

MORFOLOGIESE ONDERSKEIDING TUSSEN VERSKILLENDE  
SEROTIPES VAN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* UIT  
HOSPITAAL INFEKSIES

deur

L R TIEDT

Verhandeling aangebied ter gedeeltelike  
voldoening aan die vereistes vir die  
graad Magister Scientiae aan die  
Potchefstroomse Universiteit vir  
Christelike Hoër Onderwys

September 1979

Leier: Prof. D. van Eeden

## INHOUDSOPGAWE

Bladsy

### HOOFSTUK 1

INLEIDING ... ..	1
------------------	---

### HOOFSTUK 2

MATERIAAL EN METODEDES ... ..	4
2.1 Rasse ... ..	4
2.1.1 Preservering van die kulture. ..	5
2.2 Agglutinasietoetse met behulp van antisera berei deur van Eeden (1963) ... ..	
2.2.1 Voorbereiding van bakteriese sus= pensies vir agglutinasietoetse .	6
2.2.1.1 Akkurate bepaling van seldigt= heid van bakteriesesuspensies ..	6
2.2.1.2 Voorbereiding van bakteriese sus= pensies vir flagellêre (H) agglu= tasie ... ..	8
2.2.2 Agglutinasietoetse .. ..	9
2.3 Voorbereiding van antisera .. ..	9
2.3.1 Voorbereiding van suspensies vir immunisering van konyne.. ..	10
2.3.2 Immunisering van konyne . . . .	10
2.3.3 Versameling van die serum ... ..	10
2.4 Agglutinasie met varsbereide an= tisera... ..	11
2.5 Elektronmikroskopie . . . .	11

2.5.1	Vorbereiding van kulture vir mikroskopiese ondersoek ... ..	12
2.5.2	Vorbereiding van roostertjies. ...	12

### HOOFSTUK 3

	RESULTATE.. ... ..	14
3.1	Kultuureienskappe en biochemiese reaksies .. ... ..	
3.2	Agglutinasietoetse met antisera wat vorberei is deur van Eeden (1963)	14
3.2.1	Agglutinasietoetse ... ..	14
3.3	Elektronmikroskopie ... ..	17
3.3.1	Die lengteverlopende lynstruktuur..	21
3.3.2	Die heliksstruktuur ... ..	23

### HOOFSTUK 4

	BESPREKING. ... ..	27
4.1	Klassifikasie . ... ..	27
4.2	Serologie . ... ..	29
4.2.1	Algemeen .. ... ..	29
4.2.2	Agglutinasietoetse ... ..	30
4.3	Elektronmikroskopie ... ..	30
4.3.1	Vergelyking met vorige elektronmik= roskopiese resultate .. ... ..	30
4.3.2	Modelle van die flagellêre struk= ture... ..	32
4.3.2.1	Die aantal lengteverlopende lyne of lyne van subeenhede ... ..	32
4.3.2.2	Die rangskikking van die subeenhede	34

4.3.3	Gevolgtrekking ... ..	35
	BEDANKINGS ... ..	37
	BRONNEVERWYSINGS . . . . .	38

## HOOFSTUK 1

### INLEIDING

Desnieteenstaande al die werk wat gedoen is met die identifisering en klassifisering van *Pseudomonas aeruginosa* deur die jare onder andere deur Sandiford, 1937; Christie, 1948; Wetmore & Gochenour, 1956; Lysenko, 1961; Stanier, 1966; en andere, kon daar nog nie tot 'n gesamentlike vergelyk gekom word nie. Die resultate van die navorsers het nie net van mekaar verskil nie, maar ook van dié wat opgeteken is in Bergey se handleiding (Buchanan & Gibbons, 1974). Selfs hierdie handleiding laat onsekerheid ten opsigte van klassifisering van sekere spesies van *Pseudomonas* (Buchanan & Gibbons, 1974, p. 241).

As gevolg hiervan het verskeie navorsers gepoog om deur middel van serologiese metodes 'n nuwe metode van identifisering en klassifisering ook binne die spesies te vind. Van hierdie navorsers was onder andere van den Ende, 1952; Matsui, 1959; Verder & Evans, 1961; Van Eeden, 1963; Lawn, 1967; Homma, 1970; Lányi, 1970 en Bradley, 1972. Die resultate het ook in hierdie gevalle ooreenkomste en verskille uitgewys (Pitt & Bradley, 1975, p. 97).

Ondersoeke van bakteriese flagella word vir 'n geruime tyd reeds gedoen en van die vroeëre navorsers was Kerridge, Horne en Glauert, 1962; Follett & Gordon, 1963; Glauert, Kerridge & Horne, 1963; Rogers & Filshie,

1963 en Claus & Roth, 1964; het slegs Kerridge et al., 1962 die detail van fynstruktuur by *Salmonella typhimurium* beskryf (Lowy & Hanson, 1965). Namate elektronmikroskopie ontwikkel het, het al hoe meer navorsers fynstruktuur bestudeer, onder andere Seider & Starr, 1968; Ichicki & Martinez, 1969; Fuerst & Hayward, 1969; Shapiro & Maizel, 1973), Czajkowski et al., 1974, (Doyle, Wiltberger, Burda & Winter, 1975). Andermaal het die resultate op ooreenkomste en verskille gedui.

Ook in die geval van *Pseudomonas* is die struktuur van flagella bestudeer, met dié van *Pseudomonas rhodoc* (Lowy & Hanson, 1965 en Schmitt, Raska & Mayer, 1974) en *Pseudomonas fluorescens* (Lowy & Hanson, 1965) in die meerderheid.

Terwyl die antigeniese eienskappe van die flagella van *P. aeruginosa* in serologiese reaksies gebruik word om tussen die verskillende rasse (H serotipes) te onderskei, is daar baie min gegewens oor die fynstruktuur van hul flagella. Dit is duidelik dat daar besliste intraspesifieke variasie ten opsigte van flagellêre antigeniese struktuur by *P. aeruginosa* bestaan. Uit die werke van bogenoemde navorsers blyk dit dat, by daardie organismes wat bestudeer is, daar ook verskille in die fyn struktuur van die flagella by verskillende rasse van dieselfde spesie waarneembaar is. Die vraag ontstaan nou of soortgelyke verskille in die flagellêre fynstruktuur by *P. aeruginosa* aangetoon kan word en indien wel, of dit enige verband met verskille in antigeniese samestelling hou.

Hierdie ondersoek is onderneem in 'n poging om in antwoord op hierdie vraag te probeer vind. In dié proses is tegnieke, soos deur ander navorsers gebruik, maar terselfdertyd ook ander tegnieke toegepas. Dit was ook moontlik om die flagellêre antise-ra, soos deur van Eeden (1963) berei en gebruik, in hierdie geval op nuutversamelde rasse van *P. aeruginosa* te gebruik.

## HOOFSTUK 2

### MATERIAAL EN METODEDES

#### 2.1 Rasse

Elf kulture van *Pseudomonas aeruginosa* is uit wonde en brandwonde van nie-blanke buitepasiënte by die Potchefstroomse hospitaal geïsoleer. Deur middel van bakteriologiese identifikasietodes is hulle as *P. aeruginosa* bewys. Hulle is genommer vanaf 1 tot 11. Vir die verkryging van suiwerkulture is die isolate op 0,2% Cetavlonagar oorgeplant en by 37°C geïnkubeer. 'n Enkelkolonie is afgetel en uitgestryk op Asetamiedagar en by 37°C geïnkubeer. Hierna is weer 'n enkelkolonie afgetel en op 'n voedingsagarskuinsbodem uitgestryk. Ter bevestiging van die voorafgaande toetse is elke kultuur ook geïdentifiseer deur middel van roetine biochemiese toetse waarvan die volgende gebruik is: die fermentasie van glukose, laktose, mannitol; lakmoesmelk; die Metielrooi toets op kulture gekweek in glukose-fosfaatmedium vir 5 dae by 37°C; die Voges Proskauer toets op die kulture gekweek in O'Mearase medium vir 5 dae by 37°C; nitraatreduksie in sokulture geïnkubeer by 37°C vir 5 dae; indoolproduksie in triptoonwaterkulture geïnkubeer by 37°C; vorming van swaelwaterstof (H<sub>2</sub>S) in drievoudige suikerysteragar; gelatienervloeiing in voedingsgelatiensteekkulture by kamertemperatuur; groei op voedingsagarskuinsbodems by 41°C en pigmentproduksie op voedingsagarskuinsbodems geïnkubeer by 37°C.



