

Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*

Adriana Callicó, Bárbara Cedré, Sergio Sifontes, Vismar Torres, Yadira Pino, Ana H. Callís, Sara C. Esnard.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.
E-mail: bcedre@finlay.edu.cu

Generalmente, *Pseudomonas aeruginosa* es considerada un patógeno oportunista. Bajo ciertas condiciones esta bacteria puede infectar diferentes tipos de heridas, particularmente quemaduras, pero también el tracto urinario y respiratorio. Esta bacteria se asocia con neumonía, endocarditis, meningitis y algunas cepas producen grandes cantidades de polisacárido extracelular, las que se asocian a casos de fibrosis quística. El objetivo de este estudio fue caracterizar cepas clínicas aisladas de pacientes con diferentes patologías con el fin de seleccionar cepas a partir de las cuales obtener antígenos candidatos a una vacuna por subunidades. Los serotipos de mayor frecuencia encontrados fueron el O1, O4, O6, O9 y O11 y se halló una relación entre el serotipo O9 y los casos de fibrosis quística. También se evaluó la virulencia de las mismas mediante el ensayo de siembra en rojo congo. El 72% de las 18 cepas evaluadas produjeron colonias blancas en más del 50% del total de colonias, lo que indica que la mayoría de nuestras cepas son virulentas, ya que este ensayo es una medida indirecta de la capacidad de producir alginato, el cual es considerado un importante factor de virulencia.

Palabras claves: Caracterización fenotípica, serotipaje, *Pseudomonas aeruginosa*, virulencia.

Introducción

P. aeruginosa, es una bacteria gramnegativa, aeróbica, que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza; aunque se considera como un microorganismo con poder patógeno mínimo, en las últimas décadas ha pasado a ser uno de los patógenos oportunistas más importantes en el medio hospitalario (1). La infección por *P. aeruginosa* raramente ocurre en personas con defensas normales. Para que la infección se presente deben haber factores predisponentes, como: enfermedades malignas, hematológicas, metabólicas (2). Esta bacteria representa un problema de salud importante, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. Existe un grupo poblacional especialmente vulnerable a las infecciones por *P. aeruginosa*, formado por los pacientes fibroquísticos (FQ). Esta bacteria coloniza muy eficientemente el tracto respiratorio de estos pacientes y a medida que progresa la infección se

seleccionan derivados mucoides de esta bacteria. Una vez que se establece la infección por cepas mucoides de *P. aeruginosa* en los pulmones de pacientes FQ estos están en la etapa final de la enfermedad, debido a que estas cepas no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y hasta el momento no existe un tratamiento efectivo contra cepas mucoides. Por esta razón resulta de gran importancia caracterizar desde el punto de vista fenotípico y serológico cepas clínicas de *P. aeruginosa* ya que su morfología indica el tratamiento a seguir y la etapa de la enfermedad (3).

Materiales y Métodos

Cepas: Se caracterizaron un total de 34 cepas aisladas de diversos materiales clínicos obtenidos de pacientes atendidos en hospitales pediátricos "Juan Manuel Márquez" y "William Soler" y en el Hospital Ortopédico "Frank País" (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas clínicas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados.

| Cepa | Procedencia | Cepa | Procedencia |
|------|-------------------|-------|-------------------|
| 1FQ | Fibrosis Quística | 697 | Herida quirúrgica |
| 2FQ | Fibrosis Quística | 325 | Herida quirúrgica |
| 3FQ | Fibrosis Quística | 406 | Herida quirúrgica |
| 4FQ | Fibrosis Quística | 700 | Herida quirúrgica |
| 5FQ | Fibrosis Quística | 859 | Herida quirúrgica |
| 7FQ | Fibrosis Quística | 808 | Herida quirúrgica |
| 71FQ | Quemado | 653 | Herida quirúrgica |
| 1 | Fibrosis Quística | 649 | Herida quirúrgica |
| 4 | Fibrosis Quística | 540 | Herida quirúrgica |
| 6 | Fibrosis Quística | 536 | Herida quirúrgica |
| 38 | Fibrosis Quística | 731 | Herida quirúrgica |
| 39 | Fibrosis Quística | 471 | Herida quirúrgica |
| 41 | Fibrosis Quística | 10/02 | Herida quirúrgica |
| 43 | Fibrosis Quística | 13/03 | Herida quirúrgica |
| 45 | Fibrosis Quística | 14/03 | Herida quirúrgica |
| 590 | Herida quirúrgica | 18/03 | Herida quirúrgica |
| 691 | Herida quirúrgica | 19/03 | Herida quirúrgica |

Caracterización microbiológica: Las cepas fueron recibidas de los hospitales en cuñas de agar hierro de Kligler y de aquí fueron transferidas a tubos con infusión cerebro corazón (BHI) con incubación a 37 °C durante 24 h. Luego se procedió a su confirmación mediante las pruebas recomendadas para esta especie que aparecen en la Tabla 3.

