

PSEUDOMONAS AERUGINOSA LISOGENICA AISLADA DEL MEDIO AMBIENTE *

DIÓGENES CARRIÓN SILVA

En 1915, Twort (22) describe por primera vez la lisis transmisible de las bacterias en la especie de un micrococo presente en la linfa vaginal y en los cultivos del grupo coli-tífico aislados del intestino. Para explicar este fenómeno, Twort había enunciado varias hipótesis sin concluir con la verdadera naturaleza del agente productor de la lisis.

En 1917, d'Herelle (22) designa como bacteriófago al responsable de la lisis transmisible y estudia el ciclo de reproducción del mismo. Para d'Herelle, el bacteriófago era un virus exógeno que infectaba la bacteria, se reproducía en ella y daba lugar a su destrucción.

En 1921, Gildemeister (22), haciendo investigaciones sobre este mismo aspecto, observó que los filtrados de heces eran "lisogénicos" para algunas bacterias. Esta fue la primera aparición de la palabra "lisógenos". En la misma época Bail, Otto, Munter y d'Herelle, confirmaron los estudios realizados por Gildemeister y en 1925 Bail y Bordet (22) verifican la existencia de bacterias lisogénicas.

En base a los conocimientos adquiridos en los primeros trabajos sobre lisogenia, las contribuciones en esta forma se orientaron cada vez más al estudio de la lisogenia en bacterias patógenas como el *Staphylococcus* (21 - 22), las enterobacterias (21), *Pseudomonas* (5 - 22), etc.

En el Perú, el Prof. Colichón y colaboradores (12) revelan por primera vez, que es frecuente encontrar cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en el estado lisogénico a partir de lesiones infecciosas producidas por esta bacteria, con el cual amplían el conocimiento sobre mutación y patogenia de este microorganismo que ha causado septicemias fatales en niños con quemaduras en la piel en nuestros nosocomios (1, 2, 3, 6, 23, 30, 31, 32, 33) y otras complicaciones secundarias en fracturas, otitis post-operatoria, vías urinarias, osteomielitis, aparato respiratorio, in-

* Tesis presentada por el autor para graduarse de Bachiller en Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

testino, etc. (12). En otros países, diversos investigadores han informado múltiples complicaciones secundarias a *Pseudomonas aeruginosa* (4, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 25, 28, 26, 27, 34).

El presente trabajo tiene por objeto estudiar la presencia de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en estado lisogénico, aisladas de los diferentes ambientes como las aguas, alimentos, bebidas y aire de sala de hospitales.

La *Pseudomonas aeruginosa* ha adquirido en estos últimos tiempos una gran importancia en la clínica de los quemados, en particular en la clínica de los quemados de la piel, es un organismo del ambiente y resistente a los antibióticos de amplio espectro; por lo tanto, todo lo que pueda contribuir al esclarecimiento de su acción patógena, la mutación y lisogenicidad proporcionará mejores bases científicas para afrontar su tratamiento en el paciente y controlar su difusión en la colectividad.

Los resultados que se obtienen en este trabajo, se describen por primera vez y amplían los hallazgos obtenidos en los aislamientos de la *Pseudomonas aeruginosa* procedente de infecciones humanas (12).

MATERIAL

Las muestras corresponden a agua, aire y bebidas obtenidas de Lima y alrededores en la distribución siguiente:

Aguas servidas en la ciudad	10 muestras
Distritos: Breña y Barrios Altos	
Aguas estancadas (Charcas) de la ciudad	10 muestras
Distritos: Breña y Barrios Altos	
Aguas servidas del campo	9 muestras
Agustino, La Molina y San Cosme	
Aguas estancadas (Charcas) del campo	37 muestras
Agustino, La Molina y San Cosme	
Aire: Hospital del Niño	31 muestras
Pabellón IV, Sala de quemados de la piel, Sala de Prematuros	
Aire: Hospital Arzobispo Loayza	24 muestras
Pabellón VI, 3ra Sala de quemados de la piel	
Aire: Instituto de Enfermedades Neoplásicas	10 muestras
Consultorio externo de pacientes irradiados	
Líquido: del lavado de guantes de obstétricas	10 muestras
Maternidad de Lima	
Bebidas (chicha morada, jugos)	5 muestras
Total de muestras:	146 muestras

En la toma de muestras se emplearon recipientes estériles adecuados como placas de Petri corrientes, frascos corrientes de boca ancha, cubetas. Las muestras fueron conducidas a la brevedad posible al laboratorio, para su estudio bacteriológico de inmediato.

MEDIOS DE CULTIVO

A. Medios simples:

Caldo nutritivo.
Agar simple.

B. Medios selectivos:

Agar Mc. Conkey.
Caldos Tetracionato.