Cruickshank, Duguid, Mannion & Swain (1975), Werkboek vir bakteriese media en kleurstowwe van die Departement Mikrobiologie, P.U. vir C.H.O.

### 2.1.1 Preservering van die kulture

Die kulture is in 'n droë toestand gepreserveer soos beskryf deur van Eeden (1963, p.10). Van elke kultuur is 'n subkultuur gemaak op voedingsagar wat toegelaat is om te stol in plat mediese flesse wat plat neergelê is. Na oornaginkubasie vir 15 uur by 37°C is die groei met 5 cm<sup>3</sup> voedingsop afgespoel. Ascorbiensuur is in gesmelte voedingsgelatien opgelos tot 'n finale konsentrasie van 0,25%. Gelyke volumes van die voedingsgelatien, afgekoel tot 40°C, en van die bakteriese suspensie in voedingsop is in steriele proefbuise gemeng. Met behulp van 'n steriele pipet is druppels van die mengsel op steriele wasfiltreerpapier in 'n steriele petribakkie aangebring. Die voorbereiding van die wasfiltreerpapier is soos volg: Kleiner gesnyde Whatman Nr. 1 filtreerpapier word vir 5 minute in gesmelte parafienwas geplaas en daarna in 'n steriele petribakkie geplaas om af te koel en te stol. Die petribakkies met die druppels kulture is in 'n desikkator oor fosforpentoksied geplaas en geëvuëer. Omdat *P. aeruginosa* 'n proteolitiese organisme is en die gelatien kan vervloei, is die desikkator in 'n yskas geplaas totdat die druppels tot dun skyfies uitgedroog het. Hierdie skyfies is in kleiner steriele proefbuisies, met watteproppe verseël, oor fosforpentoksiet in 'n desikkator gestoor. Die oorspronklike kulture is op voedingsagar-skuinsbodems in skroefpropbottels by kamertemperatuur bewaar.

Elke 4 tot 5 maande is nuwe subkulture gemaak. Vir elke eksperiment is 'n subkultuur gemaak deur voedingsop met een van die droë kultuurskyfies te inokuleer en by 37°C te inkubeer.

## 2.2 Agglutinasietoetse met behulp van antisera berei deur van Eeden (1963)

Die eksperimente is uitgevoer met elf geïsoleerde kulture teenoor die beskikbare immune sera van van Eeden (1963, p. 12).

### 2.2.1 Voorbereiding van bakteriese suspensies vir agglutinasietoetse

#### 2.2.1.1 Akkurate bepaling van seldigheid van benodigde bakteriese suspensies

Kultuur nr. 10 is vir die bepaling gebruik. Vyf en twintig cm<sup>3</sup> Oxoid voedingsop nr. 2 is vooraf in 'n 50 cm<sup>3</sup> Erlen Meyer-fles tot 37°C verhit en daarna met 10 cm<sup>3</sup> van 'n 24 uur oue voedingsop skudkultuur geïnokuleer. Die flessie voedingsop is tydens inkubasie by 37°C met 'n skudapparaat geskud. Inokulasietyd aangetoon as 0 (Zero) tyd. Tot aan die einde van die laat-logaritmiëse groeifase, en met tussenposes van een uur is volumes onttrek waarvan in elke geval die persentasie ligdeurlating (%T) en ligabsorbansie (%A) bepaal is. Laasgenoemde is dan met behulp van die nege module Welch Chem Anal System ingeskakel as 'n filter kolorimeter met 'n golflengte instelling van 525nm bepaal. Vir elke

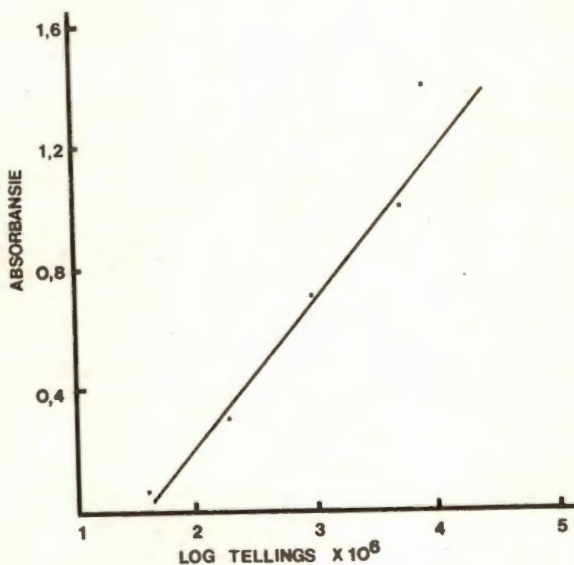
onttrekking is verder 'n reeks verdunnings, naamlik  $10^{-2}$  tot  $10^{-8}$  gemaak. Van elk hiervan is  $0,5 \text{ cm}^3$  in  $4,5 \text{ cm}^3$  gesmelte voedingsagar, wat tot  $50^{\circ}\text{C}$  afgekoel is, geïnokuleer en as 'n rolbuis gestol. Die rolbuis is vir 24 uur by  $37^{\circ}\text{C}$  geïnkubeer. Van die eerste drie onttrekkings is slegs die  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  en  $10^{-4}$  verdunnings gebruik en van die daaropvolgende drie onttrekkings die  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  en  $10^{-6}$  verdunnings. Van die verdere onttrekkings is die  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  en  $10^{-8}$  verdunnings gebruik. Na 'n inkubasietydperk van 24 uur is die kolonies in elke rolbuis kultuur getel.

In die gevalle van elk van die verskillende verdunnings vir elke onttrekking is die aantal bakterieë omgerek na wat dit in 'n  $10^{-6}$  verdunning sou wees. Vervolgens is die gemiddelde aantal bakterieë in 'n verdunning van  $10^{-6}$  vir elke opeenvolgende onttrekking bereken, soos aangetoon in Tabel I.

Tabel I: Resultate van tellings van bakterieë en kolorimetrisiese bepalings

Tyd (uur)	Gemiddelde tellings vir $10^{-6}$ verdunning	%T	%A
10	36	67,0	0,172
11	190	47,5	0,32
12	880	17,4	0,76
1	5 424	8,5	1,08
2	5 800	4,0	1,4
3	6 900	3,6	1,42

Die logs. van bogenoemde is grafies uiteengesit teen=oor persentasie ligabsorbansie (figuur 1). (Lichstein en Oginsky, 1965).



Figuur 1: Grafiese uiteensetting van % absorbansie teenoor logs. van bakteriese tellings

#### 2.2.1.2 Vorbereiding van bakteriese suspensies vir flagellêre (H) agglutinasie

Die voorbereiding is gedoen volgens die metodes beskryf en gebruik deur van Eeden (1963, p. 12).

### 2.2.2 Agglutinasietoetse

Om te bepaal of kulture in hierdie ondersoek volgens van Eeden (1963) gegroepeer kon word, is agglutinasietoetse tussen H suspensies daarvan en al die beskikbare H-antiserera van van Eeden (1963), soos getabelleer in Tabel II uitgevoer. Die agglutinasietoetse is gedoen volgens die metodes beskryf deur van Eeden (1963, p.13).

Tabel II: Resultate van reaksies tussen eie H-kulture en H-antiserera van van Eeden (1963).

		<u>H-ANTISERA VAN VAN EEDEN (1963)</u>														
H-suspensies van eie kulture		1	2	3	5	6	7	8	16	28	36	42	52	55	58	K
		1	-	-	-	-	-	tr	-	+	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	tr	-	tr	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	+	-	-	tr	-	tr	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	tr	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	tr	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	tr	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
10	-	-	-	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	tr	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

tr - slegs spore van agglutinasie

### 2.3 Vorbereiding van antiserera

Vyf kulture wat op grond van die voorlopige agglutinasietoetse verskillend is, en sommige van die serologiese groepe van van Eeden (1963) verteenwoordig, is vir die bereiding van die nuwe antiserera in konyne gebruik.

