

Pyocinotipia de Pseudomonas Aeruginosa en un Hospital General de la Localidad

Dr. Exequiades Paz Araujo

Profesor Agregado. Cátedra de Microbiología.
Facultad de Odontología. L.U.Z.

Dr. Alfredo Villalobos C.

Profesor Agregado. Cátedra de Microbiología.
Facultad de Medicina. L. U. Z.

Dr. Ludonildo Lugo

Becario Docente. Cátedra de Microbiología.
Facultad de Medicina. L. U. Z.

Lic. María Villasmil

Becario Docente. Cátedra de Microbiología.
Facultad de Medicina. L. U. Z.

CONTENIDO:

	Pág.
Lista de Ilustraciones	230
Símbolos y Abreviaturas	231
Introducción	231
Materiales y Métodos	233
Resultados	237
Discusión	243
Resumen	245
Referencias Bibliográficas	247

LISTA DE ILUSTRACIONES

	Pág.
Tabla No. 1: Patrones de inhibición producidos por los 37 tipos diferentes de Pyocina de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	235
Tabla No. 2: Patrones de inhibición de los 8 sub-pyocino-tipos diferentes producidos por el Pyocinotipo-1 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	236
Tabla No. 3: Tipos de muestra de donde se aislaron las cepas.	237
Tabla No. 4: Pyocinotipos encontrados en nuestro estudio.	238
Fotografía No. 1: Patrón de inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pyocinotipo-1.	239
Fotografía No. 2: Patrón de inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pyocinotipo-10	239
Fotografía No. 3: Patrón de inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Pyocinotipo-3	240
Fotografía No. 4: Patrón de inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sub-pyocinotipo-1b.	240
Fotografía No. 5: Patrón de inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sub-pyocinotipo-1H.	241
Fotografía No. 6: Patrón de Inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sub-pyocinotipo-1C.	241

Tabla No. 5:	
Distribución de Pyocinotipos según el tipo de muestra.	242
Tabla No. 6:	
Distribución de sub-pyocinotipos según el tipo de muestra.	243

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Agar F.	Agar Fluoresceína
Agar P.	Agar Pyocianina
B. B. L.	Baltimore Biological Laboratory
CHCl ₃	Cloroformo
ml.	mililitro
N. T.	No tipiable
P.s	Pseudomonas
T. S. B. A.	Triptona Soya Sangre Agar
T. S. I.	Triple Azúcar Hierro
N. C. D. C.	Centro Nacional de Enfermedades Contagiosas
D. N. A.	Acido Desoxirribonucleico
R. N. A.	Acido Ribonucleico
C. C. C.	Caldo Cerebro Corazón

INTRODUCCION

Existen varios procedimientos o métodos que en bacteriología son empleados con el objeto de trazar infecciones sobre todo hospitalarias, ocasionadas por ciertas especies de bacterias y los cuales están basados en la utilización de marcadores epidemiológicos, que permiten clasificar las cepas en tipos o grupos y de esta manera poder investigar cuál ha sido la fuente y vía de transmisión de tales infecciones, con el fin de contribuir al control de las mismas (1). **Pseudomonas aeruginosa** se encuentra dentro

de ese grupo de gérmenes; para esta entidad bacteriana existen diferentes tipos de marcadores epidemiológicos (3, 1-3, 16, 17), los cuales han venido siendo utilizados con frecuencia debido al auge que esta bacteria "Oportunista" ha llegado a tener en infecciones de este tipo ocupando hoy en día un lugar privilegiado dentro del grupo de bacterias **gramnegativas** (2, 3, 4-10).

Entre estos procedimientos la pyocinotipia constituye uno de los que con más frecuencia es utilizado en investigaciones epidemiológicas de infecciones por **Pseudomonas aeruginosa** y el cual está al alcance de cualquier laboratorio de bacteriología, debido a lo simple del método y si durante el mismo se siguen las recomendaciones dadas para su ejecución podemos obtener resultados confiables y de valor para el fin perseguido.

Han sido descritas varias técnicas sobre pyocinotipia, estando basadas todas ellas en la producción de pyocinas, por una cepa de **Pseudomonas aeruginosa** o en la investigación de la sensibilidad de esta a dichas sustancias. En el primer caso se utiliza un set de cepas de **Pseudomonas aeruginosa** indicadoras y en el otro un set de pyocinas, tanto el set de cepas indicadoras como el de pyocinas, varía de acuerdo a la técnica a emplear. (2, 3, 6-9, 11, 14, 15).

La elaboración de pyocinas por parte de **Pseudomonas aeruginosa**, fue reportado primeramente por Jacob (37) y forman parte del grupo de las llamadas bacteriocinas, entre las cuales se encuentran una serie de sustancias relacionadas, producidas por algunas bacterias especialmente del grupo gramnegativo entre las cuales tenemos: Las colicinas, producidas por **Escherichia coli**, la marcescina producida por la **Serratia marcescens**, la pneumocina producida por **Klebsiella pneumoniae**, la vibriocina, producida por **Vibrio comma**, la pesticina producida por **Pasteurella pestis**, la meningocina producida por **Neisseria meningitidis** (18).