Confección del lote de siembra de trabajo: Se procedió a confeccionar el lote de siembra de trabajo de las cepas que resultaron positivas a todas estas pruebas, mediante el cultivo de las mismas en medio BHI durante 4 h a 37 °C y 200 r.p.m. Se mezcló 50 mL de este cultivo con 50 mL de leche descremada al 10% y 20 mL de glicerol, se distribuyó en viales estériles a razón de 1 mL por vial y se conservó a -70 °C.

Obtención de sueros somáticos de aglutinación

La producción de los antisueros somáticos para la clasificación serológica de las cepas se llevó a cabo con las 15 cepas de referencia serotipo específicas de la colección ATCC conservadas a -70 °C en glicerol y leche descremada al 10%, que aparecen relacionadas en la Tabla 2.

Tabla 2: Cepas de *P. aeruginosa* serotipo específicas (ATCC) empleadas para la obtención de los antisueros.

| Cepas | Serotipo | Cepa | Serotipo |
|---------|----------|-------|----------|
| 33348 | O1 | 33357 | O10 |
| 33349 | O2a | 33358 | O11 |
| 33351 | O4 | 33359 | O12 |
| IATS O5 | O5 | 33360 | O13 |
| 33354 | O6 | 33361 | O14 |
| 33353 | O7 | 33363 | O16 |
| 33355 | O8 | 33364 | O17 |
| 33356 | O9 | | |

Esquema de inmunización: Se llevó a cabo en conejos blancos Nueva Zelanda, de 2,5 kg de peso, mediante la inoculación por vía endovenosa de 6 dosis de células inactivadas por calor (0,25 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,0 mL), separadas por 3-4 días. Tres días después de la última dosis, los animales se sacrificaron y se desangraron por punción cardíaca. Los sueros se obtuvieron por centrifugación y se evaluaron mediante el ensayo de aglutinación en lámina (4)..

Tabla 3. Pruebas para la confirmación de especie *P. aeruginosa*.

| Prueba | Criterio de Aceptación |
|---|--|
| Coloración de Gram | Bacilos gramnegativos, alargados. |
| Producción de oxidasa | Desarrollo de color púrpura. |
| Siembra en agar hierro de kligler | Imagen alcalina de color rojo en todo el tubo, SH ₂ Negativo, gas Negativo. |
| Siembra en agar Cetrimide | Colonias redondas, lisas, de bordes regulares. Producción de pigmento verde (pioverdina) |
| Siembra en Mac Conkey | Colonias redondas, incoloras por no utilización de la lactosa. |
| Siembra en medios King A y King B para la producción de pigmentos | Producción de pigmentos (piocianina y pioverdina) |
| Medio base de oxidación fermentación de Hugh-Leifson | Producción de ácido por oxidación de la glucosa y no utilización de lactosa. |
| Crecimiento a 42 °C | Crecimiento positivo con formación de velo en la superficie. |
| Motilidad | Crecimiento alrededor del sitio de inoculación |
| β hemólisis | Halo transparente verdoso alrededor de las colonias |

Aglutinación en lámina: Las cepas serotipo específicas se sembraron en cuñas de agar BHI con incubación de 18-24 h a 37 °C y se realizaron suspensiones de las mismas con 2 mL de solución salina.

En una lámina portaobjetos se mezclaron 20 µL de cada suspensión celular con 20 µL de cada uno de los antisueros.