### 2.3.1 Voorbereiding van suspensies vir immunisering van konyne

Voorbereiding van H suspensies is volgens die metodes beskryf deur van Eeden (1963, p.16) gedoen, met die uitsondering van seldigheidsbepalings wat volgens die kolorimetriese metode gedoen is.

### 2.3.2 Immunisering van die konyne

Vir produksie van immune sera is een konyne vir elke suspensie gebruik. Elf inspuittings is met tussenposes van 2 tot 3 dae toegedien met dosisse wat geleidelik van 0,1 cm<sup>3</sup> tot 0,7 cm<sup>3</sup> verhoog is. Die eerste vyf inspuittings is onderhuids toegedien en die oorblywende ses binne-aars in die ore (van Eeden, 1963, p.17). Die inspuittings word in die linkeroor gedoen (Williams & Chase, 1967, p. 263).

### 2.3.3 Versameling van die serum

Die konyne is sewe en weer tien dae na die laaste inspuiting gebloei (van Eeden, 1963, p.17) vanuit die regteroor (Williams & Chase, 1967, p. 263) en 40 cm<sup>3</sup> bloed is per keer getrek. Kos is aan die einde van die sesde en negende dag weerhou om die vorming van serumlipiede, wat veroorsaak dat die serum melkerig is, te verminder (Williams & Chase, 1967, p. 264).

Die buise met bloed is vir een uur by 37°C gehou en daarna oornag in 'n yskas geplaas vir klontsametrekking (Williams & Chase, 1967, p. 242).

Bloedselle is uit die serum verwyder deur middel van sentrifugasie teen 1 500 r/min. vir 20 minute (Williams & Chase, 1967, p. 243). Daarna is die serum gesteriliseer deur filtrasie deur die gebruik van steriele 25 mm deursnee Swinnex filters met steriele 0,22  $\mu\text{m}$  membrane (Williams & Chase, 1967, p. 247, 251). Vir preserving is Merthiolaattot 'n finale konsentrasie van 0,01% by die serum gevoeg (van Eeden, 1963; Williams & Chase, 1967, p. 245). Die serum is in steriele skroefpropbotteltjies bewaar. Vir die voorkoming van  $\text{CO}_2$  en  $\text{H}_2\text{S}$  indringing is die styf opgeskroefde proppe met 70% alkohol afgevee en met 6 x 6 cm stukkie Parafilm word die proppe bedek wat styf teen die bottelnekke vasgedruk word om die proppe te verseël (Williams & Chase, 1967, p. 252). Die serum is by  $-16^\circ\text{C}$  tot  $-20^\circ\text{C}$  bewaar (van Eeden, 1963; Williams & Chase, 1967, p. 246). Wanneer die serum hanteer is, is steriele pipette gebruik.

#### 2.4 Agglutinasie met varsbereide antisera

Die agglutinasietoetse is uitgevoer soos reeds beskryf, met die gebruik van die varsbereide antisera teen die vyf gekose rasse teenoor die elf geïsoleerde kulture.

#### 2.5 Elektronmikroskopie

Die mikroskoop wat in die ondersoek gebruik is, is 'n Siemens Elmiskop 101. Dubbel kondensors is tesame met 400 $\mu\text{m}$  en 50 $\mu\text{m}$  aperature gebruik.

Die vyf kulture waarteen antisera berei is plus drie van die oorblywende ses kulture is vir mikroskopiese ondersoek gebruik. Die organismes is op oxoid voedingsop Nr. 2 plus 2% agar gekweek deur inkubasie vir 48 uur.

#### 2.5.1 Voorbereiding van die kulture vir mikroskopiese ondersoek

Verskeie metodes van voorbereiding is vir elektronmikroskopiese gebruik naamlik:

1. Fiksering met 1,0 tot 2,5% massa/volume Glutaaraldehyd deur die byvoeging van 25% Glutaaraldehyd by die kultuursuspensie. Die fikserings tyd was van 0,5 tot 24 uur. Die organismes is op die roostertjies gekleur met uranielasetaat (Lawn, Ørskov & Ørskov, 1977, p.111).
2. Kleuring van die organismes op die roostertjie met 2% uranielasetaat (Schmitt et al, 1974, p. 844).
3. Kleuring van die organismes op die roostertjie met 0,5 tot 1% uranielasetaat (McCoy et al, 1975, p. 309).

Die kulture is op voedingsagarplate geïnkuleer en vir 48 uur by 37°C geïnkubeer vir maksimale ontwikkeling van die oppervlaktestruktuur van die flagella (McCoy et al, 1975, p. 307). 'n Druppel water is met 'n spuit deur 'n Swinnex membraanfilterhouer met 'n 0,45µm membraan op die bakteriese groei gedrup.



Die plaat is vir 'n paar minute gelaat sodat die bakterieë sonder steuring in die druppel kon suspender. Van die suspensie is met die dowwe kant van 'n formvarbedekte en koolstofbedampte koperroostertjie met 'n maasgrootte van 400 opgetel. Die oortollige deel van die suspensie is met 'n filtreerpapierskyfie afgesuigen die roostertjie is onmiddellik met gefiltreerde water afgespoel om enige vreemde stowwe wat moontlik met die uranielasetaat kan reageer te verwyder. Die water is met 'n filtreerpapierskyfie verwyder en 'n druppel 1% uranielasetaat (pH 4,) (McCoy et al, 1975, p. 309) is op die roostertjie gedrup. Die uranielasetaat is so gou as moontlik met filtreerpapier afgesuig en die roostertjie gelaat om droog te word.

#### 2.5.2 Voorbereiding van roostertjies

Die roostertjie wat gebruik is, is 400 maas, 3 mm deursnee koperroostertjies. (400 maas is 400 gaatjies van ongeveer 63 x 63µm per liniêre duim). Eerstens is die roostertjie in 1% HCl afgespoel om enige vetterigheid op die oppervlaktes te verwyder. Die bedekking van die roostertjies met formvar is volgens die metode van Revell & Agar (Kay, 1967, p. 64) gedoen. Die koolstofbedamping is met 'n Balzer mikro BA 3 bedampingseenheid gedoen soos beskryf deur Kay (1967, p. 136).

Die tegniese probleme wat met die verkryging van duidelike resultate ten opsigte van die oppervlaktestrukture van die bakteriese flagella ondervind is word in die resultate bespreek.

RESULTATE

3.1 Kultuureienskappe en biochemiese reaksies

Al die organismes het goed gegroei op Cetavlonagar, Asetamiedagar by 37°C en op voedingsagar by 37°C en 41°C (Haynes, WC, 1951). Almal het pigment geproduseer in voedingsagar en die kleur het van lig-groen, blou-groen, bruin en groen-bruin gewissel. Al die kulture het gelatien vervloei en nie glukose, laktose, sukrose of mannitol gefermenteer nie. Almal het lakmoesmelk gepeptoniseer, nitraat gereduseer en in Koser sitraatmedium gegroei. Geen swawelwaterstof (H<sub>2</sub>S) is geproduseer nie en die Voges-Proskauer-, Metielrooi- en indooltoetse was negatief. Al die kulture was beweeglik en monotriëg polêr geflagelleerd.

3.2 Agglutinasietoetse met antisera wat voorberei is deur van Eeden (1963)

3.2.1 Agglutinasietoetse

Van die 'H' antisera voorberei en gebruik deur van Eeden (1963), was elf, verteenwoordigend van die eerste 6 serologiese groepe, beskikbaar. Hulle was: Groep I-antisera 28 en 52; Groep II-antisera 8 en 42; Groep III-antisera 55; Groep IV-antisera 5 en 16; Groep V-antisera 1 en 6; Groep VI-antisera 36 en 58. Antisera 2, 3 en 7 was nie gegroep nie.