Las pyocinas son producidas por la mayoría de las cepas de **Pseudomonas aeruginosa** y al igual que las demás bacteriocinas, ejercen una acción antibacteriana sobre otras cepas de la misma especie, después que una molécula de dicha sustancia es absorbida por el receptor específico que se encuentra en la superficie de las bacterias sensibles, además la biosíntesis de estas sustancias por parte de una bacteria es letal para ella.

Diferentes bacteriocinas actúan inhibiendo la síntesis de DNA o las síntesis de proteínas y algunas inhiben un amplio rango de actividades tales

como DNA, RNA y síntesis proteica junto con la función de las permeasas y se piensa que su efecto primario lo ejercen sobre el desarrollo de energía por parte de la bacteria. Este modo de acción es completamente diferente al ejercido por los antibióticos los cuales son sustancias de peso molecular bajo que penetran en las células inhibiendo la función enzimática (18).

Con la finalidad de ampliar y completar un primer estudio realizado en Maracaibo, para establecer los patrones de inhibición, presentados por las cepas de **Pseudomonas aeruginosa** en nuestro medio (15), en el presente trabajo se estudia la pyocinotipia y subpyocinotipia de **Pseudomonas aeruginosa** en un Hospital General de la localidad.

MATERIALES Y METODOS

Las 100 cepas estudiadas fueron obtenidas a partir de diversas muestras procesadas en su totalidad en el laboratorio de bacteriología del Hospital General del Sur, las cuales para verificar su estado de pureza fueron sembradas previamente en el medio de Mac Conkey, luego a partir de una colonia aislada con características compatibles con **Ps. aeruginosa**, se practicó un repique en un tubo conteniendo el medio TSI, incubándolo a 37 ° C durante 18 a 24 horas. Si el TSI mostraba cambios compatibles con **Ps. aeruginosa**, era sometido a la identificación bioquímica. La metodología utilizada fue la siguiente (19-35); a cada una de las cepas se le practicó la prueba de la oxidasa según el método de Kovacs (32); se examinó su motilidad al microscopio entre lámina y laminilla (22), se le investigó la producción de pigmento fluorescente, sembrándola en un tubo el cual contiene el medio Pseudomonas Agar P (Difco) (33), el cual es incubado durante 18-24 horas a 35 ° C y 37 ° C y luego examinado con una lámpara de luz ultravioleta para observar la fluorescencia; los cultivos negativos fueron dejados a temperatura del laboratorio para ser reexaminados diariamente por un período hasta de una semana. Al mismo tiempo se les investigó la producción de pyocianina y pyorubrina, sembrando la cepa en un tubo el cual contiene el medio Pseudomonas Agar P (Difco) (33), el cual es incubado a 35 ° – 37 ° C durante 18-24 horas y luego dejados a la temperatura del laboratorio durante una semana. Cuando se observó el pigmento difusible se le agregó CHCl_3 para extraer la pyocianina. Si aparecía una pigmentación roja difusible se consideraba la cepa como productora de pyorubrina.

Igualmente a cada una de las cepas se les investigó la vía de ataque de los glúcidos, utilizando el medio OF-glucosa según la técnica de Hugh y Leifson (34), y las reacciones en el medio de Sellers (35).

Las cepas caracterizadas de acuerdo a la sistemática anterior como **Ps. aeruginosa**, fueron escogidas para practicarles la pyocinotipia.

Las cepas indicadoras utilizadas en la pyocinotipia, consisten de un set de ocho cepas de **Ps. aeruginosa** denotadas en este trabajo con los números del 1 al 8, el cual se obtuvo por cortesía de Emma Galindo de la sección de Enterobacterias del Hospital Infantil de México, y un set de cinco cepas de **Ps. aeruginosa** denotadas en este trabajo con las letras de la A a la D obtenidos del N.C.D.C. de Atlanta. Ambos sets corresponden a los utilizados por Gillies y Govan en sus trabajos (11, 12).

Medios de cultivo:

El medio base para la preparación del agar sangre en placas de petri para la siembra de las cepas a practicarles la pyocinotipia, es el agar cerebro corazón (BBL), al cual se le añade sangre humana a la concentración del 6 % .

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas indicadoras es el caldo cerebro-corazón (BBL).

Técnica de la pyocinotipia:

La técnica empleada en la pyocinotipia es la descrita por Gilles y Govan (11, 12) con una ligera variante en cuanto al medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las cepas potencialmente productoras de pyocina, ya que dichos autores emplean el T. S. B. A. (oxid) en el cual la sangre proviene de caballo.

