

## PATRON DE SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE CEPAS DE PSEUDOMONAS

*Dr. Belisario Gallegos \**  
*Dr. Exequiades Paz \*\**  
*Dr. Alfredo Villalobos \**  
*Dra. Auramarina de Roldán \**  
*Dr. Ludonildo Lugo \*.*

### INTRODUCCION

Hoy día los grandes avances médico-quirúrgicos en los procedimientos de diagnóstico y terapéuticos, los cuales han hecho posible prolongar la vida de pacientes condenados en el pasado a una muerte inevitable, han incrementado en forma significativa el número de individuos altamente susceptibles a los procesos infecciosos, hasta el punto que se considera que en gran parte, las infecciones causadas por los microorganismos considerados como "oportunistas", son consecuencia o enfermedades del progreso médico (1,2).

El advenimiento y disponibilidad para su uso en clínica de los antimicrobianos a partir de la década del 40, significó un profundo cambio en el patrón de los microorganismos responsables de los procesos infecciosos intrahospitalarios representados primordialmente por los cocos Gram positivos (*Staphylococcus* — *Streptococcus*) en la era pre-antibiótica, a la

---

\* Cátedra de Microbiología - Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

\*\* Cátedra de Microbiología - Facultad de Odontología. Universidad del Zulia.

presencia y resurgimiento de los bacilos Gram negativos, los cuales constituyen hoy en día la causa de aproximadamente dos tercios de todas las infecciones que se presentan en pacientes hospitalizados. (2,3).

*Pseudomonas aeruginosa*, germen saprofito, ampliamente distribuido en la naturaleza especialmente en sitios húmedos, el cual exhibe genótipicamente resistencia a la mayoría de los desinfectantes, antisépticos y antimicrobianos de uso frecuente en clínica, ha llegado a ocupar un lugar privilegiado dentro de estos bacilos Gram negativos involucrados en la mayoría de los cuadros infecciosos intrahospitalarios. (1, 3, 4).

A pesar de la disponibilidad de las Polimixinas B y E para el tratamiento de los cuadros infecciosos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* en la década del 50, el gran avance en su quimioterapia lo viene a constituir la introducción de la Gentamicina en el año de 1963, aislada del *Micromonospora purpurea* (5). No obstante la frecuencia e importancia de los cuadros infecciosos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* se han incrementado y agravado por el hecho de la aparición y desarrollo de resistencia bacteriana que cada día se incrementa, (6-8) influida por el uso indiscriminado de los antimicrobianos, quizás en base al exceso de confianza depositado en los mismos, conduciendo a un olvido de las nociones más elementales de las técnicas de asepsia y antisepsia.

La resistencia bacteriana exhibida por *Pseudomonas aeruginosa* a la Gentamicina, unido a la problemática que representa su oto y nefrotoxicidad la cual oscila según Jackson y Arcieri (9-10) entre un 2 y 3% para la ototoxicidad, significaron la necesidad de aislar nuevos productos antimicrobianos o modificar los ya disponibles en el arsenal terapéutico para su tratamiento.

Modificaciones estructurales del anillo beta lactámico de las penicilinas hicieron posible la disponibilidad de la Carbenicilina (11) y la Ticarcilina, (12-13) las cuales se caracterizan por presentar una marcada actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* y en combinación a los aminoglicósidos representan hoy en día un arma poderosa para el tratamiento de los cuadros infecciosos severos producidos por las Enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*. (13)

Tomando como punto de partida el aislamiento de la Gentamicina en el año de 1963 por Weintein y col, (5) la industria farmacéutica ha puesto al servicio del médico varios aminoglicósidos entre los cuales merecen destacar por su reconocida efectividad a la Tobramicina aislada del *Streptomy-*

*ces tenebrarios* (14), la Sisomina aislada del *Micromonospora inyoensis* (15) y su derivado la Netilmicina o N-ethyl-sisomicina (16) y la Amikacina derivada de un aminoglicósido la Kanamicina. A. (17) Todos se caracterizan por una marcada actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* y variaciones no muy significativas en relación a la oto y nefrotoxicidad de la Gentamicina. (9-10)

En el presente estudio nos proponemos determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras de material clínico a cuatro agentes antimicrobiano de uso frecuente en clínica y disponibles en nuestro medio, para el tratamiento de los cuadros infecciosos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*.