Absorción de los antisueros: Los antisueros que mostraron reacción cruzada con cepas de serotipo heterólogo se absorbieron con las mismas según el siguiente protocolo: se sembraron las cepas heterólogas en placas de BHI a 37 °C, 24 h, se recogió el crecimiento con 5 mL salina estéril y se inactivó 1 h a 100 °C. Luego se centrifugó la suspensión a 10 000 r.p.m. durante 30 min, el sedimento se resuspendió en igual volumen de suero y se incubó 1 h a 50 °C. Se centrifugó nuevamente 30 min a 10 000 r.p.m. Por último, el suero recuperado se filtró y se le añadió azida sódica (0,1%) como preservativo. La comprobación de la absorción se realizó mediante aglutinación en lámina (4).

Titulación de los antisueros: Cada uno de los antisueros fueron diluidos seriadamente desde 1:20 hasta 1:320 y se mezcló con una suspensión de la cepa homóloga repitiendo el procedimiento de la aglutinación en lámina. El título se definió como la mayor dilución del suero

que causó aglutinación visible en un espacio de tiempo de 1 min.

Clasificación serológica: Cada una de las cepas clínicas se clasificó desde el punto de vista serológico con los antisueros obtenidos en este trabajo, según los procedimientos anteriormente explicados.

Identificación de variantes mucoides: La determinación de colonias con fenotipo mucoides se realizó mediante la técnica de tinción con rojo congo (5). A partir de un cultivo de 18-24 h en BHI se hicieron diluciones seriadas, y se sembraron 100 µL de cada una de estas diluciones en placas de agar LB que contenía rojo congo al 0,01%, las cuales se incubaron durante 48 h a 37 °C. Se contó el número total de colonias y se determinó la relación entre el porcentaje de colonias rojas y blancas. En esta técnica las células bacterianas tienen la habilidad de unirse al pigmento, mientras que el exopolisacárido mucoides no y por lo tanto las cepas productoras de este material no se tiñen (6).

Resultados y Discusión

Pruebas microbiológicas

La coloración de Gram de cada una de las cepas en estudio reveló la presencia de un cultivo puro de bacilos alargados gramnegativos, propios de la especie *P. Aeruginosa*.



Foto 1: Colonias en agar Cetrimide.

Todos los aislamientos clínicos crecieron en agar Cetrimide con la producción de un pigmento verdoso característico de esta especie en este medio; el cual es específico para esta especie, pues contiene un inhibidor que impide el crecimiento de otras bacterias (Foto 1).

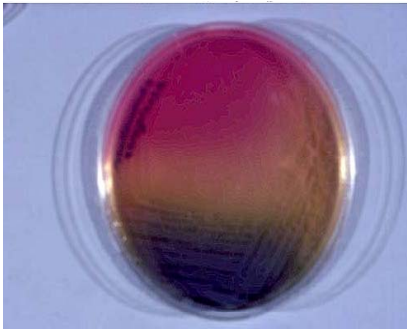


Foto 2: Colonias en agar Mac Conkey

Después de 24 h de incubación a 37 °C en agar Mac Conkey, las cepas mostraron un buen crecimiento y desarrollaron colonias de color blanco debido a que esta especie carece de la enzima para utilizar la lactosa presente en el medio de cultivo (Foto 2).

La prueba para determinar la actividad de la citocromo oxidasa resultó positiva en el 100% de las cepas, lo que se pudo evidenciar por el desarrollo de un color azul. Esta enzima oxida al citocromo C reducido y a su vez es transformada en su forma reducida e inactiva. Por transferencia



Foto 3. Prueba positiva a la citocromo oxidasa.

de electrones a oxígeno molecular, la citocromo oxidasa reducida se convierte de nuevo en la forma oxidada y activa.

Esta prueba ayuda a la identificación de muchas especies de bacilos no fermentativos y permite diferenciarlas de la familia *Enterobacteriaceae* (Foto 3).

El medio de agar semisólido se usó para detectar motilidad y en todos los casos se observó una zona de crecimiento difuso alrededor del sitio de inoculación, lo que demuestra la presencia de flagelo en todas las cepas de nuestro banco.

Luego de un período de incubación de 24 h en los medios King A y King B para la producción de pigmentos, se observó para todas las cepas una coloración verde fluorescente (piocianina) en el medio King A y solo el 94% de las mismas produjeron pioverdina en el King B. El empleo simultáneo de ambos medios de cultivo permite una rápida identificación preliminar de la mayoría de las especies de *Pseudomonas*, por cuanto, la mayoría de las cepas pueden sintetizar únicamente piocianina, otras únicamente pioverdina y otras cepas pueden sintetizar ambos pigmentos. La producción de pigmentos es una característica diferencial importante en la identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores (Foto 4).