C. Medio mutacional:

Agar SMG al 1.8% (9, 10, 11) asociado al Agar MS "Difco" en placas combinadas (11) conocido en nuestro laboratorio como MS/SMG.
Medio SMG líquido y agar SMG en tubos, de igual fórmula que el SMG de la placa combinada.

D. Medios diferenciales:

Agar MS.
Agar SLU.

E. Prueba de identificación:

Citocromo-oxidasa.

F. Medio de mantenimiento:

Agar Motilidad "Difco".

Las siembras se hicieron en cada tetracionato (29) como medio de aislamiento e indicador de la producción de pigmento (X).

Para el mejor estudio de los efectos de la Lisogenia, se ha preferido el Agar Mitis Salivarius (29) con el medio Agar Sintético a base de manita, glucosa SMG (9, 10, 11) en placa combinado, MS/SMG, método de unir dos medios sólidos en una misma placa, ideado en estos laboratorios (11). El SMG Agar solo y el SMG líquido. Como medio de mantenimiento en stock de los cultivos puros se usa el Agar Motilidad (29). El medio semisólido a base de sacarosa, lactosa y úrea, "SLU" (11), la prueba de la citocromo-oxidasa (19, 24), la prueba de la patogenicidad en ratones de las cepas conocidas, sirvieron para complementar la identificación de la *Pseudomonas aeruginosa*.

METODOS

Las muestras líquidas (aguas, charcas, líquidos de lavados y bebidas) fueron concentradas por centrifugación a 2,000 r.p.m.

Las siembras del Sedimento se hicieron en caldo tetracionato, incubándolas a 37°C durante 4 días y en placas combinadas MS/SMG a la misma temperatura por 24 horas. A partir del cultivo de 4 días en caldo tetracionato, se practicaron resiembras en MS/SMG dejándolas también a 37°C por 24 horas.

Las muestras de aire procedentes de nosocomios y obtenidas del ambiente de las salas donde se asisten quemados, fueron obtenidas dejando expuestas por 30 minutos placas de Petri estériles con caldo de tetracionato y luego de remover con torunda, el sedi-

mento del medio se trasvasaba en frascos estériles para ser incubados en 37°C durante 4 días. A su vez, a partir de este cultivo se hizo resiembra en MS/SMG incubándolas a 37°C por 24 horas.

Después que las placas combinadas MS/SMG fueron incubadas por 24 horas a 37°C se les mantuvo a temperatura de laboratorio (18-20°C) por 48 horas más, para estudiar posibles efectos lisogénicos de las colonias y del cultivo del desarrollo confluyente así como para el reconocimiento preliminar de la *Pseudomonas aeruginosa*. Las colonias desarrolladas que no habían fermentado la manita y la glucosa del medio SMG de la placa MS/SMG, se repicaron en tubos de agar SMG solo, para el aislamiento e identificación de las *Pseudomonas aeruginosa* mediante la prueba de la citocromo-oxidasa.

Para el estudio de las alteraciones producidas por el fago en el desarrollo de la *Pseudomonas aeruginosa* lisogénica del medio ambiente se hizo el trasplante de cultivo en agar SMG al medio caldo SMG incubándolos a 37°C. Del caldo SMG se hicieron siembras seriadas a los 4, 8, 12 y 16 días en placas combinadas MS/SMG, en forma tal de obtener tanto colonias separadas como un buen desarrollo confluyente. La lectura de las placas MS/SMG se realizó con la ayuda de una lente de aumento y a la luz oblicua. Las colonias típicas de *Pseudomonas aeruginosa* lisogénicas, así como las no lisogénicas, se transplantaron en medio movilidad para su conservación (cuadro A) (2).

En la prueba de la citocromo-oxidasa para el diagnóstico de las *Pseudomonas* se empleó el método de Gaby y Hadley (19), que comprende dos reactivos: A) el alfa naphthol 1% en etanol al 95% y B) el para-amino-dimetil-anilina oxalato, al 1% en agua destilada. Consiste éste en agregar al cultivo de 24 horas en caldo nutritivo 0.2 cc. del reactivo A y 0.3 cc. del reactivo B y agitar con el fin de obtener una buena mezcla y oxigenación del mismo. La aparición de un viraje al azul entre 20 segundos y 1 minuto después de efectuada la mezcla caracteriza a la *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que en el *B. alkaligenes* se produce el viraje entre los 2 a 5 minutos.

INOCULACIONES

Para investigar la patogenicidad de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* lisogénica se hicieron inoculaciones en ratones blancos, cepa del Instituto Nacional de Higiene.

Peso: 18 a 20 gramos (35 a 40 días).

Vía de inoculación: intraperitoneal.

