loquios, heces y secreción nasal.

De los 4 serotipos T-7 encontrados, 2 correspondieron a cepas aisladas de exudados faríngeos.

Todos los 5 serotipos T-9 encontrados fueron de cepas aisladas a partir de secreción traqueal.

Los dos serotipos T-2 encontrados correspondieron a cepas aisladas de secreción vaginal y un absceso.

En la única cepa aislada a partir de sangre, así como en las 2 correspondientes a muestras de secreción peritoneal no fue posible lograr el tipiaje.

En los otros tipos de muestras el serotipo T-5 fue observado frecuentemente.

CUADRO N° 2

TIPO DE MUESTRA DE DONDE SE AISLARON LAS
CEPAS

MUESTRA	NUMERO DE CEPAS	PORCEN TAJE
ORINA	17	19.54
EXUDADOS FARINGEOS	12	13.79
SECRECION TRAQUEAL	8	9.19
SECRECION HERIDA OPERATORIA	6	6.89
SECRECION OCULAR	3	3.45
SECRECION BRONQUIAL	3	3.45
SECRECION VAGINAL	3	3.45
SECRECION OSEA	3	3.45
SECRECION ULCERAS	3	3.45
SECRECION PERITONEAL	2	2.30
SECRECION OTICA	2	2.30
SECRECION HERIDAS	2	2.30
SECRECION MUÑON AMPUTACION	2	2.30
LOQUIOS	2	2.30
SANGRE	1	1.15
HECES	1	1.15
SECRECION NASAL	1	1.15
SECRECION ESCARA SACRA	1	1.15
ABSCESO	1	1.15
CONTENIDO GASTRICO	1	1.15
CATETER URINARIO	1	1.15
OTRAS SECRECIONES	12	13.79
TOTAL	87	100.00

CUADRO No. 3
SEROTIPOS ENCONTRADOS EN NUESTRO ESTUDIO

SEROTIPOS	NUMERO DE CEPAS	PORCENTAJE
5	25	28.73
10	13	14.94
8	5	5.75
9	5	5.75
6	5	5.75
14	5	5.75
1	4	4.60
7	4	4.60
3	4	4.60
2	2	2.29
4	1	1.15
13	1	1.15
NT	13	14.94
TOTAL	87	100.00

CUADRO No. 4 DISTRIBUCION DE SEROTIPOS DE ACUERDO AL TIPO DE MUESTRAS

TIPO DE MUESTRA	SEROTIPOS													TOTAL
	5	10	8	9	6	14	1	7	3	2	4	13	NT	
ORINA	2	8			1	1	2						3	17
EXUDADOS FARINGEOS	5				1	1		2	1				2	12
SECRECION TRAQUEAL	1		5		1	1	1							8
SECRECION HERIDA OPERATORIA	4				1	1		1						6
SECRECION OCULAR	1		1			1								3
SECRECION BRONQUIAL	1	1			1									3
SECRECION VAGINAL	1					1	1		1					3
SECRECION OSEA		1											2	3
SECRECION ULCERAS			1					1					1	3
SECRECION PERITONEAL												2		2
SECRECION OTICA	2													2
SECRECION HERIDAS			1					1						2
SECRECION MUÑON AMPUTACION	1												1	2
LOQUIOS	2													2
SANGRE													1	1
HECES	1													1
SECRECION NASAL	1													1
SECRECION ESCARA SACRA														1
ABSCESO									1					1
CONTENIDO GASTRICO					1									1
CATERER URINARIO		1												1
OTRAS SECRECIONES	3	2	1		2			1			1	1	1	12
TOTAL	25	13	5	5	5	5	4	4	2	2	1	1	13	87

DISCUSION:

El porcentaje de cepas tipiiables, así como la prevalencia del serotipo T-5 en nuestro estudio coinciden con los hallazgos obtenidos por Yoshioka y cols.³⁸ utilizando la misma metodología. Sin embargo, el número de serotipos diferentes encontrados por nosotros en las 74 cepas tipiiables, es mayor al reportado por ellos en 101 cepas, observando que no aparecen en dicho estudio ni el serotipo T-10 que ocupa el segundo lugar en orden de frecuencia en nuestras cepas estudiadas, así como tampoco los serotipos T-9, T-6, T-14, T-7 y T-2.

A diferencia de nuestros resultados, el serotipo que ocupa el segundo lugar en los obtenidos por Yoshioka y cols.³⁸ corresponden al T-8 (18.7%), siguiéndole en orden de frecuencia el T-3 (7.3%) y los T-1 y T-4 con un 5.7% cada uno.

Por su parte Moody y cols.¹¹ utilizando la técnica de aglutinación en lámina y el esquema de Fisher³¹, sólo obtienen un 0.5% de cepas no tipiiables, siendo el serotipo más frecuentemente encontrado el 1 de Fisher o T-8 de Homma (25.2%), siguiéndole en orden de frecuencia el 6 de Fisher o T-3 de Homma (19.9%).

Con este estudio sólo nos proponemos establecer los serotipos más frecuentes de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital Universitario de Maracaibo. Con la adición futura de cepas provenientes de otras Instituciones, será posible determinar cuáles son los serotipos más frecuentes en nuestro medio.