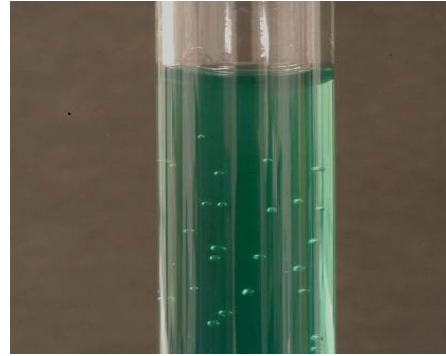
La mayoría de los medios de cultivo convencionales diseñados para detectar la producción de ácido de bacterias fermentativas tales como las enterobacterias no resultan adecuados para el estudio de bacilos no

fermentadores, ya que generalmente, son especies de crecimiento lento y que producen ácidos extremadamente débiles. Por esta razón, Hugh y Leifson diseñaron un medio oxidativo-

fermentativo (OF) para acomodar las propiedades metabólicas de los bacilos no fermentativos. En este medio, se sembraron todas las cepas en presencia de dos azúcares, glucosa y lactosa.



A



B

Foto 4: Reacción oxidación-fermentación en medio Hugh-Leifson. Acidificación oxidativa de la glucosa en aerobiosis (5a). Ausencia de crecimiento en anaerobiosis (5b).

Con el primero, se observó un color amarillo en la superficie del tubo incubado en condiciones de aerobiosis (5a), debido a la acidificación oxidativa de la glucosa, que al variar el pH del medio, torna al indicador de pH (azul de bromotimol) de color verde a amarillo. En los tubos incubados en anaerobiosis, no hubo crecimiento ya que *P. aeruginosa* es un germen estrictamente aerobio. En el caso del medio con lactosa, incubado con aereación, la bacteria se ve incapacitada de metabolizar la lactosa por no tener las enzimas necesarias para ello, por lo que degrada las peptonas rindiendo aminas fuertemente alcalinas lo que hace que el indicador se vuelva azul más intenso.

En el medio agar hierro de Kligler (KIA) todos los aislamientos clínicos mostraron una imagen con superficie y fondo alcalino por la producción de aminas a partir de las peptonas que componen el medio, característico de organismos no fermentadores, no produjo gas, ni sulfuro de hidrógeno.

Una de las características de *P. aeruginosa* es la producción de hemolisina, enzima que le permite la degradación de la hemoglobina presente en el agar sangre de carnero. En este medio todas las

cepas produjeron halos de color verdoso, propios de una hemolisis parcial (β hemolisis) (Foto 5).



Foto 5. *P. aeruginosa* produjo halos de color verdoso en agar sangre

La hemolisina de esta bacteria se considera un importante factor de virulencia pues contribuye a limpiar el mucus de las superficies dejando expuestos nuevos sitios para la adherencia y multiplicación de las células.

Una de las pruebas de mayor validez es el crecimiento a 42 °C, pues a esta temperatura son

incapaces de crecer otras especies del género. El 100% de nuestras cepas mostraron un crecimiento en forma de velo en la superficie del tubo lo que confirmó la presencia de este microorganismo.

Confección del lote se siembra de trabajo (LST)

Como resultado de la confección del LST, en nuestro cepario contamos con 34 cepas de *P. aeruginosa* aisladas de diferentes procesos infecciosos, las cuales se encuentran conservadas a -70°C .

Obtención de antisueros de aglutinación

P. aeruginosa se clasifica en 17 serotipos somáticos según el sistema internacional de serotipaje. La serotipificación de esta especie sobre la base del antígeno O se considera una herramienta útil para el diagnóstico de infecciones por *Pseudomonas* que ocurren en pacientes inmunodeprimidos y principalmente en FQ.

En nuestro laboratorio sólo contamos con 15 de las 17 cepas serotipo específicas, por lo que solo produjimos 15 de estos antisueros, pero que son los correspondientes a los serotipos de mayor circulación. Los antisueros una vez obtenidos se evaluaron frente a las 15 cepas serotipo específicas mediante el ensayo de aglutinación en lámina. La observación más notable fue el amplio rango de reacciones cruzadas, por lo que se procedió a su absorción con las cepas heterólogas. En algunos casos los antisueros fueron seriadamente absorbidos y al ser evaluados se observó que las reacciones cruzadas habían sido eliminadas, mientras que las reacciones homólogas fueron mantenidas. Es decir, las absorciones resultaron en la eliminación del reconocimiento cruzado por parte de los antisueros, los anticuerpos residuales mostraron especificidad solamente por las cepas homólogas.