Vehículo: mucina al 5% en agua destilada, pH : 7.2.

Preparación de la Mucina para la inoculación: Se disuelve la mucina con agua destilada calentándola, después se autoclava y se toma el pH.

Preparación de la suspensión de mucina: La cepa se cultiva en agar nutritivo, en tubo inclinado, incubándola a 37°C por 18 horas.

Se cosecha con 1 cm. de cloruro de sodio al 0.85%.

Tener caída de cultivo controlados (10 cc./tubo).

Agregar 0.2 a 0.3 cc. de la suspensión cosechada en tubos controlados (doble).

Incubar a 37°C por 6 horas.

Centrifugar a 2,000 r.p.m. por 10 minutos.

Decantar.

Agregar cloruro de sodio de 6 a 8 cm., agitar para lavar.

Centrifugar por segunda vez.

Decantar.

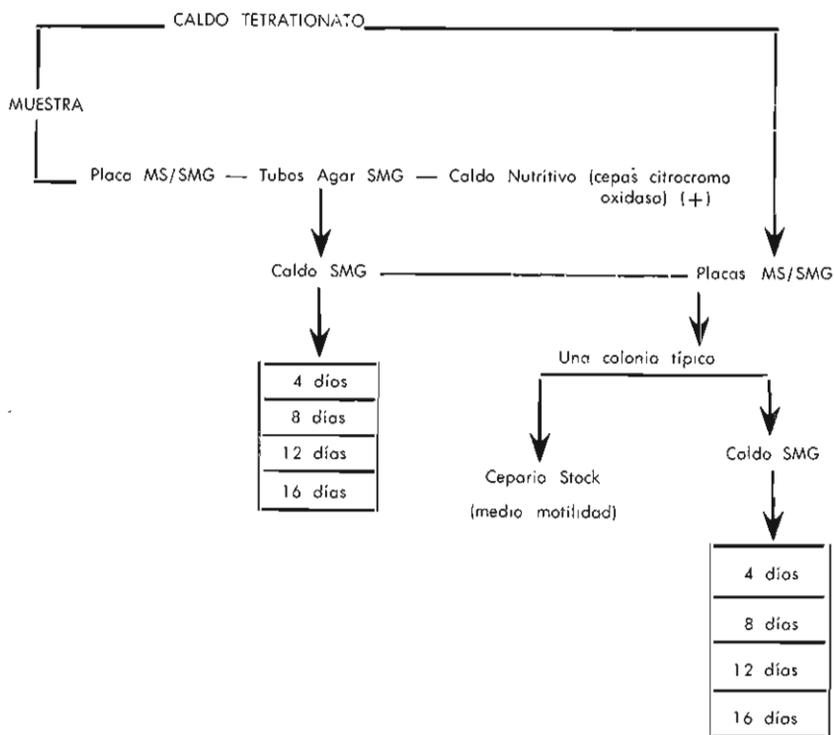
Agregar cloruro de sodio 6 a 8 cc., agitar para lavar.

Obtener una suspensión de gérmenes de 1.7×10^9 /cc., densidad equivalente a 0.40 o 0.45, que se lee en el espectrofotómetro de Coleman a una onda de 650.

Una vez obtenida la suspensión estandarizada de C/a cepa se efectuaron diluciones progresivas de 1/10 a 1/1,5000 en suero fisiológico. Para la inoculación al ratón se inyectó 0.5 de la dilución respectiva, suspendida en mucina al 5% en la proporción de 0.1 cc. de la suspensión microbiana diluida en 0.4 cc. de mucina, en unos casos y en otros, de 0.1 cc. de suspensión y 0.9 de mucina.

Recomendaciones: Antes de inocular al ratón, se agita por lo menos 10 veces la suspensión.

Cuadro A. Aislamiento de la Pseudomonas aeruginosa lisogénica de diferentes ambientes



OBSERVACIONES Y RESULTADOS

Se estudiaron 146 muestras procedentes del medio ambiente de Lima y sus alrededores, obtenidas del agua, aire de ambientes hospitalarios y bebidas, para el aislamiento de la *Pseudomonas aeruginosa* lisogénica.

Como se indica en los cuadros 1 (3) y 2 (4), de 146 muestras se aislaron 17 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, de las cuales 16 se encontraron al estadio lisogénico y una no lisogénica a inducciones repetidas. Se comprobó, a su vez, que en las muestras de "charcas" los casos positivos han sido encontrados simultáneamente, tanto en la superficie como en la profundidad.

Las alteraciones producidas por el fago en las cepas aisladas, se caracterizan por una placa de lisis total en el desarrollo confluyente en el de las colonias separadas, por una lisis incompleta de variada profundidad y extensión.