La cepa de **Ps. aeruginosa** a ser tipada (cepa potencialmente productora de pyocina) es sembrada diametralmente a lo largo de la superficie de una placa de agar sangre, en tal forma que el inóculo tenga un ancho aproximado de 1 cm. El inóculo utilizado es aproximadamente 4.2×10^6 bacterias X ml. La placa es luego incubada a 32° C durante 14-18 horas. El crecimiento macroscópico es removido con una lámina porta-objeto y el remanente del crecimiento microscópico es destruido colocando 3.5 ml. de CHCl_3 en la tapa de la placa de Petri la cual es inmediatamente ensamblada con la porción de la placa que contiene el medio. Después de 15 minutos la placa es abierta y el CHCl_3 es decantado. Las trazas de vapores de CHCl_3 son eliminadas de la placa de cultivo, exponiéndola al aire durante algunos minutos.

Cultivos en C.C.C. de 4-6 horas de incubación a 37 ° C de las cepas indicadoras, son sembrados formando ángulos rectos con la línea del inóculo original; 5 cepas son sembradas del lado izquierdo de la línea y las otras 3 cepas del lado derecho. La placa se incuba a 37 ° C durante 8-18 horas. El inóculo utilizado osciló entre 1×10^7 y 1×10^8 bacterias X ml.

TABLA No. 1
PATRONES DE INHIBICION PRODUCIDOS POR LOS 37
TIPOS DIFERENTES DE PYOCINA DE PSEUDOMONAS PYOCYNEA

TIPO DE PYOCINA DE LA CEPA PRODUCTORA No.	INHIBICION DE LA CEPA INDICADORA No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	+	+	+	+	+	-	+	+
2	-	+	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	-	+	-	+	-
4	+	+	+	+	+	-	-	+
5	-	-	-	-	+	-	-	-
6	+	+	+	+	+	-	+	-
7	+	+	+	-	-	-	+	+
8	-	+	+	+	-	-	+	-
9	-	-	-	-	+	-	+	-
10	+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	-	-	-	+	-
12	+	+	-	+	+	-	-	+
13	-	-	-	+	-	-	-	+
14	-	-	+	-	+	-	+	-
15	-	+	-	-	+	-	+	-
16	+	-	+	+	-	-	+	+
17	-	-	+	-	-	-	+	-
18	+	0	+	+	+	-	+	+
19	-	-	+	+	-	-	+	-
20	-	-	-	-	+	+	-	-
21	-	+	-	+	+	-	-	-
22	+	+	+	-	+	+	+	-
23	+	-	-	-	+	-	+	-
24	-	-	+	+	+	-	+	+
25	+	-	+	-	-	-	+	-
26	+	-	-	-	-	-	+	-
27	+	-	+	-	+	-	+	-
28	-	-	-	+	-	-	+	-
29	-	+	-	-	+	-	-	-
30	-	+	+	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	+	-
32	-	-	-	+	+	-	-	+
33	+	+	+	+	+	+	+	-
34	-	-	-	-	-	-	-	+
35	+	+	-	-	+	-	+	-
36	-	+	-	+	-	-	-	+
37	-	+	+	+	+	-	+	-

+ = INHIBICION

- = NO INHIBICION

Si el inóculo original produce alguna pyocina, ésta difunde en el medio durante el primer período de incubación, ejerciendo luego su acción inhibitoria sobre las cepas indicadoras, durante el segundo período. Las cepas son clasificadas de acuerdo al patrón de inhibición de las cepas indicadoras, utilizando la tabla No. 1, en la cual aparecen los 37 diferentes tipos de pyocina de **Ps. aeruginosa** reconocidos hasta el presente (12).

Subdivisión del pyocinotipo-1:

Para la subdivisión del pyocinotipo-1, la técnica a seguir es la misma salvo que se utilizan 5 cepas indicadoras, sembrando las tres del lado izquierdo del inóculo central y las otras dos del lado derecho, y las cepas son clasificadas de acuerdo al patrón de inhibición de las cepas indicadoras que aparecen en la tabla No. 2, en la cual aparecen ocho diferentes subdivisiones del pyocinotipo-1 reconocidos hasta el presente (36).

TABLA No. 2
PATRONES DE INHIBICION DE LOS 8 SUB-PYOCINOTIPOS
DIFERENTES PRODUCIDOS POR EL PYOCINOTIPO- 1 DE
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

SUB-PYOCINOTIPO	INHIBICION DE LA CEPA INDICADORA
I A	+++++
I B	-++++
I C	--+++
I D	+--+++
I E	-++-+
I F	-----
I G	--+-+
I H	-+-++

+ = INHIBICION

- = NO INHIBICION

RESULTADOS:

En la tabla No. 3 se observan los diferentes tipos de muestras utilizados para aislar las 100 cepas de *Ps. aeruginosa*, las cuales fueron investigadas en este trabajo.