Los 15 antisueros absorbidos mediante este procedimiento constituyeron el set usado para el serotipaje de los aislamientos clínicos.

Los antisueros específicos producidos contra cada una de las cepas prototipos fueron titulados contra todas las suspensiones de las cepas tipo. En todos los casos, excepto para el serotipo O6, los títulos fueron de 1:20, el cual resulta la

dilución de trabajo apropiada para llevar a cabo este tipo de prueba.

Para la clasificación serológica, el antisuero O6 se diluyó diez veces para llevarlo a la dilución de trabajo (1:20), el resto se usó tal y como se obtuvo. Todas las cepas fueron tipadas usando la técnica de aglutinación rápida en lámina. Los resultados de la clasificación serológica se muestran en la Figura 1.

Los serotipos más comunes encontrados en nuestro medio fueron el O1, O4, O6, O9 y O11, pero pudimos observar una correlación entre el serotipo O9 y los pacientes FQ, 12 de las 14 cepas de enfermos FQ respondieron frente a este antisuero, es decir, el 85% de las cepas aisladas de esta patología reconocen a anticuerpos contra el serotipo O9, aunque también reaccionaron en menor medida con otros antisueros. Esto se explica ya que generalmente las cepas de pacientes FQ resultan poliaglutinables, además, a los pacientes con esta patología infectados con *P. aeruginosa* frecuentemente se les aísla más de una cepa probablemente de diferentes serotipos. La envoltura celular de *P. pseudomonas*, la cual es similar a la de otras bacterias gramnegativas, consta de tres capas: fosfolípidos, proteínas y el LPS. Este LPS consta de una cadena lateral y un núcleo oligosacárido. Evidencias recientes sugieren que el LPS de un gran porcentaje de cepas aisladas de pacientes FQ pudieran tener poca o ninguna cadena lateral (antígeno O) y este hallazgo se correlaciona con la poliaglutinabilidad de estas cepas con los sueros para el tipaje. Existe la hipótesis de que el fenómeno de la poliaglutinación es causado no sólo por la ocurrencia en la cepa de dos o más factores O correspondientes al antisuero con la cual las cepas aglutinaron, sino por componentes no definidos presentes en las células, además del factor específico O (7).

Los otros serotipos que se presentaron con mayor frecuencia son el O1, O4, O6, O10, O11 y O14, tal y como se ha obtenido en trabajos anteriores reportados por otros autores (7). Particularmente, entre los aislamientos de heridas quirúrgicas, los serotipos predominantes fueron el O9 y el O6.

Es de señalar que la preparación de antisueros resulta bastante trabajoso y muchos laboratorios

han experimentado dificultad en la preparación de antisueros específicos de altos títulos (4) y varios autores han reportado que muchas de sus cepas

no pudieron ser satisfactoriamente tipadas debido a que aglutinaban con más de un tipo de antisuero (8,9).

Figura 1. Serotipificación de las cepas clínicas mediante la técnica de aglutinación en lámina

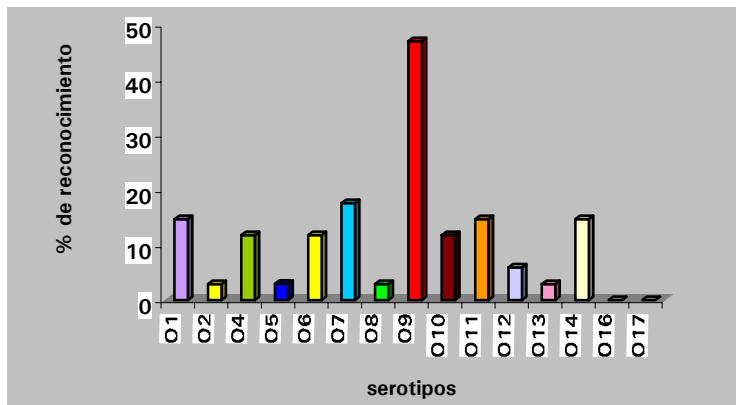
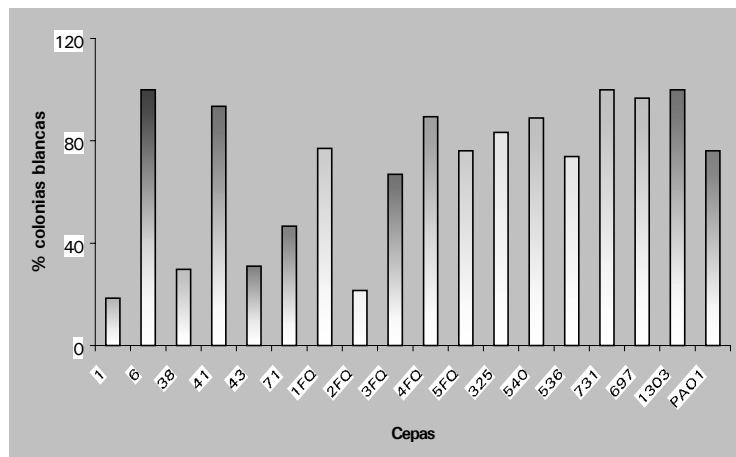