En el desarrollo confluyente, si el efecto lítico es marcado y extenso, se observa un adelgazamiento transparente a manera de un velo de "brillo metálico" que cubre la superficie del medio. Cuando la lisis es escasa, se ven excavaciones "crateriformes" de diferentes diámetros y profundidad, acompañadas del "brillo plateado".

En el caso de las colonias aisladas, cuando la lisis es marcada, éstas se encuentran marchitas, en contraste con las colonias de desarrollo normal. En la lisis parcial se observan excavaciones en los bordes y en la parte central de las colonias.

En todos los casos se demostró la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* lisogénica en forma inducida en caldo SMG o en caldo tetrionato. No se aislaron al sembrar directamente las muestras en agar MS/SMG.

En el medio combinado MS/SMG, el crecimiento de la *Pseudomonas aeruginosa* era mayor en el SMG que en el MS y se observaron mejor los efectos líticos del fago.

La identificación de la *Pseudomonas aeruginosa* se hizo en base a la pigmentación y a su comportamiento bioquímico (cuadro N° 3).

Las cepas lisogénicas aisladas, en su mayoría dieron pigmento en el medio SLU a partir de las 24 horas y en el medio caldo tetrionato a partir de las 48 horas. La prueba de la citocromo-oxidasa fue positiva en todas y la reacción se produjo entre los 15 a 58 segundos según la cepa.

La acción fermentativa de la sacarosa, lactosa, manita y glucosa fueron negativas, así como la úrea y no hubo producción de H₂S.

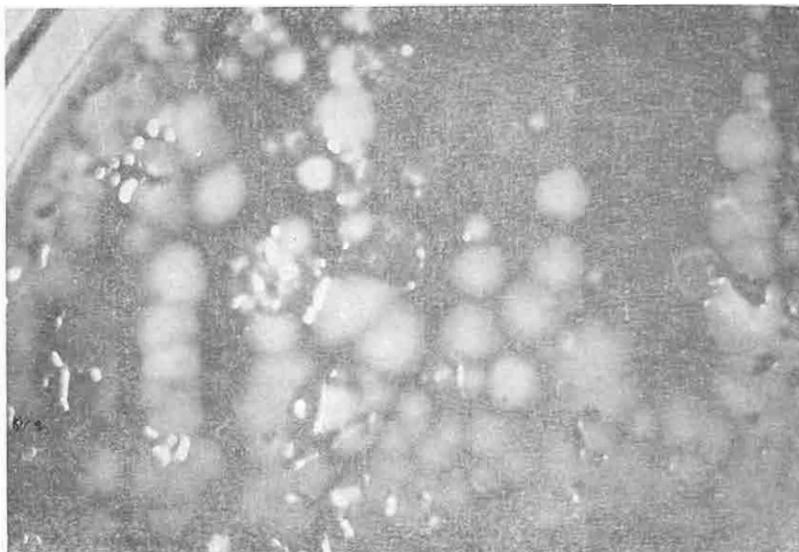


Fig. N° 1. Repicaje del caldo SMG en placas combinadas MS/SMG a los 4 días. Lisis incompleta.

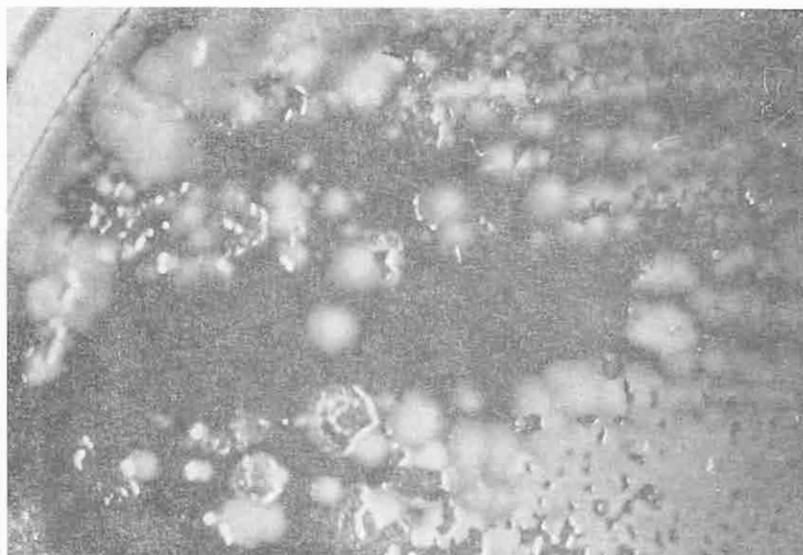


Fig. N° 2. Repicaje del caldo SMG en placas combinadas MS/SMG a los 8 días. Lisis incompleta. Desarrollo tipo confluyente y colonias aisladas.