#### MATERIALES Y METODOS:

Se estudian 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procesadas y aisladas en diferentes hospitales de la ciudad de Maracaibo.

Las cepas fueron sembradas en el medio de Mac Conkey, con el objeto de verificar su estado de pureza; posteriormente a partir de una colonia aislada, se procedió a practicar un repique a medio de T.S.I., el cual fue incubado durante 24 horas a 35° C.

Si el T.S.I. presentaba cambios compatibles con los de *Pseudomonas aeruginosa*, la cepa fue sometida a su identificación bioquímica utilizando los siguientes parámetros: Prueba de la oxidasa según el método de Kovacs (18), motilidad mediante visualización microscópica entre lámina y laminilla; producción de pigmentación utilizando los medios de *Pseudomonas* agar F y *Pseudomonas* agar P (19); investigación de la vía de ataque de los carbohidratos utilizando el medio de OF-glucosa según la técnica de Hugh y Leifson (20) y las reacciones en el medio de Sellers (21).

Las cepas caracterizadas como *Pseudomonas aeruginosa* fueron sometidas posteriormente a la pyocinotipia empleando la técnica descrita por Gillies y Govan (21) con una ligera variante: al utilizar agar sangre humana en lugar de sangre de caballo.

#### *Cepas indicadoras:*

Las cepas utilizadas como indicadoras en la pyocinotipia consisten en un set de ocho cepas de *Pseudomonas aeruginosa* denotadas con los

números del 1 al 8, obtenidas de las cepas utilizadas por Gillies y Govan (22) en sus trabajos.

#### *Técnica de la pyocinotipia:*

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* a ser tipiada es sembrada diametralmente a lo largo de la superficie de una placa de agar cerebro corazón al cual se le añade sangre humana a la concentración del 6%. El inóculo utilizado es aproximadamente  $4.2 \times 10^6$  bacterias, del microorganismo cultivado en caldo cerebro corazón (B.B.L.). La placa es luego incubada a 32°C durante 14-18 horas. El crecimiento macroscópico es removido con una lámina porta-objetos y el remanente del crecimiento es destruido añadiendo de 3-5 ml de CHCL<sub>3</sub> en la tapa de la placa de Petri; la cual es inmediatamente ensamblada con la otra porción de la placa que contiene el crecimiento bacteriano. Al cabo de 15 minutos el CHCL<sub>3</sub> es decantado y la placa se expone al aire por unos minutos para facilitar la evaporación de las trazas de vapores de CHCL<sub>3</sub>.

Cultivos de las cepas indicadoras creciendo en caldo cerebro corazón incubadas por 4-6 horas a 37°C y conteniendo un inóculo de aproximadamente  $1 \times 10^7$  x a  $1 \times 10^8$  son sembrados formando angulos rectos con las líneas del inóculo original: 5 cepas son sembradas del lado izquierdo de la línea y las otras 3 cepas del lado derecho. La placa es incubada a 37° C durante 8-18 horas.

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 N° 1 en la cual aparecen los 37 diferentes tipos de Pyocina de *Pseudomonas aeruginosa* reconocidos hasta el presente.

#### *Concentración inhibitoria mínima:*

Se determina la concentración inhibitoria mínima de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para la Gentamicina, Tobramicina, Carbenicilina y Colimicina utilizando la técnica que a continuación se especifica:

Las cepas en estudio son inoculadas en el Medio de Mac Conkey e incubadas por 24 horas a 37° C. El inóculo es preparado tomando tres colonias separadas del medio de Mac Conkey y se inoculan en un caldo cerebro corazón el cual es incubado a 37° por 18-24 horas. Al cabo de este

tiempo, el inóculo se ajusta hasta contener  $10^8$  bacterias por mililitro, mediante comparación con el Standard de McFarland (0.5 ml de Cloruro de Bario 0.048 M añadido a 99.5 ml. de ácido sulfúrico 0.35 N.) mediante el uso de un asa calibrada que dispensa 0.01 ml, el microorganismo es inoculado en placas de Mueller-Hinton agar conteniendo concentraciones decrecientes de los antimicrobianos en estudio a razón de 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 y 0.31 microgramos por ml para la Gentamicina, Tobramicina y la Colimicina. Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a la Carbenicilina se utilizan concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 microgramos por ml. Se utiliza una placa del mismo medio sin la incorporación del antimicrobiano como control. Las placas se incuban en un ambiente de aerobiosis a  $37^{\circ}$  C por 24 horas. Al cabo del período de incubación se determina la concentración inhibitoria mínima como la concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento del microorganismo.