Figura 2. Porcentaje de colonias productoras de exopolisacárido según la prueba para la identificación de variantes mucoides.



Identificación de variantes mucoides

De las 18 cepas evaluadas para su capacidad de producir exopolisacárido, el 72,2% produjo colonias blancas en más del 50% del número total de colonias, por lo que se puede considerar que estas cepas son productoras de alginato (Figura 2) e indica diferencias en la superficie celular de las diferentes cepas. La poca absorción del colorante pudiera ser debida, según la literatura, a

pérdida o modificación de un ligando o a la secreción de un factor que impide la unión del rojo congo. El crecimiento de las colonias blancas en agar rojo congo sugiere un incremento en la producción de exopolisacárido lo que previene la toma del colorante (10).

Reportes recientes de aislamientos mucoides de FQ sugieren que la producción de exopolisacárido pudiera ser importante en la patogénesis ya que esta matriz proporciona una barrera física que interfiere con la fagocitosis.

La siembra en agar rojo congo, induce una morfología colonial característica de las cepas según produzcan o no exopolisacáridos y la producción de este compuesto es un importante factor de virulencia en *P. aeruginosa*, ya que esta bacteria tiene la capacidad de producir esta matriz que es la que interactúa con el medio externo y a diferencia de las proteínas, los exopolisacáridos bacterianos son moléculas muy sencillas, que no tienen capacidad de inducir respuesta de anticuerpos, además las células de los mamíferos están recubiertas de polisacáridos antigénicamente similares. En el caso específico de *P. Aeruginosa*, las colonias que producen grandes cantidades del exopolisacárido no absorben el colorante por lo que no se tiñen de rojo.

La virulencia de diversos patógenos entéricos se ha correlacionado con la habilidad de los aislamientos de tomar el colorante rojo congo e incorporarlo a su citoplasma (11,12,13). Se sugiere que este test pudiera ser un buen marcador de virulencia y que los sideróforos pudieran ser importantes en la captura e internalización del colorante (14, 15)

En el caso de *P. aeruginosa*, constituye también un marcador indirecto de la virulencia, en este caso, por el contrario, las cepas de mayor virulencia son precisamente las que no son capaces de absorber el rojo congo, ya que la capa de exopolisacárido que las recubre imposibilita este efecto y este compuesto es precisamente el que le confiere un alto grado de virulencia debido a que le permite crecer formando una estructura de biocapas tanto en tejidos vivos como inertes. Este constituye un mecanismo de adhesión que usan las bacterias para evitar ser eliminadas con los flujos naturales como el moco o fuerzas mecánicas como el estornudo. Esta estructura constituye un importante sistema de defensa. Una vez adheridas a los epitelios, comienzan a multiplicarse mientras emiten señales químicas que las comunican entre sí. Cuando la concentración de estas señales supera un umbral determinado se activan los mecanismos genéticos de producción de exopolisacáridos (16). De este modo, las bacterias se multiplican embebidas dentro de una matriz de exopolisacáridos lo que da lugar a la formación de una microcolonia. Las bacterias individualizadas en el medio externo son fagocitadas con facilidad por las células inflamatorias y son más susceptibles a los antibióticos.