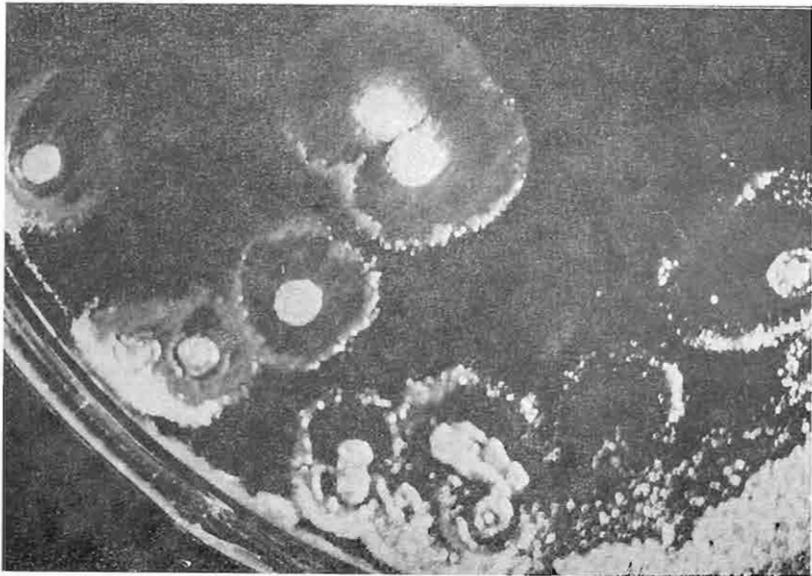


Fig. N° 3. Repicaje del caldo MS en placas combinadas MS /SMG a los 12 días. Lisis incompleta generalizada.

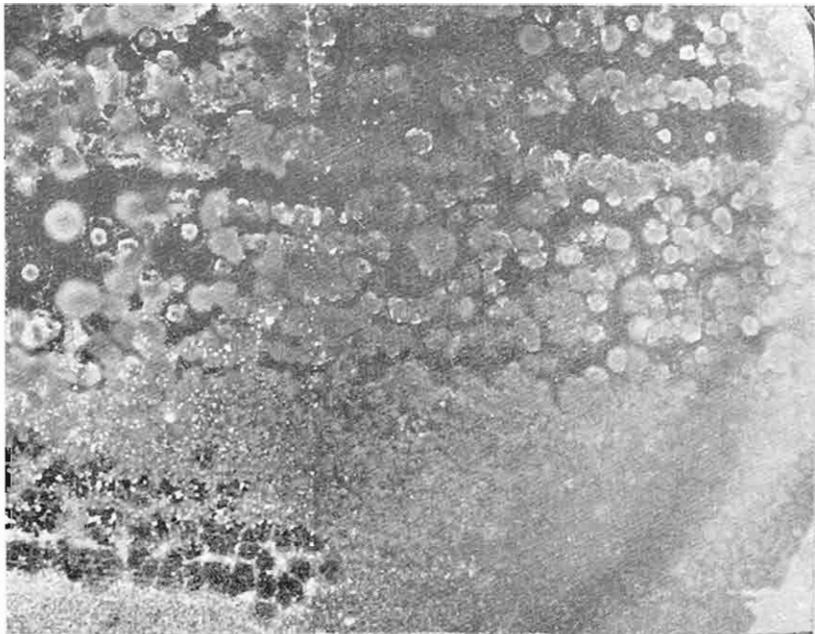


Fig. N° 4. Repicaje del caldo MS en placas combinadas MS /SMG a los 16 días. Lisis incompleta generalizada.

INOCULACIONES

Después de observar que las *Pseudomonas aeruginosas* aisladas de los diferentes ambientes producen el fenómeno de lisogenia, nos propusimos hacer estudios de su relación con la patogenicidad en animales de laboratorio, en este caso empleamos pericotes, cepa Instituto Nac. de Higiene, obteniendo los siguientes resultados:

Usamos una cepa lisogénica aislada del aire Hospital del Niño, Sala de quemados de piel, inoculamos a 4 ratones a las diluciones de:

a) 1/10; b) 1/50; c) 1/100; d) 1/500.

Observando que los tres primeros fallecieron antes de las 24 horas.

El 1º a las quince horas.

El 2º a las dieciocho horas.

El 3º a las veintitrés horas.

El 4º falleció a las 24 horas.

ANATOMIA PATOLOGICA

Al hacer la autopsia en forma aséptica, observamos lo siguiente:

Inflamación del Yeyuno.

Tumefacción del bazo.

Los vasos de la pared interna del torax dilatados.

Tomamos luego con una pipeta Pasteur estéril sangre directamente del corazón en forma aséptica y la cultivamos en medio de placa combinada MS/SMG (9, 10, 11). Tomamos también varias muestras del yeyuno y lo cultivamos en el mismo medio. En ambos casos los cultivos se colocaron en la estufa por 24 horas.