Die agglutinasiereaksies was tipies flagellêr. Soos uit tabel III blyk het sekere rasse beduidende reaksies met die antisera van bepaalde groepe gegee naamlik 2 en 3 met groep II, 1, 4, 5, 6 en 11 met groep IV en 9 met groep V hoewel laasgenoemde ook sterk met antisera van ander groepe gereageer het. Dit gee 'n aanduiding dat bogenoemde rasse, moontlik met die uitsondering van 9 wel volgens die serologiese groepering van van Eeden (1963) onderskei kan word.

Tabel III: Resultate van H-agglutinasiereaksies tussen H-suspensies van eie kulture teenoor antisera van van Eeden (1963)

Gr.		2	3	11	1	4	5	6	9	7	8	10	
Groepe van van Eeden (1963)	I	{ 28											
		{ 52											
	II	{ 8	+	+						+			
		{ 42	+	+									
	III	55											
	IV	{ 5	tr	tr									
		{ 10			+	+	+	+	+				
	V	{ 1								+			
		{ 6								+			
	VI	{ 36											
		{ 58								+			
	Ongegroeper	{ 2								+			
{ 3									+				
{ 7		tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	-	tr	tr	tr	

tr - slegs spore van agglutinasie

Uit hierdie resultate kon sewe van die elf rasse in drie van van Eeden (1963) se ses groepe ingedeel word.

Drie kon nie groepeer word nie, soos aangetoon in tabel IV.

Tabel IV: Indeling van eie rasse in groepe van van Eeden (1963)

Gr. I	Gr. II	Gr. III	Gr. IV	Gr. V	Gr. IV	Ongegroepeer
-	2	-	1	9	-	7
	3		4			8
			5			10
			6			
			11			

Die agglutinasiereaksies van die varsbereide "H" antisera teenoor die elf geïsoleerde kulture word in tabel V aangetoon.

Tabel V: Agglutinasiereaksies van die varsbereide H-antisera teenoor eie H-suspensies

VARSBEREIDE "H" ANTISERA

	2	6	8	9	10	K
1	-	-	-	-	-	-
2	tr	-	-	+	-	-
3	-	+	+	-	tr	-
4	-	+	tr	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	+	+	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	+	+	-	+	-
9	-	-	-	+	-	-
10	-	+	+	-	tr	-
11	-	+	+	-	tr	-

11 H-Suspensies

soos uit tabel V blyk kon daar tussen twee groepe onderskei word naamlik kulture 2 en 9 in die een en 3, 6, 8, 10 en 11 in die ander groep.

### 3.3 Elektronmikroskopie

Al die resultate is verkry uit die ondersoek van preparate van intakte bakterieë. Geen poging is aangewend om die flagella van die bakteriese selle te skei nie. Meeste van die preparate het dus die flagella nog aan die bakterieë getoon. Van al die kultuurvoorbereidingsmetodes het die van McCoy et al (1975, p. 309) die beste resultate gelever. 'n Lae konsentrasie naamlik 0,5%, uranienlasetaat is gebruik en is so gou as moontlik na die preparaat gekleur is verwyder. In die gevalle waar hoër konsentrasies uranienlasetaat gebruik is, het die flagella geswel en hul fynstruktuur verloor. Selfs in die geval van goeie resultate was daar slegs sekere dele van die flagella wat bevredigende resultate gelever het.

Onder ideale toestande van negatiewe kontraskleuring, het die flagella in 'n suiwerkultuur van *P. aeruginosa* van 'n spesifieke serotipe almal dieselfde oppervlakte struktuur vertoon. Soos uit tabel VI blyk kon die serotipes wat geïsoleer is volgens die fynstruktuur van hul flagella, in twee hoofgroepe ingedeel word.

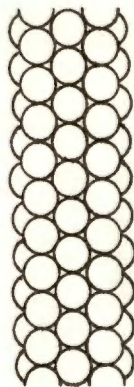
**Tabel VI:** Indeling van die geïsoleerde serotipes A tot H met hulle ooreenstemmende kultuur nommer in die twee fyn struktuur groepe

	Geïsoleerde serotipes	serotipes nr. uit agglutinasie reaksies
Lengteverlopende lynstruktuur	A	2
	D	9
Heliksstruktuur	B	6
	C	8
	E	10
	F	4
	G	5
	H	11

Figuur 2 toon 'n skematiese voorstelling van die twee hooftipes oppervlakte struktuur van die serotipes wat bestudeer is.



A



B

Figuur 2:      Voorstelling van die twee hooftypes  
fynstruktuur van die flagella.

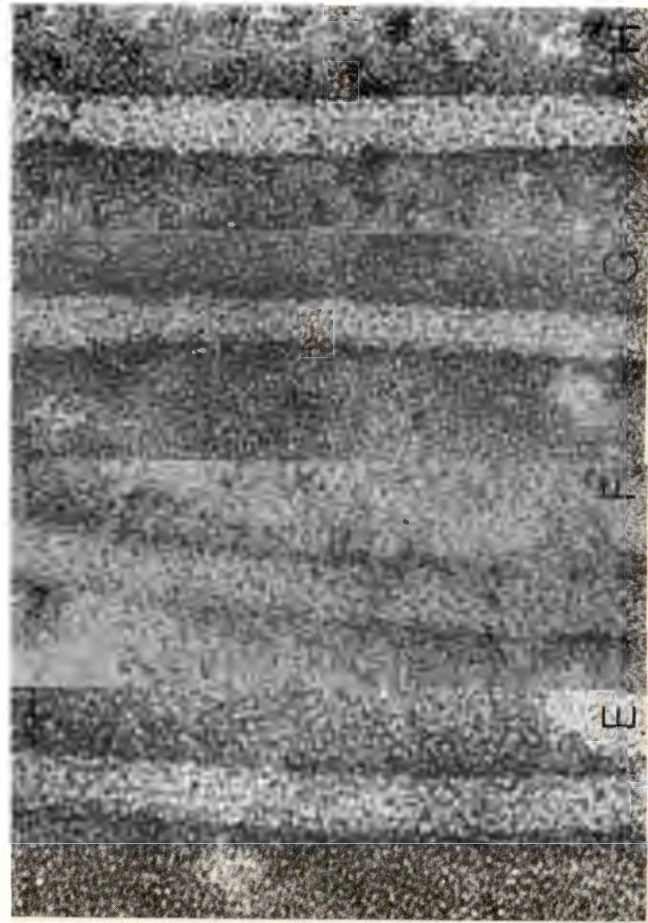
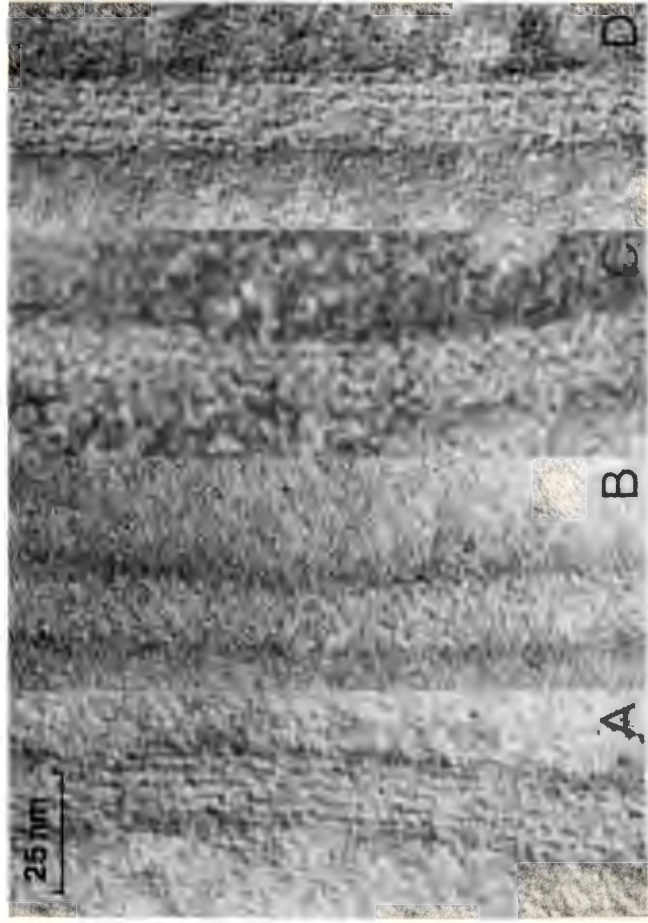
A:    Lengteverlopende lynstruktuur

B:    Heliksstruktuur

PLAAT I

Plaat I illustreer die flagellêre morfologie van agt  
H<sup>-</sup>serotipes.