El desarrollo de biofilm en *P. aeruginosa* es seguido por algunos autores por la técnica de tinción específica con rojo congo debido a la estrecha relación entre la formación de la matriz y la producción de exopolisacárido. En este ensayo las células bacterianas se tiñen de rojo oscuro y el exopolisacárido de blanco o rosado (17).

Las cepas clínicas aisladas de pacientes mostraron una respuesta a la pruebas realizadas en correspondencia a la especie *P. aeruginosa* y la mayoría de las cepas que mostraron fenotipo mucosoide pertenecían a enfermos fibroquísticos en la etapa crónica de la enfermedad.

Referencias

1. Hoiby N. New antimicrobials in the management of cystic fibrosis *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;49:235-238.
2. Poole K. Multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*: resistance, regulation and activity. Abstract S29. In: Abstract book of the symposium *Pseudomonas '99: Biotechnology and Pathogenesis*, Maui, Hawaii. ASM Press, Washington, D. C. 1999.
3. Deretic V., Schurr M., Boucher J. and Martin D. Conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to mucoidy in cystic fibrosis: environmental stress and regulation of bacterial virulence by alternative sigma factors. *J. Bacteriol.* 1994; 176:2773-2780.
4. Duncan N., Hinton N., Penner J., and Duncan I. Preparation of typing specific for O antigen of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1976; 4(2):124-128
5. Harrison-Balestra C., Cazzaniga A., Stephen B. and Mertz P. A wound isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows formed biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatologic Surgery*. 2003; 29(69):631.
6. Paniagua C., Rivero O., Antigua J. and Naharo G. Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. Isolated from river. *J. Clin. Microbiol.* 1990;28:350-355.
7. Esnard S. Empleo de sueros diagnósticos producidos en la República Popular China para la serotipificación de *Pseudomonas aeruginosa* *Rev Cubana Farm.* 1997; 31(2):107-112.
8. Homma J., Kim K., Yamada M., Ito M. and Kawabe Y. Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa* and its cross infection. *J. Exp. Med.* 1976;40:347-359.
9. Lanyi B. Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa* 1 group specific somatic antigen. *Acta Microbiol Acad. Sci. Hung.* 1967;13:295-318.
10. Chung J., Altman E., Beveridge T. and Speert D. colonial morphology of *Burkholderia cepacia* Complex genomovar III: implication in exopolisaccharide production, pilus expression, persistence in the mouse. *Infection and Immunity* 2003;71(2):904-909.
11. Farmer J., Carter G., Miller v., Falkow S., and Watchsmuth I. Pyrazinamidase, CR-MOX agar, salicin fermentation-esculing hydrolysis and D-xilose fermentation for identifying pathogenic serotypes of *Yersinia enterocolitica*. 1992.

12. Ling M., Wash X., Xie I., Lim T., and Leung K. Use of green fluorescent protein (GFP) to study the invasion pathway of *Edwardsiella tarda* *in vivo* and *in vitro* fish model. *Microbiology*. 2002;146: 7-19
13. Nataro J. and Kaper J. Diarrheanic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11:142-201.
14. Ishiguro E., Ainsworth T., Trust T. and Kay W. Congo red agar a differential medium for *Aeromonas salmonicida* detects the presence of the cell surface protein array involved in virulence. *J. Bacteriol*. 1985;164:1233-1237.
15. Santos J., González C., Otero A., and García-López M. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish. *Appl. Environ. Microbiol*. 1999;32:243-247.
16. Costerton J., Philip S., and Greenberg E. Bacterial biofilm: A common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284:1318-1322.
17. Allison D. and Sutherland I. Congo red: development of specific staining technique, *Journal of Microbiological Methods*. 1984;2:93-99.

Phenotypical and Serological Characterizations of *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates

Abstract

The aim of this study was to characterize *P. aeruginosa* clinical strains isolated from patients with different pathologies in order to select the strains for obtaining candidate antigens for subunit vaccines. The most common serotypes found were O1, O4, O6, O9 and O11. We found a relation between O9 serotype and cystic fibrosis patients. The ability to produce white colonies was also studied by Congo red assay. Seventy two percent of 18 evaluated strains produced white colonies in more than 50% of the total of colonies, which indicates the most of our strains are virulent because this assay is an indirect measurement of the capacity to produce alginate, considered an important virulence factor.

Keywords: Phenotypical characterization, serotyping, *Pseudomonas aeruginosa*, virulence.