Compartimos con Young y Moody²⁶ la opinión de que la serotipia es un método específico y reproducible y que combinado con la pyocinotipia y/o la lisotipia, constituye el mejor procedimiento para la diferenciación de cepas epidémicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

RESUMEN:

Serotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en el Hospital Universitario de Maracaibo:

Se practica la serotipia a 87 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en el Hospital Universitario de Maracaibo durante el año 1975, a partir de una amplia variedad de material clínico.

Se siguió la técnica de aglutinación de Homma, utilizando un set de 15 antisueros estándar.

En el estudio se logró el tipiaje del 85.05% de las cepas. Entre ellas 12 serotipos diferentes fueron encontrados.

El serotipo más frecuentemente encontrado fue el T-5 (33.77%) siguiéndole en orden de frecuencia el T-10 (17.56%).

En cepas aisladas de orina el serotipo T-10 fue el más frecuentemente encontrado así como también le correspondieron a esta muestra, 2 de los 4 serotipos T-1 encontrados.

El serotipo que con más frecuencia se encontró en exudados faríngeos, fue el serotipo T-5, así como también le correspondieron a esta muestra, 2 de los 4 serotipos T-7 encontrados.

Todas las 5 cepas correspondientes al serotipo T-9, fueron aisladas a partir de muestras de secreción traqueal.

En otros tipos de muestras, el serotipo T-5, fue también observado frecuentemente.

El porcentaje de cepas tipiables, así como la prevalencia del serotipo T-5 en nuestro medio, coinciden con los hallazgos obtenidos por Yoshioka y cols., utilizando la misma metodología, a diferencia de Moody y cols. quienes utilizando la técnica de aglutinación en lámina y el esquema de Fisher sólo obtienen un 0.5% de cepas tipiables, siendo el serotipo más frecuente el 1 de Fisher o T-8 de Homma.

La frecuencia de los otros serotipos encontrados en nuestro estudio difiere de los reportados por Yoshioka y cols. y Moody y cols.

Contando en la actualidad en nuestro medio con este tipo de marcador epidemiológico, podremos, combinándolo con la pyocinotipia, aplicarlo en la clarificación epidemiológica de brotes infecciosos por *Pseudomonas aeruginosa* que se sucedan en nuestros hospitales.

SUMMARY:

The serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* in the Hospital Universitario de Maracaibo.

By means of the agglutination technique of Homma utilizing one set of 15 standard antisera, serotyping was done on eighty seven *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the Hospital Universitario de Maracaibo, from a wide variety of human sources.

The typing of 85.05% of strains was accomplished in this study. Twelve different sero-types were found among them.

Sero-type T-5 was the most commonly found (33.77%), followed by type T-10 (17.56%).

Sero-type T-5 was the most commonly found among the urine-isolated strains. Two of the four type T-1 found, were from urine specimens.

Sero-type T-5 was the most commonly found among the strains isolated from throat cultures. Two of the four type T-5 was found frequently.

The rate of typable strains and the prevalence of type T-5 in our study, agrees with findings obtained by Yoshioka et al utilizing the same methodology, but is different to those of Moody et al, who by the agglutination technique in lame found 0.5% of typable strains, being the type-1 of Fischer or T-8 of Homma the most commonly found.

The other sero-types found in our study are different of those reported by Yoshioka et al and Moody et al.

Having actually in our area, this type of epidemiological-marker, we will be able in combining it with the pyocin-typing, to clearly define more precisely the epidemiology of hospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* in our area.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

- 1 MOREHEAD, C.D., HOUCK, P.W.: "Epidemiology of *Pseudomonas* infections in a Pediatric intensive care unit". *Amer. J. Child.* 124: 564, 1972.
- 2 FARMER III, J.J., HERMAN, L.G.: "Epidemiological fingerprinting of *Pseudomonas aeruginosa* by production of and sensitivity to pyocin and bacteriophage". *Appl. Microbiol.* 18: 760, 1969.
- 3 TINNE, J.E., et al.: "Cross-infection by *Pseudomonas aeruginosa* as a hazard of intensive surgery". *Brit. Med. J.* 4: 313, 1967.
- 4 FIENER, J., et al.: "*Pseudomonas aeruginosa* epidemic traced to deliveryroom resuscitators". *New. Eng. J. Med.* 276: 991, 1967.
- 5 PASETTO, D., et al.: "Nurse-y outbreak of severe diarrhoea due to multiple strains of *Pseudomonas aeruginosa*". *Lancet.* 2: 38, 1972.
- 6 DREWELL, S.E., et al.: "Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection from a special care nursery". *Lancet.* 1: 946, 1972.
- 7 GRUBLE, H.G., et al.: "Fine-particle humidifiers source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a respiratory-disease unit". *New. Eng. J. Med.* 282: 531, 1970.
- 8 GILLIES, R., GOVAN, J.: "Typing of *Pseudomonas pyocianea* by pyocine production". *J. Pathol. Bacteriol.* 91: 339, 1966.
- 9 GOVAN, J., GILLIES, R.: "Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas pyocianea*". *J. Med. Microbiol.* 2: 17, 1969.
- 10 WAHBA, A.H.: "Hospital infection with *Pseudomonas pyocianea*: An investigation by a combined pyocine and serological typing method". *Brit. Med. J.* 1: 86, 1965.
- 11 MOODY, M.R., et al.: "*Pseudomonas aeruginosa* in a Center for Cancer research. I. Distribution of intraspecies types from human and environmental sources". *J. Infect. Dis.* 125: 95, 1972.
- 12 PHILLIPS, I., et al.: "Acetic acid in the treatment of superficial wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa*". *Lancet.* 1: 11, 1972.
- 13 RUIZ, I.S.R.: PREVALENCIA DE PORTADORES DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA EN NIÑOS HOSPITALIZADOS. México, Universidad Nacional Autónoma, Hospital Infantil de México, 1969, 29h. (Tesis de Grado).
- 14 SUTTER, V.L., et al.: "A standardized system for phage typing *Pseudomonas aeruginosa*". *Health Lab. Sci.* 2: 7, 1969.