A las 24 horas observamos en los cultivos el fenómeno de la Lisogenia, con las características anotadas anteriormente.

Avanzando más en diluciones, trabajamos con 6 ratones, esta vez con las siguientes diluciones:

a) 1/500; b) 1/1000; c) 1/2000; d) 1/3000; e) 1/4000; f) 1/5000.

El 1er. ratón falleció a las 26 horas.

El 2º a las 28 horas.

El 3º a las 30 horas.

El 4º no falleció.

El 5º no falleció.

El 6º no falleció.

Este mismo procedimiento hicimos con otra cepa lisogénica aislada de una "charca" del Agustino, siendo los resultados semejantes.

De esto pudimos deducir que la dosis mínima letal fue a la dilución de 1/2,000. En total hemos usado 20 ratones de lo cepo del Instituto Nacional de Higiene.

Pero debemos dejar constancia de que la dilución 1/2,000 que hemos encontrado como dosis mínima letal, no es del todo rigurosa por cuanto la lectura hecha en el Espectógrafo de Coleman nos da sólo la densidad de gérmenes que en este caso fue de 0.40 a 0.45, que equivale a 1.7 por 10^3 /cc., o sea que unas están vivas y otras muertas, por consiguiente, el número de bacterias que va a producir la muerte del animal va a ser menor que la que indica el Espectrofotómetro.

Esto lo pudimos comprobar al sembrar en placas combinadas las distintas diluciones, observando que unas colonias eran lisogénicas y otras, en menor proporción, no presentaban ninguna alteración.

También hicimos estudios de inoculaciones en ratones (trabajamos también con 20), con la cepa no lisogénica (*); produciéndose la muerte de los ratones a la dilución de 1/500, siendo ésta la dosis "mínima letal", o sea menos virulenta que las cepas lisogénicas.

Los estudios al respecto aún no son definitivos por lo que continuaremos hasta tratar de aclarar más la patogenicidad de la *Pseudomonas aeruginosa* en animales de laboratorio.

Observamos que los ratones que eran inoculados, si pasaban del tercer día, ya no morían.

DISCUSION

Los resultados revelan que es frecuente encontrar cepas de *Ps. aeruginosa* en estado lisogénico a partir de muestras obtenidas del medio ambiente (cuadros 1 y 2).

De 146 muestras, se aislaron 16 cepas con alteraciones líticas manifiestas, similares a los hallazgos del Prof. Colichón y colaboradores, en muestras provenientes de infecciones humanas de diversa naturaleza (12). En una cepa no se pudo evidenciar ningún efecto lítico, aún realizando resiembras previas en caldo SMG.

Como se demuestra en el cuadro N° 3, el caldo tetracionato ha servido para realizar el aislamiento primario por su acción selectiva, el estudio de la producción del pigmento y como medio de aparente poder inductor de la lisogenia comparado con la del caldo SMG. En el caldo tetracionato, la pigmentación se produjo a las 48 horas y en el medio de SLU a las 24 horas, pero en éste último, después del previo aislamiento de la cepa, encontrándose en ambos medios variaciones relativas inherentes a las cepas.

Además del comportamiento bioquímico y de la pigmentación, la prueba de la ciclotromo-oxidasa se utilizó para identificar la *Ps. aeruginosa*, evidenciando que en esta reacción el viraje se presentó con variaciones que oscilan en 15 a 58 segundos, lo cual nos permitió diferenciarla del *B. alkaligenes*.

Colichón, H. y colaboradores (12) observaron en los medios de Agar Azida, Difco (29) adicionando sangre de conejo al 5% de agar hipertónico de Chapman (29) en placas combinadas, que la *Pseudomonas aeruginosa* no crece en el medio MH y que en el medio Az., crece pero su desarrollo es pequeño, no presentándose las alteraciones líticas con la

(*) Única cepa no lisogénica aislada.

Cuadro N° 1. Aislamiento de la *Pseudomona aeruginosa* lisogénica en aguas y bebidas de Lima y alrededores

DISTRIBUCION	N° de Muestras	Efecto Lítico Directo (a)	en MS/SMG Inducción en caldo SMG	Casos Positivos a Ps. Aer.
Aguas servidos en la ciudad:				
Barrios Altos	5	—	—	—
Breña	5	—	—	—
Aguas servidos en el campo:				
El Agustino	3	—	1	1
La Molina	3	—	—	—
San Cosme	3	—	1	1
Aguas estancadas de la ciudad:				
Barrios Altos	5	—	—	—
Breña	5	—	1	1
Aguas estancadas del campo:				
El Agustino	18	—	3	3
La Molina	4	—	—	—
San Cosme	15	—	2	2
Líquido de lavado de guantes: (Maternidad de Lima)				
	10	—	—	—
Bebidas:				
Chicha morada	3	—	1	1
Jugo de frutas	2	—	—	(1)
T O T A L	81	0	9	10

(a) A partir del sedimento.