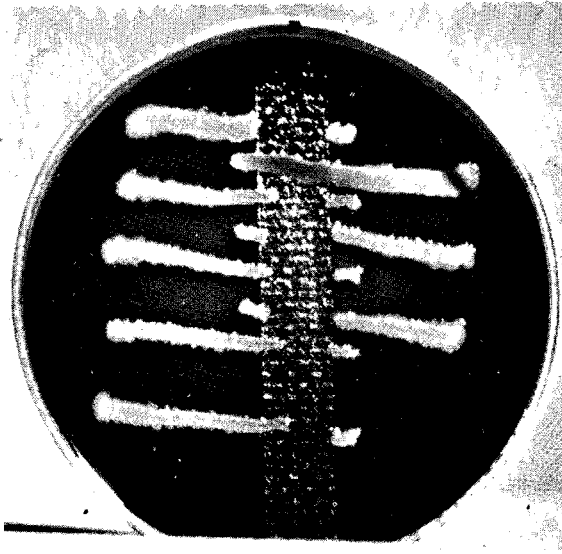
TABLA No. 3
TIPOS DE MUESTRA DE DONDE SE AISLARON LAS CEPAS

Lavado bronquial	28
Espuito	25
Secreción pleural	8
Secreción úlceras	8
Secreción traqueotomías	6
Otras secreciones	5
Orina	4
Heces	3
Secreción herida operatoria	2
Secreción uretral	2
Líquido pleural	2
Exudados faríngeos	2
Flemón genital	1
Absceso periodontal	1
Solución dializadora	1
Secreción umbilical	1
Secreción ótica	1
Total	100

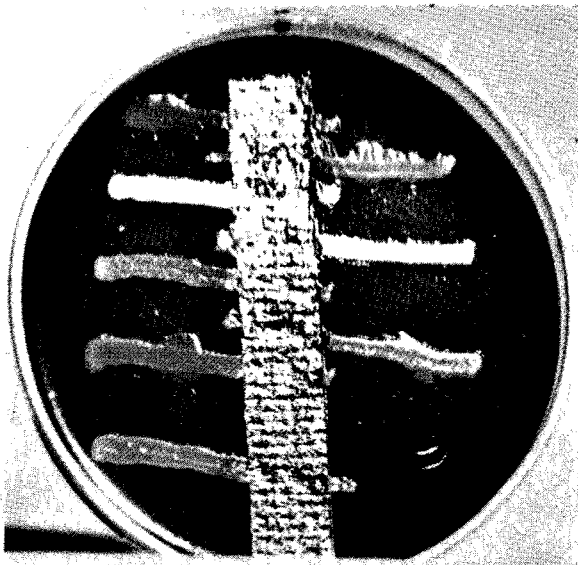
La tabla No. 4 nos muestra los diferentes pyocinotipos encontrados en el presente estudio, pudiendo observar que el pyocinotipo-1 fue el más frecuente; siguiéndole en orden de frecuencia el pyocinotipo-10 y 3. Sus patrones de inhibición se muestran en las fotos No. 1, 2, y 3.

TABLA No. 4
PYOCINOTIPOS ENCONTRADOS EN NUESTRO ESTUDIO

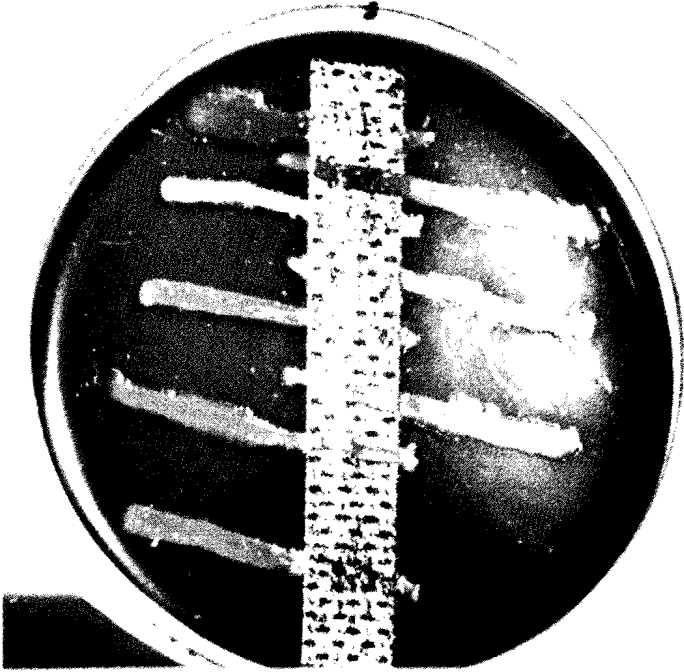
PYOCINOTIPO	No. DE CEPAS
1	54
10	20
3	17
6	2
22	1
30	1
4	1
NT	4
Total:	100