## RESULTADOS:

Se estudiaron un total de 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras de material clínico.

La Tabla N° 2 detalla los diferentes tipos de muestras de material clínico a partir de las cuales se aislaron las cepas. El mayor porcentaje de las cepas estudiadas fue obtenido de las muestras de esputo y lavado bronquial lo cual representa el 35%.

En la tabla N° 3 se observan los resultados obtenidos de la Pyocinotipia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudiadas, donde fue posible aislar 9 pyocinotipos diferentes, resultando los pyocinotipos 1 (45%) 10 (30%) 3 (16%) los encontrados con mayor frecuencia. En tres del total de cepas estudiadas lo cual representa un 3% no fue posible su pyocinotipia.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para la Gentamicina, Tobramicina, Colimicina y la Carbenicilina. En relación a la Tobramicina, el 95% de las cepas investigadas fueron inhibidas por una concentración de 5 mcg/ml o menos y en solo 3 cepas lo cual representa el 3% concentraciones de 20 mcg/ml fueron necesarios para inhibir su crecimiento. Los resultados del estudio de la concentración inhibitoria mínima para la Tobramicina aparecen detallados en la Tabla N° 4.

TABLA No. 1

PATRONES DE INHIBICION PRODUCIDOS POR LOS 37  
TIPOS DIFERENTES DE PYOCINA DE PSEUDOMONAS PYOCYANEA

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	+	-	+	+	+	-	+	+
19	-	-	+	+	-	-	+	-
20	-	-	-	-	+	+	-	-
21	-	+	-	+	+	-	-	-
22	+	+	+	-	+	+	+	-
23	+	-	-	-	+	-	+	-
24	-	-	+	+	+	-	+	+
25	+	-	+	-	-	-	+	-
26	+	-	-	-	-	-	+	-
27	+	-	+	-	+	-	+	-
28	-	-	-	+	-	-	+	-
29	-	+	-	-	+	-	-	-
30	-	+	+	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	+	-
32	-	-	-	+	+	-	-	+
33	+	+	+	+	+	+	+	+
34	-	-	-	-	-	-	-	+
35	+	+	-	-	+	-	+	-
36	-	+	-	+	-	-	-	+
37	-	+	+	+	+	-	+	-

+ = INHIBICION

- = NO INHIBICION

**TABLA No. 2**  
**TIPOS DE MUESTRAS DE DONDE SE AISLARON LAS CEPAS**

ESPUTO	21
LAVADO BRONQUIAL	14
HECES	13
EXUDADO FARINGEO	12
ORINA	11
PUS PLEURAL	3
SECRECION NASAL	3
SECRECION OTICA	3
SECRECION PERITONEAL	2
SECRECION HERIDAS	2
SECRECION DE CARA	2
SECRECION SANGRE	2
SECRECION OCULAR	1
SECRECION MALEOLAR	1
SECRECION PULMONAR	1
SECRECION QUEMADURA	1
SECRECION FLEGMON GENITAL	1
SECRECION ULCERA PIE	1
SECRECION URETRAL	1
SECRECION PLEURAL	1
SECRECION TUBO DRENAJE	1
SECRECION TRAQUEOTOMIA	1
PUS DRENAJE	1
ULCERA VARICOSA	1
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>

TABLA No. 3  
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

PYOCINOTIPOS	No. CEPAS
PYOCYNOTIPO -1	45
PYOCINOTIPO - 10	30
PYOCINOTIPO - 3	16
PYOCINOTIPO - 4	1
PYOCINOTIPO - 6	1
PYOCINOTIPO - 17	1
PYOCINOTIPO - 18	1
PYOCINOTIPO - 22	1
PYOCINOTIPO - 30	1
NO TIPIABLES	3
<b>TOTAL</b>	<b>100</b>



TABLA No. 4

TOBRAMICINA  
CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (MCG/ML)

CIM	1.2	2.5	5	10	20	TOTAL
No. CEPAS	20	43	32	2	3	100
95 % CEPAS CON CIM IGUAL O INFERIOR A 5 MCG/ML.						