(1) Una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* no lisogénica.Cuadro N° 2. Aislamiento de la *Pseudomona aeruginosa* Lisogénica en aire de hospitales, en Lima.

DISTRIBUCION	N° de Muestras	Efecto Lítico Directo (a)	en MS/SMG Inducido en caldo tetracionato	Casos Positivos en Ps. Aer.
Aire: Hospital del Niño, sala de quemados de piel.	25	—	4	4
Aire: Hospital del Niño, sala de prematuros.	6	—	1	1
Aire: Hospital Arzobispo Loayza, sala de quemados de piel.	24	—	2	2
Aire: Instituto de Enfermedades Neoplásicas, Consult. Externo.	10	—	—	—
	65	0	7	7

(a) A partir de sedimento.

nitidez y características, como sucede en los medios de placas combinadas MS/SMG (9, 10, 11).

Esto lo hemos podido apreciar a través de todo nuestro trabajo.

Con respecto a las inoculaciones en ratones no se ha llegado a establecer todavía la relación de patogenicidad en los animales de experiencia entre cepa lisogénica y no lisogénica de *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, en dos cepas lisogénicas y una no lisogénica encontramos mortalidad en ratones con variaciones en la dosis letal de 1/2,000 para las lisogénicas y 1/5000 para las cepas no lisogénicas.

Habiendo aislado la *Pseudomonas aeruginosa*, el estado lisogénico del aire de salas de diferentes hospitales, en pacientes con quemaduras de piel, es obvio, que este hecho constituya un peligro para quemados que llegan sin estar contaminados con la *Pseudomonas aeruginosa*. Por tanto, consideramos que la asistencia hospitalaria debe encarar este hecho por ser de suma gravedad.

Es importante también mencionar que los médicos, enfermeras y demás personal que atiende a dichos pacientes, tomen las precauciones del caso para no contaminar a otros enfermos no infectados.

CONCLUSIONES

1. Se ha estudiado 146 muestras de diferentes ambientes, de las cuales se han aislado 16 cepas *Pseudomonas aeruginosa* al estado lisogénico y una cepa al estado no lisogénico, fenómeno que se describe por primera vez la *Pseudomonas aeruginosa* aislada del medio ambiente,
Estas cepas fueron aisladas del aire del ambiente de hospitales, de charcas y aguas servidas del campo y de la ciudad y de las bebidas.
2. En las *Pseudomonas aeruginosas* lisogénicas se produce fenómenos de lisis completa e incompleta, presentando un brillo plateado característico. Esto se pone de manifiesto al sembrar las muestras en placas combinadas MS/SMG.
3. En todos los casos la lisogenia de *Ps. aeruginosa* se obtuvo en forma indirecta, tanto en caldo SMG como en caldo tetracionato, según las muestras. En el caldo SMG se estudió la lisogenia a partir del aislamiento de la *Pseudomonas* y en el caldo tetracionato directamente a partir del espécimen.
4. El caldo tetracionato ha dado buenos resultados en el aislamiento del aire y productos contaminados y producción de pigmento de la *Ps. aeruginosa*.