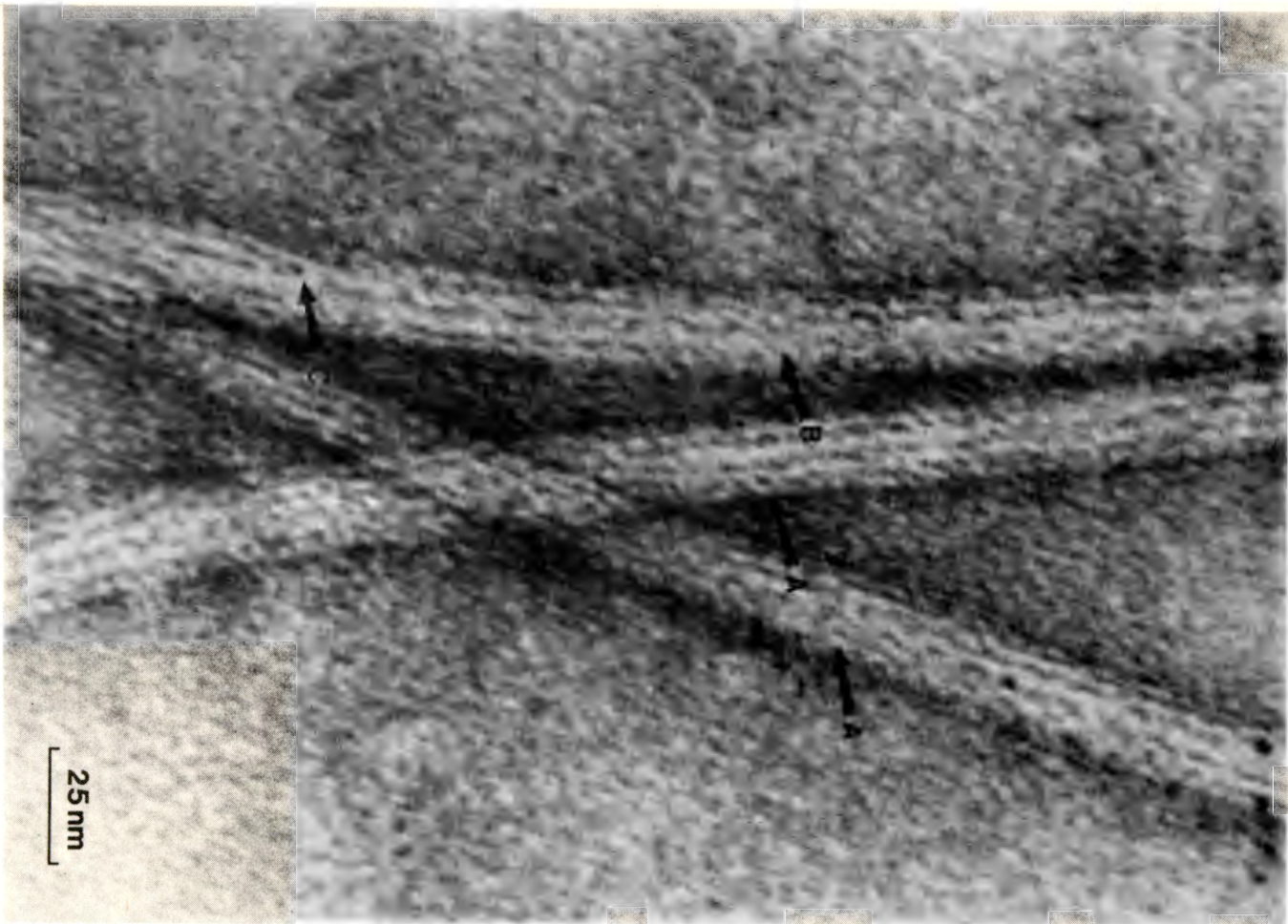


### 3.3.1 Die lengteverlopende lynstruktuur (Figuur 2 A)

Hierdie stuktuur word sterk gekenmerk deur duidelike lengteverlopende lyne, die afwesigheid van skuinslyne en die feit dat die klein subeenhede of balle-tjies nie van mekaar onderskei kan word nie, soos op plaat I A en D. Dit blyk ook dat die lyne nie afwyk van 'n koers parallel met die lengte-as van die flagella nie, selfs in gevalle waar die flagella gekronkeld is nie. Die aantal en dikte van die lyne word bepaal deur die serotipe. Alhoewel die lengteverlopende lyne in die flagella struktuurloos voorkom en geen subeenhede vertoon nie, is hulle nie struktuurloos nie. Soms vertoon die lyne tekens van herhaling in die struktuur en gee die indruk van twee gedraaide stringe, soos op plaat II (met pyltjie A) aangedui. Daar is ook waargeneem dat vir kort gedeeltes van die flagella,  $\pm 20$  nm die lyne heeltemal verdwyn soos plaat II (pyltjie B) aantoon. By sommige van die flagella kom dit voor of die lyne aan weerskante van die verdwyning 'n lyn ten opsigte van mekaar skuif, plaatjie II (pyltjie C). Die ligte lyne gaan ná die dowwe gedeelte oor in die donker deel tussen twee ligte lyne. Dit kan duidelik waargeneem word deur die plaat te kantel en met die lengte-as van die flagella langs oor die versteurde deel te kyk. Lowy & Hanson (1965, p. 300) het dieselfde waarneming gedoen.

PLAAT II

Die fynstruktuur van die lengteverlopende lynstruktuur.



### 3.3.2 Die heliksstruktuur (Figuur 2 B)

Flagella wat hierdie struktuur vertoon blyk saamgestel te wees uit subeenhede met naastenby 'n sferiese voorkoms. Hierdie subeenhede is in rye gerangskik alternerend in aangrensende rye. So word skuinslyne na weerskante gevorm (figuur 2(B)).

Met die eerste oogopslag lyk dit nie asof die skuinslyne 'n heliks vorm nie, maar eerder 'n dubbele gekruiste struktuur. Wanneer twee flagella mekaar kruis, Pl. II, is albei se fynstruktuur duidelik sigbaar en is dit moeilik om te bepaal watter een lê bo-oor die ander een. Die afleiding kan gemaak word dat die subeenhede in 'n heliks gerangskik is omdat die boonste skuinslyne nie van die onderste skuinslyne onderskei kan word nie (Pl. IC).

Deur die plate te kantel en langs die lengte van die flagella te kyk, kan die lyne wat deur die afwisselende subeenhede gevorm word makliker waargeneem word. Hierdie lyne loop ook parallel met die lengte-as van die flagella. Die aantal en dikte van die lyne verskil by rasse wat tot verskillende serotipes behoort. Hoe breër die lyne is, hoe groter is die hoek wat die skuinslyne met die lengte-as van die flagella maak. In die geval van al die serotipes wat bestudeer is en hierdie flagellastruktuur vertoon, is die hoek tussen die skuinslyne en die lengte-as van die flagella groter as  $45^{\circ}$ . By die serotipes wat die heliksstruktuur vertoon, Pl. I B, C en E is 'n verskil in die grootte van die subeenhede sowel as die

heliksgradiënt waarneembaar. In die geval van die ander drie serotipes, Pl. I F, G en H, waarvan die serologiese reaksies baie min van B, C en E verskil, is die subeenheid grootte en die heliksgradiënt moeilik onderskeibaar. Indien die plate gekantel word is die lengteverlopende lyne wel sigbaar.

### 3.3.3 Die deursnee-afmetings van die flagella

In Tabel VII word die deursnee afmetings van die flagella van die agt serotipes wat bestudeer is aangetoon.