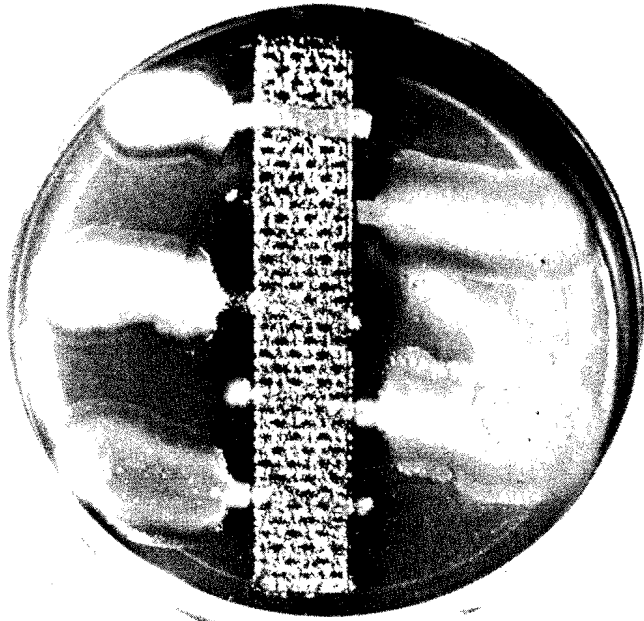
La fotografía No. 1 muestra el patrón de inhibición de las cepas de *Ps. aeruginosa* pyocinotipo-1. Este fue el patrón que se presentó con más frecuencia en nuestro estudio; lo cual se puede evidenciar en las tablas No. 4 y 5.



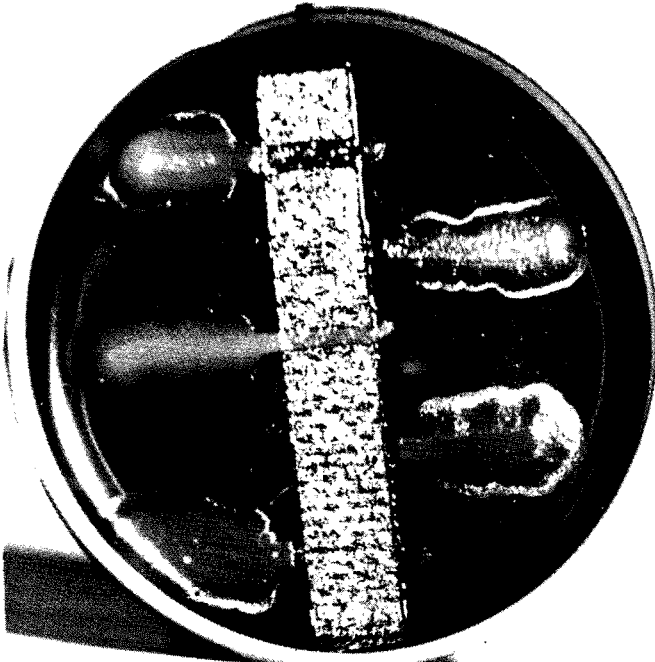
La fotografía No. 2 muestra el patrón de inhibición de las cepas de *Ps. aeruginosa* Pyocinotipo-10.



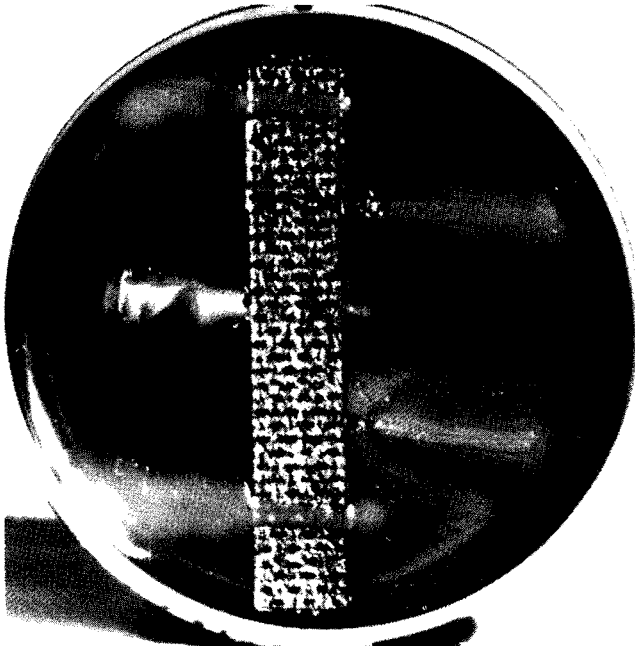
La fotografía No. 3 muestra el patrón de inhibición de las cepas de *Ps. aeruginosa* Pyocinotipo-3.



La fotografía No. 4 muestra el patrón de inhibición de las cepas de *Ps. aeruginosa* sub-pyocinotipo-1b.



La fotografía No. 5 muestra el patrón de inhibición de las cepas de *Ps. aeruginosa* sub-pyocinotipo-1C.



La fotografía No. 6 muestra el patrón de inhibición de las cepas de *Ps. aeruginosa* sub-pyocinotipo-1H.

En la tabla No. 5 se puede observar que el pyocinotipo-1 se logró aislar con mayor frecuencia a partir de las muestras de lavado bronquial y esputo.