5. El hecho de haber aislado la *Pseudomona aeruginosa* al estado lisogénico del aire de sala de diversos hospitales con pacientes quemados, nos indica el gran peligro a que están expuestos los que llegan con quemaduras de piel sin estar infectados con dicho germen. Por este motivo es necesario que las autoridades hospitalarias respectivas tomen en cuenta este hecho por ser de suma gravedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Bazán, A.: El niño quemado, problema social. Rev. Hosp. del Niño, 16: 491, 1954.
2. Septicopiohemia en quemaduras. Rev. Hosp. del Niño, 62, 1955.
3. Estudio clínico experimental de las infecciones a *Pseudomonas piocianica* en el quemado. Rev. Hosp. del Niño, 18: 113, 1959.
4. Bucher, G.E.; Stephens, J.M.: A disease of gashoppers caused by the bacterium *Pseudomonas Aeruginosa*. (Shröter) Migula, J. Microb. 3: 611, 1957.
5. Burnet, F.M. and Stanley, W.M.: The viruses. Biochemical, Biological and Biophysical Properties. New York. Academic Press 1959 T.2; Plant and Bacterial viruses.
6. Casanova, T.: Complicaciones septicopiohemia en quemados del Hosp. del Niño. T.: Univ. Nac. May. San Marcos, Fac. Med. Lima, 1954.
7. Colichón, H.: Los agentes etiológicos de las infecciones intestinales. Rev. Per. de Pediatría, 5: 72, 1964.
8. Métodos de repicaje y clasificación presuntiva de los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* Rev. Per. de Pediatría, 6: 11, 1957.
9. Public Health Report, 67: 401, 1952.
10. Amer. J. Clin. Path. 23: 506, 1953.
11. Colichón, A.: An. Fac. Med. Lima, 39: 1,083, 1956.
12. Gardini, W.; Burstein, S.; Romero, O.; Colichón, A.: Alteraciones producidas por el fago en el desarrollo de la *Pseudomonas aeruginosa* lisogénica. Separata Rev. Pat. 6: 32 - 44, 1961.
13. Curso práctico de Microbiología Médica, 1959.
14. Cruick Shank, C.N.N. and Lowborry, E.J.L.: The effect of procyonin on human Skin cells and Leukocytes. Brit. J. Exper. Path. 34: 583, 1953.
15. Curvelo, A.; Márquez, V. y Flores Palma, R.: Estudio de un gran brote epidémico de gastroenteritis infantil de posible origen piocianico. Rev. Med. Cubana, 65: 793, 1954.
16. Cuther, M. and Cuther, P.: *Pseudomonas Meningitis*. Amer. Practitioner, 4: 200, 1953.
17. Forkner, Jr. C.E.: *Pseudomonas aeruginosa* infections. Modern Medical monographs. 22, 1960.
18. Forkner, Jr. C.E.; Frei, E.; Edgomb, J. and Utz, J.: *Pseudomonas septicemia* (Observations on 23 cases) Am. J. Med., 25: 877, 1958.
19. Gaby, W.L. and Hadley, G.: *Pseudomonas Aeruginosa* practical Laboratory identification Test, J. Bact. 74: 356, 1957.
20. Grados, O.: Estudio bacteriológico de la sensibilidad antibiótica y el empleo de bacteriófago en el tratamiento de las úlceras tórpidas Ts. (Br) Univ. Nac. May. San Marcos, Fac. Med. Lima, 1957.
21. Hunter, C. and Ensing, P.: An epidemic of diarrhea in a newborn nursery caused by *Pseudomonas Aeruginosa*. Am. J. Pub. Health 37: 1166, 1947.

22. Jacobs, D.: Las Bacterias Lysegenes et La Notion de Provirus. Paris, Masson et cie. 1954 (Monographies Int. Pasteur) Cap. I.
23. Korngold, R.: Contribución al estudio de la epidemiología de la *Pseudomonas aeruginosa* y *Micrococo Pyogenes* Var. *aureus coagulasa positiva*. Tesis (Br) Univ. Nac. May San Marcos. Fac. Cienc. Biol., Lima, 1958.
24. Kovacks, N.: *Pseudomonas aeruginosa* identification by oxidase reaction. *Nature*, London, 178: 703, 1956.
25. Lilly, A.B. and Bearry, A.J.: Generalized infections dueto *Pseudomonas Aeruginosa* (*Bacillus Pyocyaneus*), with study of characteristic of local strains of organism. *M.J. Australia*, 1: 362, 1928.
26. Lowburry, E.J.L.: Contaminations of cetrimide and other fluids with *Pseudomonas Pyocyanea* *Brit. J. Indust. Med.* 8: 22, 1951 - 1952.
27. Lowburry, E.J.L.; Fox, J.: The epidemiology of infection with *Pseudomonas Pyocyanea* in a burns unit *J. Hyg. Camb.* 52: 403, 1954.
28. Mc Leod, J.W.: The hospital urine bottle and bedpan as reservoirs of infection by *Pseudomonas Pyoceanea*. *Lancet*, 1: 394, 1958.
29. Manual Difco: 9 Ed. Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan, 1953.
30. Marckley, K.; Gurmendi, G.; Chávez, P.M.; Bazán, A.: Fatal *aeruginosa* septicemia in burned patients, *Ann. Surg.* 145: 175, 1955.
31. Morey, G.: Las quemaduras en el niño como problema social. *Rev. Hosp. del Niño.* 6: 17, 1944.
32. Piciánico en quemaduras como complicación grave. *Rev. Hosp. del Niño*, 18: 199. Set. Nº 71, 1957.
33. Cruz, H.; Velit, E.: Infecciones a *Pseudomonas aeruginosa* sola y asociada en lactantes *Rev. Hosp. del Niño*, 72, 1957.
34. Smith y Conant: *Bacteriología de Zinsser.* 499 2da. ed. 1960.
35. Topley, W.W.C.: *Principles of bacteriology and inmunity* 4a. ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1956.