Tabel VII Deursnee afmetings van die flagelle van die agt serotipes wat bestudeer is

Flagella struktuur	Morfotipe	Serotipe nr.	Deursnee in nm
(A)	A	2	$17,0 \pm 0,5$ nm
	D	9	$17,0 \pm 0,5$
(B)	B	6	$16,6 \pm 1$ nm
	C	8	$17,0 \pm 1$
	E	10	$15,6 \pm 1$
	F	4	$17,0 \pm 1$
	G	5	$14,0 \pm 1$
	H	11	$14,6 \pm 1$

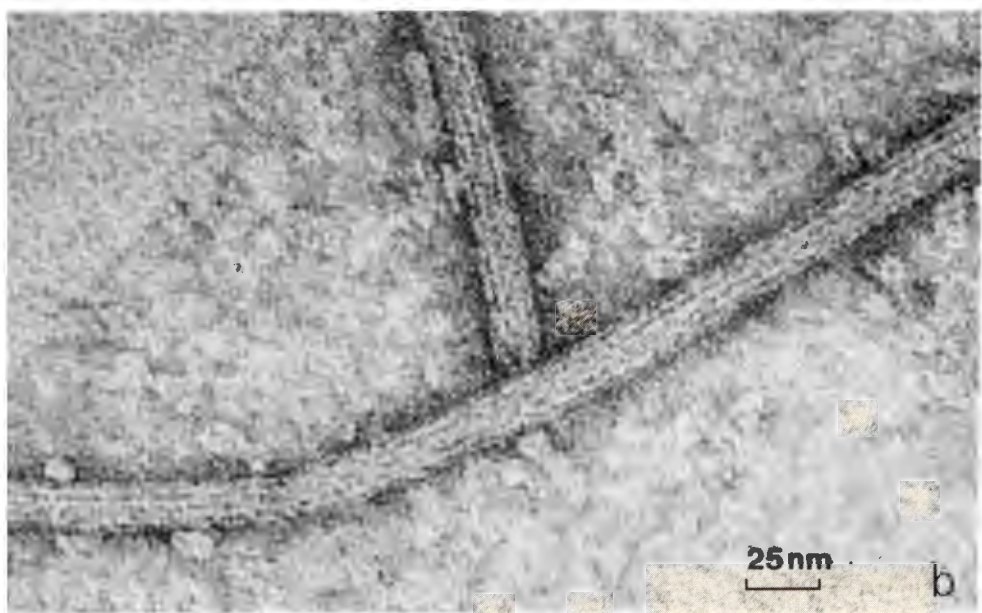
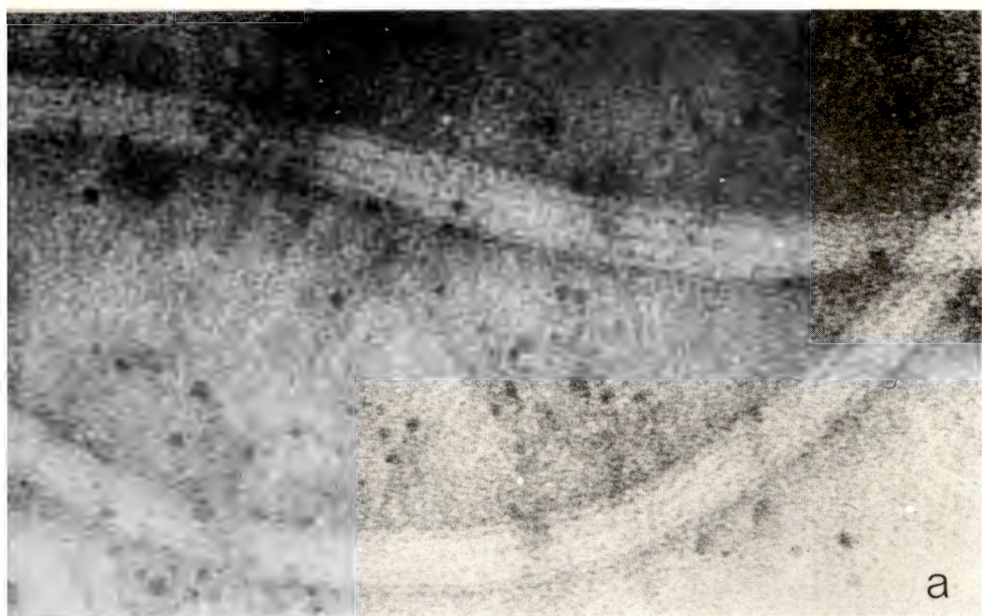
Die metings is gedoen deur die gemiddeld te neem van drie metings langs die lengte van die flagella. McCoy et al. (1975 , p. 309).

Vir die bestudering van die flagella is van kulture wat vir 48 uur geïnkubeer is gebruik gemaak omdat die

fynstruktuur na 48 uur die duidelikste ontwikkel is  
(McCoy et al., 1975, p. 313).

PLAAT III (a) en (b)

Struktuurverskil tussen flagellaontwikkeling na 24 uur  
(a) en 48 uur (b) inkubasie





Plaat III (a) en (b) wat die resultate van negatiewe kleuring weerspieël, toon die struktuurverskil aan tussen ontwikkeling na 24 uur inkubasie, Pl. III (a) en 48 uur inkubasie, Pl. III (b).

## HOOFSTUK 4

### BESPREKING

#### 4.1 Klassifikasie

Die huidige klassifikasie van *Pseudomonas aeruginosa* volgens Bergey's Manual, Buchanan et al., (1974, p. xxiii), is soos volg:

Ryk: Procaryotae

Afdeling II: Bacteria

Sub-afdeling: Gram negatiewe, aërobe bacilli en cocci.

Familie I: Pseudomonadaceae

Genus I: *Pseudomonas*

Spesie: *aeruginosa*

Die familie, Pseudomonadaceae, waaraan dit behoort, is een van die vyf families van die sub-afdeling Gram negatiewe, aërobe bacilli en cocci. Hierdie familie word onderskei van die ander deur die volgende kenmerke: die metabolisme van die selle is respiratories, nooit fementatief nie en fikseer nie stikstof nie. Hulle is streng aëroob, en is instaat om ander koolstofverbindinge, behalwe enkel-koolstofverbindinge, as enigste koolstofbron te gebruik (Buchanan et al., 1974, p. 217). Volgens Buchanan et al. (1974, p. xxiv), word die familie in vier genera onderverdeel.

Spesies wat aan hierdie genus behoort, word gewoonlik in grond, vars water en in marineomgewing gevind waar hulle belangrikste funksie die afbreek van organiese materiaal is. Sommige spesies is plantpatogene, minstens een is 'n soogdierparasiet en ander is soms dierpatogene waarvan *P. aeruginosa* een is (Buchanan et al., 1974, p. 217). *P. aeruginosa* is een van 235 erkende spesies in hierdie genus waarvan 20 wel onder die genus *Pseudomonas* ingedeel is, maar waarvan sommige van hulle eienskappe nie met dié van die genus ooreenstem nie. Verder is daar ook nog 30 ander spesies wat onder ander genera ingedeel is, maar wat volgens huidige beskrywing met *Pseudomonas* ooreenkom (Buchanan et al., 1974, p. 237-242).

Die volgende is die kenmerkende eienskappe wat deur *Ps. aeruginosa* vertoon word:

Bacilli, 0,5 - 0,8 x 1,5 - 3,0  $\mu\text{m}$ , kom enkel, in pare of in kort kettings voor. Hulle is beweeglik met 'n polêre monotriege flagella. Verspreidende fluoressenseien en 'n oplosbare fenazienpigment, piosianien word deur meeste rasse in geskikte media geproduseer. Rasse wat geen pigment produseer nie is baie raar. Sommige rasse vorm ook 'n donker-rooi pigment. Slym word nie gevorm in media wat sukrose bevat nie. Hulle is verplig aëroob, behalwe in nitraatbevattende media. Die optimale groeitemperatuur is 37°C. Groei vind plaas by 41°C, maar nie by 4°C nie. Hulle kan uit grond en water, veral uit verrykte kulture van denitrifiserende bakterieë, wond-etter, brandwond- en

urinekanaal infeksies geïsoleer word (Buchanan et al., 1974, p. 221).