TABLA No. 5

GENTAMICINA

CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (MCG/ML)						
CIM	1.2	2.5	5	10	20	TOTAL
No. CEPAS	5	22	52	15	6	100
79 % CEPAS CON CIM IGUAL O INFERIOR A 5 MCG/ml.						

TABLA No. 6

COLIMICINA  
CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (MCG/ML)

CIM	1.2	2.5	5	10	20	TOTAL
No. CEPAS	6	55	24	11	4	100

85 % CEPAS CON CIM IGUAL O INFERIOR A 5 MCG/ML.

1 MCG = 12.500 UI. de COLIMICINA

TABLA No. 7  
 CAIBENICILINA  
 CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (MCG/ML)

CIM	12.6	25	50	100	200	TOTAL
No. CEPAS	11	37	23	20	9	100
71% CEPAS CON CIM IGUAL O INFERIOR A 50 MCG/ML						

En relación al otro aminoglicósido investigado, la Gentamicina, el estudio de los resultados los cuales aparecen detallados en la Tabla N° 5 nos permiten observar que el 79% de las cepas investigadas necesitaron de una concentración de 5 mcg/ml o menos para su inhibición y en el resto (15%) fue necesario concentraciones superiores a los 5 mcg/ml.

El estudio de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para la Colimicina aparecen detallados en la Tabla N° 6. El 85% de las mismas fueron inhibidas por una concentración de 5 mcg/ml o menos de Colimicina.

En relación a la Carbenicilina el 71% de las cepas investigadas fueron inhibidas por una concentración de 50 mcg/ml o menos y en un total de 29 cepas concentraciones superiores a 50 mcg/ml fueron necesarios para su inhibición. Los resultados del estudio de la concentración mínima para la Carbenicilina aparecen detallados en la Tabla N° 7.

## DISCUSION

El análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio, en relación a la frecuencia de pyocinotipos de *Pseudomonas aeruginosa*, nos permite observar que en nuestro estudio el pyocinotipo-1 es el más frecuente lo cual concuerda con lo reportado en trabajos realizados en nuestro medio por Villalobos y col. (23).

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras de material clínico se caracterizan generalmente por comportarse resistentes a un número elevado de antimicrobianos de uso frecuente en clínica, mostrando un patrón de susceptibilidad a varios aminoglicósidos de los cuales merecen destacarse la Gentamicina, (5) Tobramicina, (14) Sisomicina (15) Amikacina (17) y la Metilmicina (16). Igualmente el grupo de Polimixinas B y E al igual que dos derivados de la Penicilina, la Carbenicilina y Ticarcilina han mostrado in vitro e in vivo su efectividad contra este microorganismo (1, 11 - 13). Sin embargo, el uso y abuso de estos antimicrobianos en referencia, utilizados en ocasiones para el tratamiento de cuadros infecciosos, a bacterias Gram negativas por lo general o bien como pro-lácticos, han ocasionado que cada día se aíslan con mayor frecuencia cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales muestran una marcada resistencia mediada por factores R, la cual es compartida por varios de los aminoglicósidos y los derivados penicilínicos, (6, 7, 24, 25).

En base a los resultados de nuestro estudio, donde se determina mediante dilución seriada en agar la concentración inhibitoria mínima de 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, la Tobramicina aparece como el antimicrobiano de mayor efectividad. En efecto, el 95% de las cepas investigadas resultaron inhibidas por una concentración de 5 mcg/ml o menos, concentración que resulta por debajo de los niveles séricos obtenidos luego de la administración del antimicrobiano en sus dosis habituales de 1 a 1.5 mg/Kg./peso. (14).

En relación a la Gentamicina, antibiotico de uso más generalizado y disponible desde hace varios años en nuestro medio, el 79% de las cepas estudiadas fueron inhibidas por concentraciones de 5 mcg/ml. o menos, necesitando las restantes (21%) concentraciones de 10 mcg/ml o más para su completa inhibición, niveles considerados muy cercanos a los descritos como presentes en los cuadros de nefro y ototoxicidad para la Gentamicina. (9).