- 15 GRABER, Ch. D., et al.: "Bacteriophage grouping of *Pseudomonas aeruginosa*. With special emphasis on lisotypes occurring in infected burns". *Am. J. Clin. Pathol.* 37: 54, 1962.
- 16 SUTTER, V.L., HURST, V.: "Sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in burns: Study of wound and rectal cultures with phage typing". *Ann. Surg.* 163: 597, 1966.
- 17 BRUMFITT, W., et al.: "Clinical and laboratory studies with Carbenicillin. A new Penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*". *Lancet.* 1: 1289, 1967.
- 18 LOWBURY, E.J., et al.: "Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: Emergence of strains highly resistant to Carbenicillin." *Lancet.* 2: 448, 1969.
- 19 SMITH, R.F., DAYTON, S.L.: "Use of acetamide broth in the isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from rectal swabs". *Appl. Microbiol.* 24: 143, 1972.
- 20 ROSE, H.D., et al.: "Subtyping of pyocin type 1 *Pseudomonas aeruginosa* one year of experience". *Appl. Microbiol.* 22: 475, 1971.
- 21 VILLALOBOS, C.A., VILLALOBOS DE ROLDAN, A.: "La pyocinotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro medio". *Rev. Fac. Med.* (Maracaibo) 6: 97, 1973.
- 22 PAZ, A.E., et al.: "Pynocinotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en un Hospital General de la localidad". *Kasmera*, 5: 229, 1976.
- 23 LUGO, L., VILLALOBOS, C.A.: "Presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en materiales y ambientes del Hospital Universitario de Maracaibo". Por Publicar.
- 24 ZIERD, Ch., SCHMIDT, P.J.: "Disociation in *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Bacteriol.* 37: 1003-1010, 1964 (Citado en Ref. N° 2).
- 25 FARMER III, J.J., HERMAN, L.G.: "Pyocin typing of *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Infect. Dis.* 130: (Suppl) S43, 1974.
- 26 YOUNG, V.M., MOODY, M.R.: "Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Infect. Dis.* 130 (Suppl): S47, 1974.
- 27 BOBO, R.A., et al.: "Nursery outbreak of *Pseudomonas aeruginosa*: Epidemiological conclusions from five different typing methods". *Appl. Microbiol.* 25: 4114, 1973.
- 28 VERDER, E., EVANS, J.: "A proposed antigenic, schema for identification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*". *J. Infect. Dis.* 109: 183, 1961 (Citado en la Ref. N° 11).
- 29 HABS, I. UNTERSUCHUNGEN UBER DIE O-ANTIGENE VON *Pseudomonas aeruginosa*. *Z. Hyg. Infektionskr.* 144: 218, 1957 (Citado en la Ref. N° 11).
- 30 LANYI, B.: "Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa*. I. Group-specific somatic antigens". *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 13: 295, 1966-1967 (Citado en la Ref. N° 11).

- 31 FISHER, M.W., et al.: "New immunotype schema for *Pseudomonas aeruginosa* based on protective antigens". *J. Bact.* 98: 836, 1969 (Citado en la Ref. N° 11).
- 32 HOMMA, J.Y., et al.: Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa* and its cross-infection". *Japan. J. Exp. Med.* 40: 347, 1970.
- 33 KOVACS, N.: "Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidasa reaction". *Nature.* 170: 703, 1956.
- 34 AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION: COMMITTEE ON LABORATORY METHODS. DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR BACTERIAL, MYCOTIC AND PARASITIC INFECTIONS. Howard L. Bodily, ed. New York, The Association, 1970, p. 558.
- 35 KING, O.E., et al.: "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein". *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301, 1954.
- 36 HUGH, R., LEIFSON, E.: "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria". *J. Bact.* 66: 24, 1953.
- 37 SELLERS, W.: "Medium for differentiating the Gram-negative, non fermenting bacilli of medical interest". *J. Bacteriol.* 87: 46, 1964.
- 38 YOSHIOKA, H., et al.: "Serotypes and antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical materials in the Hokkaido University Hospital 1967". *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* 44: 340, 1970.