## 4.2 Serologie

### 4.2.1 Algemeen

Aangesien *P. aeruginosa* antigeniese veranderinge kan ondergaan, veral deur herhaalde sub-kultivering, is voorsorg getref ter voorkoming hiervan deur die kulture in 'n droë toestand te bewaar (van Eeden, 1963, p.123). Sub-kulture is dus slegs vanaf die gedroogde suspensieskyfies gekweek en is vir die eksperimente gebruik.

Met die bestudering van die flagella van die organisme, moet daar 'n onderskeid getref word tussen die flagellêre (H) en die somatiese (O) antigene. Omdat eersgenoemde termolabiel en laasgenoemde termostabiel is, is dit nie moontlik om suiwer H-antigene te berei deur middel van hitte behandeling nie. Selfs deur die flagella te skei deur middel van skud en differensiële sentrifugering, is volgens Kabat en Mayer (1961) soos aangehaal deur van Eeden (1963), p. 123) gevind dat H- sowel as O-teenliggame gevorm word as 'n konyn inspuut word.

Volgens Mayr & Harting, aangehaal deur van Eeden, (1963 p. 124), word die heel organismes gedood met formalien, die H-antigene fikseer en die O-antigene oënskynlik afgeskerm sodat sodanige suspensies vir flagellêre of H-agglutinasie gebruik kan word. Suspensies vir somatiese of O-agglutinasie is voorberei deur alkohol

behandeling wat die H-antigene vernietig.

#### 4.2.2 Agglutinasietoetse

Vanuit die resultate van die agglutinasietoetse met die antisera van van Eeden (1963), blyk dit dat daar wel spesifieke reaksies was met antisera van sekere van sy groepe, maar dat daar ook heelwat kruisreaksies was, en dit moeilik was om die rasse te groepeer. Dit kom voor asof die antigeniese samestelling van die flagella van die verskillende rasse ooreenstem en dit die oorsaak van die baie kruisreaksies is. Ten spyte hiervan kon van die rasse wel ingedeel word in sommige van die groepe volgens van Eeden (1963).

#### 4.3 Elektronmikroskopie

##### 4.3.1 Vergelyking met vorige elektronmikroskopiese resultate

Dit is verbasend om te vind dat daar so 'n groot morfologiese variasie tussen die flagella van verskillende serotipes van *P. aeruginosa* is. Die verskille is so groot soos die wat deur Smith & Kofler (1971) by verskillende bakteriese families gevind is (Lawn et al., 1977, p. 118).

Selfs Lawn et al (1977) het met hul eie studies ses verskillende flagella morfologiese tipes by H-serotipes van *Escherichia coli* gevind (Lawn et al., 1977, p.111).

Schmitt, Rasha & Mayer, (1974) p. 844, het gevind dat *P. rhodos* twee soorte flagellastrukture het naamlik een met 'n helikstipe skede en die ander met 'n lyn=struktuur soortgelyk aan die wat in hierdie ondersoek waargeneem is. Volgens Lowy & Hanson, (1965, p. 304), het Kerridge et al, met sy studies van die flagella van *Salmonella* gevind dat hulle hol is. Glanet et al., Claus & Roth het weer geen aanduiding van 'n kanaal gevind in flagella van *Acetobacter* nie terwyl Rogers & Filshie tot dieselfde gevolgtrekkings ten opsigte van *Proteus* flagella gekom het. Met al die preparate wat in die huidige ondersoek voorberei en bestudeer is, was daar geen aanduiding van 'n kanaal in die flagella nie.

Indien daar wel 'n kanaal was sou dit gevul gewees het met kleurstof en dus 'n duidelike donker gekleurde lyn in die flagella gevorm het soos in die geval van Tabak Mosaiek Virus en die stert kanaal van bakteriofage.

Waarnemings deur de Robertis & Fraudii met *Bacillus brevis* en van Iterson; Glauet et al., en Folett & Gordon met studies van *Vibrio metchinovii*, het getoon dat die flagella skedes rondom hulle het (Lowy & Hanson, 1965, p. 305). Daar is gevind dat skedes moontlik voorkom by bakterieë met 'n groot helikstruktuur soos by *P. rhodos* en duidelik waargeneem kan word deur middel van metaalbedamping (Lowy & Hanson, 1965, p. 305). Volgens die resultate is daar geen skedes in die rasse van *P. aeruginosa* wat ondersoek is, teenwoordig nie.

Soos aangetoon in Plaat I B en E, is daar geen aanduidings van skedes nie aangesien die kleurstof uniform tot teen die flagella lê sonder 'n onderbreking van 'n lynstruktuur. Die rande van die heliksstruktuur is ook duidelik sigbaar.

In die geval van die flagella met die lengteverlopende lynstruktuur is daar ook geen aanduidings van skedes nie omdat dit duidelik sigbaar sou wees as twee eweredige lyne aan weerskante van die flagella.

Met die gewaste flagellapreparate het Czajkowski et al., volgens McCoy et al. (1975), p. 313, gevind dat die lengteverlopende lynpatroon, soos in Pl. I A en D, geassosieer word met die vergroting in filament deursnee en aan filamentafbreking toegeskryf kan word. Bevindings van McCoy et al. (1975, p. 313), ongewaste preparate *B. subtilis* en *C. fetus*, asook eie bevindings, stem nie met Czajkowski ooreen nie. Soos in Pl. III (a) en Pl. III (b) getoon word, kan die struktuur-ontwikkeling na 24 uur en 48 uur inkubasie duidelik gesien word. Die verlies in fynstruktuur is gevind deur die organismes te was voor mounting van die roostertjie (McCoy et al., 1975, p. 313).

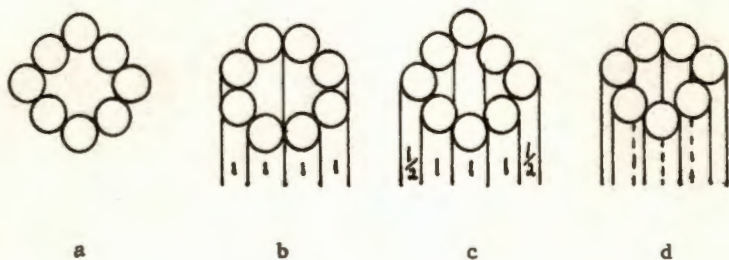
#### 4.3.2 Modelle van die flagellêre strukture

##### 4.3.2.1 Die aantal lengteverlopende lyne of rye van subeenhede

Die aantal lengteverlopende rye eenhede, wat waargeneem is in die flagella van *P. aeruginosa* met die

lengteverlopende lynstruktuur is, vyf. Van hierdie vyf is drie in volle aansig en twee in sy aansig. As aangeneem word dat slegs die rye op die boonste oppervlak sigbaar is, kan afgelei word dat die aantal filamente van die flagella agt kan wees soos skemas voorgestel in figuur 3 (a). In die geval van die flagella wat die heliksstruktuur vertoon, is daar of vier of vyf rye wat deur die subeenhede gevorm word. Dus met 'n negatief gekleurde preparaat sal, of vier rye (almal in naastenby volaansig) figuur 3 (b), of vyf rye (drie in volaansig en twee in halfaansig) figuur 3 (c) sigbaar wees.

In figuur 3 (b) en (c) is 'n voorstelling van die rangskikking van die filamente van die flagella in dwarsdeursnee gesien



1 = volaansig  
 $\frac{1}{2}$  = halfaansig

**Figuur 3:** Voorstelling van die rangskikking van die filamente van die flagella in dwarsdeursnee gesien



In bogenoemde bespreking is aangeneem dat slegs die lengteverlopende lyne of subeenhede aan die bokant van die flagella sigbaar is. Vroeër is egter aangetoon dat die agterkant van die heliks ook by die struktuur waarneem kan word.