TABLA No. 5

DISTRIBUCION DE PYOCINOTIPOS DE ACUERDO AL TIPO DE MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	PYOCINOTIPOS								TOTAL
	1	10	3	6	22	30	4	NT	
Lavado bronquial	19	2	3	2			1	1	28
Esputo	11	7	4		1	1		1	25
Secreción pleural	4	3	1						8
Secreción úlceras	4	4							8
Secreción traqueotomías	3	1	1					1	6
Otras secreciones	5								5
Orina	2	1						1	4
Heces			3						3
Secreción herida operatoria			2						2
Secreción uretral	1		1						2
Líquido pleural	1	1							2
Exudado faríngeo	2								2
Flemón genital			1						1
Absceso periodontal			1						1
Solución dializadora		1							1
Secreción umbilical	1								1
Secreción ótica	1								1
TOTAL	54	20	17	2	1	1	1	4	100

La tabla No. 6 nos muestra los 6 sub-pyocinotipos encontrados. Pudiendo observar que los sub-pyocinotipos más frecuentes fueron el 1b; 1C y 1H, cuyos patrones de inhibición se muestran en las fotos No. 4, 5 y 6.

TABLA No. 6
DISTRIBUCION DE SUB-PYOCINOTIPOS SEGUN EL TIPO DE MUESTRA

TIPO DE MUESTRA	SUB-PYOCINOTIPOS							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Lavado bronquial		11	4			1		2
Espufo		4		1		1		5
Secreci3n pleural		2	1					1
Secreci3n 6lcera	1		1					2
Secreci3n troqueotomía			1					2
Otras secreciones	1	4						1
Orina		1						1
Heces								
Secreci3n herida operatoria								
Secreci3n uretral								1
Líquido pleural								1
Exudado faríngea			1					1
Flem3n genital								
Abscesa periodontal								
Soluci3n dializadora								
Secreci3n umbilical								1
Secreci3n 3tica			1					
TOTAL	2	22	9	1		2		18

DISCUSION:

El elevado número de muestras correspondientes a lavado bronquial (28 %) y esputo (25 %) se debe a que gran parte de nuestro estudio fue realizado durante el período en que la Instituci3n no se haba transformado en Hospital General y prácticamente se ocupaba de padecimientos de tipo respiratorio en general y tuberculoso en particular.

Al agregar 100 nuevas cepas y al mismo tiempo sub-tipiar el pyocinotipo-1, hemos querido ampliar y completar un primer estudio realizado en Maracaibo para establecer los pyocinotipos más frecuentes en nuestro medio (15).

La mayor frecuencia del pyocinotipo-1 que se presenta en nuestro estudio concuerda con lo reportado por Villalobos y Roldán, por Gillies y Govan y otros autores (11, 12, 15).

El pyocinotipo-10 resultó ser el segundo en orden de frecuencia en las cepas estudiadas, este resultado guarda relación con lo reportado por Villalobos y Roldán (15) en su primer trabajo realizado en nuestro medio, no obstante este pyocinotipo resultó relativamente infrecuente en los hallazgos reportados por Gillies y Govan (11, 12).

El pyocinotipo-3 guarda relación con lo reportado por otros autores (11,12).

El número de cepas no tipiables (4 %) resultó bastante inferior al reportado en el primer estudio realizado en la localidad y al de otros autores (11,12, 15).

Al agregar un set adicional de 5 cepas se logró sub-tipiar el pyocinotipo-1 completando así el estudio de estas cepas.

Los sub-tipos más frecuentes corresponden al sub-pyocinotipo-1b (40.74 %), siguiéndole en orden de frecuencia el 1 H (33.33 %) y el 1 C (16.66%).

Se aíslan 6 sub-pyocinotipos diferentes.

En cepas aisladas de las muestras de lavado bronquial el sub-pyocinotipo-1b fue el más frecuente encontrado, así como también le correspondieron a esta muestra 4 de los 6 sub-pyocinotipos aislados.

El sub-pyocinotipo -1h, segundo en orden de frecuencia se aisló de las cepas obtenidas a partir de las muestras de esputo.

En otros tipos de muestras los sub-pyocinotipos-1b, 1h, 1c también resultaron los más frecuentes.

Con este estudio nos proponemos ampliar y completar un primer estudio realizado en Maracaibo por Villalobos y Roldán (15).

RESUMEN

La pyocinotipia fue practicada a 100 cepas de *Ps. aeruginosa* procesada y aislada en un hospital general de la localidad. En el estudio se pudo realizar el tipiaje del 96 % de las cepas, hallándose 7 pyocinotipos diferentes.

El mayor porcentaje de las cepas correspondieron al pyocinotipo-1 (56.25 %), siguiéndole en orden de frecuencia los pyocinotipos-10 (20.83 %), 3 (17.70 %).

En cepas aisladas de las muestras de lavado bronquial el pyocinotipo-1 fue el más frecuente.

De las cepas aisladas a partir de las muestras de esputo se logró obtener 5 de los 7 pyocinotipos encontrados, resultando el más frecuente el pyocinotipo-1, siguiéndole en orden de frecuencia el pyocinotipo-10 y 3.