Si bien es cierto que varios investigadores han demostrado que la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a varios aminoglicósidos es afectada significativamente por la proporción de cationes divalentes de Magnesio y Calcio y que en el presente estudio los mismos no fueron determinados, la escogencia del método utilizado, dilución seriada en agar donde las proporciones de los cationes de Mg y Ca se asemejan a los presentes en suero humano, garantizan en parte los resultados obtenidos. (26-28)

En relación a la Colimicina la cual en el pasado previo a la introducción de la Gentamicina en 1963, era muy utilizada en el tratamiento de los cuadros infecciosos debidos a bacterias Gram negativas y particularmente a *Pseudomonas aeruginosa* (1) en la actualidad su utilización esta limitada a cuadros infecciosos intestinales o de uso dermatológico. Sin embargo su sinergismo comprobado con las sulfonamidas quizás le reserven un sitio en el arsenal terapéutico para el tratamiento de cuadros infecciosos debidos a *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* y *Serratia marcescens* (1).

En el presente estudio, el 85% de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resultaron inhibidas por una concentración de 5 mcg/ml o menos de Colimicina, niveles fácilmente obtenibles luego de la administración del antimicrobiano en dosis de 1.000.000 de Unidades. (1)

La Carbenicilina resultó en nuestro estudio, el antibiótico de menor efectividad in vitro contra las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* investigadas, el 1% de las mismas fueron inhibidas por concentraciones de 50 mcg/ml o menos, El uso en clínica de la Carbenicilina debido a la rápida

aparición de resistencia luego de su utilización; así como su alto costo y vía de administración han limitado la misma al tratamiento de cuadros infecciosos graves donde actúan en franco sinergismo con los aminoglicósidos (29). Si bien en el presente estudio se demuestra que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* en nuestra localidad muestran una sensibilidad variable a estos 4 antimicrobianos disponibles para el tratamiento de los cuadros infecciosos producidos por esta bacteria, el hecho de contar con estas armas poderosas ha llevado al médico a depositar una confianza exagerada en los mismos, olvidando conceptos fundamentales para su prevención y conduciéndonos a la problemática actual donde cada día aparecen microorganismos dotados de resistencia a la mayoría de los antimicrobianos disponibles.

### RESUMEN

Se estudian 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de muestras de material clínico las cuales se clasifican mediante la pyocinotipia siguiendo la técnica de Gillies y Govan.

La gran mayoría de las cepas corresponden al pyocinotipo 1 (45%) siguiéndole en orden de frecuencia los pyocinotipos 10 (30%) y 3 (15%).

En tres del total de cepas estudiadas lo cual representa el 3% no fue posible su clasificación por determinación de pyocinas.

Se determina la concentración inhibitoria mínima mediante la técnica de dilución seriada en placas de agar de las 100 cepas de *Pseudomonas aeruginosa* para la Gentamicina, Tobramicina, Colimicina y la Carbenicilina. Concentraciones de 5 mcg./ml de Tobramicina, Gentamicina Colimicina resultaron inhibitoria para el 95%, 79% y 85% de las cepas respectivamente. La Carbenicilina a una concentración de 50 mcg/ml inhibió el crecimiento del 7.1% de las cepas investigadas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- SMITH, HILLAS, Oportunistic infection. ANTIBIOTICS IN CLINICAL PRACTICE, Third Edition, University Park Press 1977.
2. EICKHOFF, T.C. New antibacterial treatment of nosocomial infections, Bull N. Y. Acad. Med. 51: 1056, 1975.
- 3.- CLUFF L.E. y JOHNSON J.E. Infecciones Nosocomiales ENFERMEDADES INFECCIOSAS. Primera Edición. Interamericana 1974.