Die aantal veronderstelde lyne, volgens figuur 3, behoort dus twee maal te veel wees omdat dit beteken dat die lyne van die onderste vlak ook sigbaar was. In geval van sekere van die helikstruktuur flagella, vertoon die struktuur baie duidelik en is daar 'n konstante patroon in die subeenheid rangskikking (Ple. B en E). Die verklaring kan wees dat die strukture van die boonste aansig met dié van die onderste vlak ooreenstem. Indien dit die geval is sal die aantal filamente 'n ewe getal wees (figuur 3 (b)). In die geval van Ple. I F en G kan die onduidelike beeld moontlik toegeskryf word aan die feit dat die lyne 'n onewe getal is en die boonste en onderste vlakke nie ooreenstem nie soos geïllustreer in figuur 3 (d).

#### 4.3.2.2 Die rangskikking van die subeenhede

Die rangskikking van die subeenhede kan voorgestel word soos in figuur 2. Die subeenhede van die heliksstruktuur is ongeveer 2 nm in deursnee, en so gerangskik dat die subeenhede in lengteverlopende lyne en alternerend met die aangrensende rye en in spiraallyne aanmekaar raak. Die aantal eenhede per draai is dieselfde as die aantal lengteverlopende lyne. Die helikshelling is in al die gevalle groter as  $45^{\circ}$ .

Heelwat van hierdie bevindings stem met die van Lowy & Hanson (1975) en Lawn et al. (1977) ooreen.

#### 4.3.3 Gevolgtrekking

Met hierdie studie van flagella van verskillende H-serotipes van *P. aeruginosa* kon twee tipes flagellastrukture, (A en B) waargeneem word. Uit die resultate kan aangeneem word dat die flagellastruktuur van 'n spesifieke serotipe konstant is en dat die flagellastruktuur van die verskillende serotipes kan verskil. By al die serotipes wat bestudeer is, is slegs een van die twee tipes strukture waargeneem en nie albei in dieselfde flagella soos by *P. rhodos* nie. Lowy & Hanson (1965, p. 299). Die afleiding kan uit die resultate gemaak word dat daar 'n verband tussen die antigeniese samestelling en die oppervlaktestruktuur van die flagella van die verskillende 'H'-serotipes van *P. aeruginosa* bestaan. Hoe minder die antigeniese samestelling verskil, hoe kleiner is die struktuurverskille soos onderskeidelik in die lengteverlopende lyn- en heliksstrukture en hoe groter die antigeniese samestelling verskil hoe groter is die struktuurverskille soos die tussen die lengteverlopende lyn en heliksstrukture. Wat die betekenis is van die onderbrekings in die struktuur asook die halwelynverskuiwings in die lyne van die lengteverlopende en flagellastruktuur is moeilik verklaarbaar. Hierdie twee verskynsels is ook deur Lowy & Hanson (1965, p. 300) by *P. fluorescens* en *P. rhodos* opgemerk.

Dit kan moontlik artifakte wees deurdat die flagella beskadig word (die struktuuronderbrekings) en die draaiing van die flagella tydens roostertjiemontering. Terwyl dit ook deur ander navorsers waargeneem is, word vermoed dat dit aan misvorming tydens flagellavorming te wyte kan wees.

Verdere studie met die H-serotipes van die ander *Pseudomonas* spesies kan moontlik lig werp op die vraag of daar ook 'n verband tussen elke spesie se H-serotipes en sy flagellêre fynstruktuur asook tussen die van die verskillende spesies getref kan word.

Omdat flagella so vatbaar is vir suurbeskadiging, het die gebruik van uranielasetaat sy eie probleme. Nieteenstaande dit is redelik konstante strukture verkry en die herhaling daarvan in verskillende preparate van dieselfde H-serotipe is genoegsame aanduiding van die bruikbaarheid van hierdie kleuringstegniek. Dit is 'n vinnige metode om tussen verskillende isolate van *P. aeruginosa* te differensieer, maar nie met dieselfde presiesheid van serologiese metodes nie.

## BEDANKINGS

Hiermee wil ek my opregte dank uitspreek teenoor Prof. D. van Eeden, Professor in Mikrobiologie en hoof van die Departement Mikrobiologie (P.U. vir C.H.O.), onder wie se hulp en leiding hierdie studie uitgevoer is. Verder ook my dank aan die personeel van die Departement Mikrobiologie van die Potchefstroomse Universiteit vir C.H.O. vir hul hulp asook die fasiliteite wat tot my beskikking gestel is.

Laastens ook my diepe dank aan my vrou vir haar onderskraging en aanmoediging tydens die studie en voorbereiding van hierdie verhandeling.

## BRONNEVERWYSINGS

- BRADLEY, D.E. Stimulation of pilus formation in *Pseudomonas aeruginosa* RNA bacteriophage adsorption. Biochem. biophys. Res. Commun. 1972, 47, 1080.
- BUCHANAN, R.E. and GIBBONS, N.E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Baltimore. The Williams and Wilkins Co., 1974.
- CHRISTIE, R. Observations on the biochemical and serological characteristics of *Pseudomonas pyocyanea*. Aust. J. exp. Bio. med. Sci., 1948, 26, 425.
- CRUICKSHANK, R., DUGUID, J.P., MANNION, B.P., SWAIN, R.H.A. Medical Microbiology, 12th ed. II. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1975.
- HAYNES, W.C. *Pseudomonas aeruginosa* -its characterization and Identification. J. gen. Microbiol. 1951, 5, 939-950.
- HOMMA, J.Y., KIM, K.S., YAMADA, H., ITO, M., SHIONOYA, H. and KAWABE, Y. Serological typing of *Pseudomonas aeruginosa* and its cross-infection. Jap. J. exp. Med., 1970, 40, 347.
- KAY, D. Techniques for Electron Microscopy, 2nd ed. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1967.
- LÁNY, B. Serological properties of *Pseudomonas aeruginosa*. II Type-specific thermolabile (flagellar) antigens. Acta. microbiol. hung., 1970, 17, 35.

- LAWN, A.M., ØRSKOV, I. and ØRSKOV, F. Morphological Distinction Between Different H Serotypes of *Escherichia coli*. J. gen. Microbiol., 1977, 101, 111-119.
- LYSENKO, O. *Pseudomonas* - An attempt at a general classification. J. gen. Microbiol. 1961. 25, 379.
- LICHSTEIN, H.C. and OGINSKY, E.L. Experimental Microbial Physiology, San Francisco, U.S.A., W.H. Freeman and Co., 1965.
- LOWY, J. and HANSON, J. Electron Microscope Studies of Bacterial flagella, J. Mol. Biol., 1965, II, 293-313.
- MATSUI, N. A serological study of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Kansai. med. Sch., 1959, 11, 287.
- MCCOY, E.C., DOYLE, D., WILTBERGER, K. and WINTER, A.J. Flagellar Ultrastructure and Flagella-associated Antigens of *Camphylobacter fetus*. J. Bact., 1975, 122, 307-315.
- PITT, T.L. and BRADLEY, D.E. The antibody response to the flagella of *P. aeruginosa*. J. Med. Microbiol., 1975, 8, 97-106.
- SANDIFORD, B.R. Observations on *Pseudomonas pyocyanea*. J. Path. Bact., 1937, 44, 567.
- SCHMITT, R. RASKA, I. and MAYER, F. Plain and Complex Flagella of *P. rhodos*. Analysis of Fine Structure and Composition. J. Bact., 1974, 117, 845-857.

- STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J. and DOUDOROFF, M.  
The aerobic pseudomonads: a taxonomic study.  
J. gen. Microbiol. 1966, 43, 159.
- VAN DEN ENDE, M. (1952) Observations on the antigenic structure of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Hyg., 1952, 50, 405.
- VAN EEDEN, D. A study of the Antigens of *P. aeruginosa*. Ph. D. thesis, University of Cape Town, 1963.
- VERDER, E. and EVANS, J. A proposed antigenic schema for the identification of strains of *Pseudomonas aeruginosa*. J. infect. Dis., 1961, 109, 183.
- WETMORE, P.W. and GOCHENOUR, W.S., Jr. Comparative studies of the genus. *Malleomyces* and selected *Pseudomonas* species. I. Morphological and cultural characteristics. J. Bac., 1956, 72, 79.
- WILLIAMS, C.A. and CHASE, M.W. Methods in Immunology and Immunochemistry, 1, New York, Academic Press, 1967.