Se aislaron 2 cepas pyocinotipo-6 y una pyocinotipo-4, correspondiendo ambos a las cepas aisladas a partir de las muestras de lavado bronquial.

Se logró aislar una cepa pyocinotipo-22 y una pyocinotipo-30, ambos corresponden a las cepas aisladas a partir de las muestras de esputo.

En los otros tipos de muestra los pyocinotipos-1, 3 y 10 también se presentaron con gran frecuencia.

La prevalencia del pyocinotipo-1 en nuestro estudio guarda relación con los hallazgos reportados en el primer trabajo realizado en nuestro medio y por otros autores (5, 8), esto nos indujo agregar un set adicional de 5 cepas indicadoras, con lo que se logró completar el estudio del pyocinotipo-1.

En nuestro estudio se logró el sub-tipiaje de todas las cepas (56.25%) correspondientes al pyocinotipo-1.

El sub-pyocinotipo más frecuente resultó el 1b (40,74 %) siguiéndole en orden de frecuencia el 1 H (33,33 %), y el 1 C (16,66 %).

SUMMARY

The pyocine typing was practiced in 100 strains of *Ps. aeruginosa*, processed and isolated in a general hospital of the city. In the study it was possible to realize the typing of 95 % of the strains, where 7 different pyocine types were found.

The greatest percentage of the strains corresponded to the pyocine type-1 (56.25%), being followed in a frequency order by pyocine types-10 (20.83%), 3 (17.70%).

In the isolated strains of the samples of the bronchial rinse, the pyocine type-1 was the most common.

From the isolated strains starting from the sputum samples it was possible isolating 5 of the 7 pyocine types found there, resulting the pyocine type-1 as the most frequent one, being followed in the frequency order by pyocine type-10 and 3.

There were two pyocine type-6 and one pyocine type-4 strains isolated, both types corresponding the isolated strains starting from the sputum samples.

In other specimen types the pyocine types-1, 3 and 10 were also present with great frequency.

The prevalence of the pyocine type-1, in our study has relation with the findings reported in the first paper made in Maracaibo by other authors (5-8), this induced us to sum up an additional set of 5 indicator strains, with wich it was possible to complete our pyocine type-1 study.

We obtained in our study the sub-typing of all the strains (56.25 %) corresponding to the pyocine type-1.

The most frequent sub-pyocine type resulting to be the 1b (40.74 %) followed in the frequency order by the 1H (33.33 %) and the 1 C (16.66 %).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 – VIEU, J. F. Principales infection en Chirurgie. Vingtquatrième Congrès de la Société Internationale de Chirurgie. Moscou, 21-28, aout, 1971.
- 2 – TINNE, J. E., Gordon, A. M., Bain, W. H. and Mackey, W. A. Cross-infection by *Pseudomonas aeruginosa* as a Hazard of intensive surgery. Brit. Med. J. 4, 313-315, nov. 1967.
- 3 FARMER III, J. J. and Herman, L. G. Epidemiological fingerprinting of *Pseudomonas Aeruginosa* by the production of and sensitivity to pyocin and bacteriophage. APPL. MICROBIOL. 18 p: 760-765. Nov. 1969.
- 4 – Leading article: BRIT MED. J. 4: 309-310, Nov., 1967.
- 5 – KUMATE, J. Temas selectos de infectología pediátrica. P: 128. Ed. Meds. Hosp. Infant. de Méx. México, 1967.
- 6 – FIENER, J., Taylor, P. M. and Gezon, H. M. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic traced to delivery-room resuscitators. NEW. ENG. J. Med. 276: 991-996, May, 1967.
- 7 – PASETTO, D., Pechamann, C., Scrsolo, A. and Bruno, B. Nursery Outbreak of severe Diarrhoea due to multiple strains fo *Pseudomonas Aeruginosa*, THE LANCET. 38-40, July, 1972.
- 8 – DREWELL, S. E. Payne J. H., Tuke, W. and Verdon, P. E. Erradication of *Pseudomonas aeruginosa* infection from a special care nursery. THE LANCET. 946-948. apr. 1972.
- 9 – GRUBLE, H. G., Rosemary, F., Thomas, M. S., Bird, T. J., Toigo, A. and Griffith, L. G. Fine-Particle Humidifiers. Source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a respiratory-disease unit. NEW. ENG. J. MED. 282:531-535. March, 1970.
- 10– COIFFMAN, F., Cruz, E. Mendoza, J. y Salcedo, F. Gentamicina en infecciones por quemaduras en niños, en: SYMPOSIUM LATINOAMERICANO SOBRE INFECCIONES Y GENTAMICINA. Marzo 10-11 de 1969. Río de Janeiro, Brasil, México, Estela, 1969, p: 42-57.
- 11– GILLIES, R. and Govan, J. Typing of *Pseudomonas Pyocianea* by pyocine production. J. PATH. BACT. 91: 339-345, 1966.
- 12– GOVAN, J. and Gillies, R. Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas Pyocianea*. J. MED. MICROBIOL. 2:17-25, 1969.
- 13– WAHBA, A. H. Hospital infection with *Pseudomonas Pyocyanea*: An investigation by a combined pyocine and serological typing method. BRIT. MED. J. 1:86-89, 1965.
- 14– RUIZ, I. S. R. Prevalencia de portadores de *Pseudomonas aeruginosa* en niños hospitalizados. México, Universidad Nacional Autónoma, Hospital Infantil de México, 1969. 21h. (Tesis de grado).
- 15– VILLALOBOS C., Alfredo., Villalobos de Roldán A. M. La pyocinotipia de *Pseudomonas aeruginosa* en nuestro medio. L.U.Z. Fac. de Medicina. Cátedra de Microbiología, 1973.
- 16– SUTTER, V. L., Hurst, V. and Fennell, J. A. Standardized system for phage typing *Pseudomonas Aeruginosa*. HEALTH LABORATORY SCIENCE. 2:7-16, january, 1965.
- 17– GRABER, Ch. D., Latta, R., Vogel, E. H. and Brame, R. Bacteriophage frouping of *Pseudomonas Aeruginosa*. With special emphasis on lysotypes occurring in