- 4.- PSEUDOMONAS infection in Hospital BRIT. MED. J. 4:30. 1967.
- 5.- WEINSTEIN M.J. LUEDERMANN G.N. ODEN E.M. and WAGNAN G.N. Gentamicina a new broad spectrum antibiotic complex. ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER, 1, 1963.
- 6.- HOUNG E.T. and MCKAY FERGUSON E. Activities of Tobramycin and amikacin against Gentamycin resistant Gram-negative bacilli, LANCET 1: 423. 1976.
- 7.- MARTIN C.M. IKURI, N.S. ZIMMERMAN J. AND WALTZ J.A. A. virulent nosomocial Klebstella with a transferable R. FFACOR FOR GENTAMICIN EMERGENCE AND SUPPRESION J. INFECTION 124 (Suppl): 524, 1971.
- 8.- EICKHOFF. T.C. AND EHRET J.M. In vitro activity of netilmicin compared with gentamicin Tobramycin, Amikacin and Kanamycin, ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER, 11: 791, 1977.
9. JACKSON G.G. and ARCIERI G. Ototoxicity of Gentamicin in man: A Survey and controlled analysis of clinical experience in the United States J. INFECT. DIS 124 (Suppl) S130 1971.
10. FALCO F.G. SMITH H.M. and Arcieri G. Nephrotoxicity of aminoglycosides and gentamicin J. INFECT. DIS 119: 406 1969.
- 11.- BUTLER, K. ENGLISK RAY V.A. and TIMERECK A.E. Carbenicilin Chemistry and mode of action J. INFECT. DIS 122 (Suppl) S1 1970.
- 12.- BODEY G.P. and DEERHAKE B. In vitro studies of a-carboxyl-3-thienylmethyl penicillin, a new semisynthetic penicillin. ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 21:61. 1971.
- 13.- COMBER K.R. BASKER M.J. OSBORNE C.D. and SUTHERLAND R. Synergy between Ticarcillin and Tobramycin against Pseudomonas aeruginosa and Enterobacteriaceae in vitro and In vivo ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER 11: 956. 1977.
- 14.- NEU H.C. Tobramycin: An overview J. INFECT. DIS. 134 (Suppl) S3 1976.
- 15.- CROWE C.C. and SANDERS E. Sisomicin: Evaluation in vitro and comparison with Gentamicin and Tobramycin. ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER: 3 24. 1973.
- 16.- KWUNG, P.F. and NEU H.C. In vitro Study of Netilmicin compared with other aminoglycosides. ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER. 10. 525. 1976.



17.- PRICE K.E. PURSIANO T.A. DEFURIA M.D. and WRICHT G.E. Activity of BB-k8 (amikacin) against clinical isolates resistant to one or more aminoglycosides antibiotic ANTIMICROB. AGENTS. CHEMOTHER 5:143, 1974.

18.- KOVACS N. Identifications of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidasa reaction, NATURE, 170: 703, 1956.

19.- KING E.O. et al. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein J. LAB. CLINI. MED. 44: 301, 1954.

20.- 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.

21. SELLERS. E. Medium for differentiating the Gram negative non fermenting bacilli of medical interest J. BACT. 87:46, 1964.

22. GILLIES R. and GOVAN J. Typing of *Pseudomonas pyocianea* by pyocine production J. PATHOL BAC. 91: 339, 1969.

23. VILLALOBOS A., ROLDAN A. LUGO L. VILLASMIL M., HERNANDEZ M., CORVAIA I., PAZ E., SERRANO H. y LLERAS A. *Pseudomonas aeruginosa*. Aspectos bacteriológicos y serológicos. Rev. Fac. Med. (Maracaibo) 9:1-4 1977.

24. BRYAN L.E. SHAHRABADI M.S. and VAN DEN ELZEN. Gentamicin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* R. Factor Mediated resistance. ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER 6: 191, 1974.

25.- KORFHAGENT. R. and LOPER J.C. RPL. an R. Factor of *Pseudomonas aeruginosa* determining Carbencillin ang Gentamicin resistance. ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER. 7:69, 1975

26.- SIMELIS V.M. and JACKSON G.G. Activity of aminoglycoside antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: Specificity and site of calcium and magnesium antagonism J. INFECT DIS 127: 663. 1973.

27.- GILBERT D.N. KUTSCHER E. IRELAND P. BARBNETT J.A. and SANFORD J.P. Effect of the concentration of magnesium and calcium on the in vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Gentamicin J. INFECT. DIS 124. (Suppl) S 3. 1971.

28.- RELLER L.B. SCHOENKNECHT F.D. KENNY N.A. and SHEPHERD J.C. Antibiotic susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* selection of a control strain and criteria for magnesium and calcium content in media J. INFECT. DIS. 130:454. 1974.

29. MARKS M.J. HAMMERBERG S. GREENSTONE G. and SILVER  
B. Activity of newer aminoglycosides and Carbenicillin alone and in combination, against Gentamicin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ANTI-MICROB AGENTS. CHEMOTHER, 10:399. 1976.