- infected burns. THE AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY. 37: 54-62, january, 1962.
- 18- REEVES, P. The bacteriocins. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. New York. 1972.
- 19- HUGH, R. A practical aproach to the identification of certain nonfermentative Gram-Negative rods encountered in clinical specimens. JOURNAL OF THE CONFERENCE OF PUBLIC HEALTH LABORATORY. 28:168-187, 1970.
- 20- KING, E. O. The identification of unusual pathogenic Gram-Negative bacteria. U. S. DEPARTAMENT OF HEALTH, EDUCATION AND NELFARE. CENTER FOR DISEASE CONTROL ATLANTA, GEORGIA 30333. Revised Octover, 19 67.
- 21- STANIER, R. Y, Palleroni, N. J. and Doudoroff, M. The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. GEN MICROBIOL. 43:159-271. 1966 (Citado por Sutter en la referencia No. 40).
- 22- LEIFSON, E. Identification of Pseudomonas, alcaligenes and related bacteria. ZEUTR BAKTERIOL PARASITENK\ Abt. I. (Orig.) 173: 487-488, 1958. (Citado por Sutter en la referencia No. 40).
- 23- GILARDI, G. L. Characterization of Pseudomonas Species isolated from clinical specimens. APPL MICROBIOL. 21: 414-419, 1971.
- 24- GILARDI, G. L. Diagnostic for differentiation of Pseudomonads pathogenic for man. APPL. MICROBIOL. 16:1497-1502, 1968.
- 25- SUTTER, V. L. Identification of Pseudomonas Species isolated from hospital environment and human sources. APPL. MICROBIOL. 16:1532-1538. 1968.
- 26- PICKETT, M. J. and Pedersen, M. M. Screening procedure for partial identification of nonfermentative bacilli associated with man. APPL. MICROBIOL. 16: 1631-1632, 1968.
- 27- PHILLIPS, I. Identification of Pseudomonas Aeruginosa in the clinical laboratorry. J. MED MICROBIOL. 2: 9-16, 1969.
- 28- COWAN, S. T. and Steel, K. L. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge University Press. 71-72, 1970.
- 29- BAILEY, W. R. and Scott, E. G. Diagnostic Microbiology. 3d. C. V. Mosby. Saint Louis, 161-164, 1970.
- 30- HENDRIE, M. S. and Shewan, J. M. The identification of certain Pseudomonas Species. IDENTIFICATION METHODS FOR MICROBIOLOGIST. PART A. Academic Press. London. New York, 1-7, 1966.
- 31- GABY, W. L. and Hadley, C. Practical laboratory test for the identification of Pseudomonas aeruginosa. J. MED. MICROBIOL. 76:356, 1957.
- 32- KOVACS, N. identification of Pseudomonas Pyocynea by the oxidasa reaction NATURE. Lond. 178. 703 (Citado por Cowan y Steel en la referencia No. 34).
- 33- KING, E. O., Ward, M. K. and Raney, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluoresein. J. LAB & CLIN. MED. 301-307, august, 1954.
- 34- HUGH, R. and Leifson. E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram Negative bacteria. J. BACT. 66, 24, 1953.
- 35- SELLERS, W. Medium for differentiating the gram-negative, non fermenting bacilli of medical interest. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. 87:46-48, january, 1964.

- 36— ROSE, H. D., Babcock, J. Heckman, M. E. Subtyping of pyocin type Pseudomonas Aeruginosa: One year of experience. APPL. MICROBIOL. 22:475-1971.
- 37— JACOB, F. Biosynthese inquite et mode D'Action D'Une Pyocine, antibiotique de Pseudomonas Pyocuanea. ANN. INST. PASTEUR. 84:149-160, 1954.