

Nº 35
ZEL.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

" OBTENCION DE AUTOLISINA PARA SU
POSIBLE USO COMO REACTIVO
DIAGNOSTICO "

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A I
MARGARITA CORDOVA CASANOVA

MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Indice

Introducción _____	1
Objetivos _____	4
Capítulo 1 _____	5
Generalidades <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
1.1 Historia y Taxonomía	
1.2 Morfología y fisiología	
1.3 Composición química y antigénica	
1.4 Productos celulares	
1.5 Patogenia	
1.6 Requerimientos nutricionales y medios de cultivo	
1.7 Identificación	
Capítulo 2 _____	15
Autolisina	
2.1 Composición química	
2.2 Extracción de la enzima autolítica de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
2.3 Caracterización y propiedades de la enzima	
Capítulo 3 _____	20
Parte experimental	
3.1 Material	
3.2 Metodología	

Capítulo 4 _____	28
Resultados	
4.1 Obtención y conservación de la cepa de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	
4.2 Ensayo de la autolisina neumocócica obtenida	
Capítulo 5 _____	53
Análisis de los resultados	
Capítulo 6 _____	59
Conclusiones	
Anexo _____	61
Capítulo 7 _____	64
Bibliografía	

Introducción

Las neumonías continúan siendo una de las principales causas de muerte, aunque la recuperación es factible con el inicio oportuno de la terapéutica, en México son responsables de más de 30,000 muertes anuales, de las cuales poco más del 50% ocurren en menores de un año⁽¹⁶⁾. La incidencia calculada de esta enfermedad varía extraordinariamente con la edad de la persona, con el hecho de que viva o no en condiciones de hacinamiento y con su ocupación. La fuente de contagio la constituyen principalmente las secreciones nasales y bucofaríngeas de personas infectadas. El mecanismo de transmisión es el contacto directo y el período de contagiosidad es muy variable dependiendo del agente etiológico causante de la neumonía. Los principales agentes etiológicos son:^(16,21)

1.- Virus

- Influenza
- Parainfluenza
- Adenovirus
- Rinovirus

2.- Bacterias

- Neumococo
- Estreptococo
- H. influenzae*
- Klebsiella pneumoniae*
- Estafilococo
- E. coli*
- Otras bacterias Gram negativas
- Mycoplasma pneumoniae*

3.- Otros

- Toxoplasma gondii*
- Histoplasma capsulatum*
- Coccidioides immitis*
- Pneumocystis carinii*

Existen otros agentes como los del sarampión, rubéola, tifoidea, etc., que son causantes de neumonía, pero en forma secundaria. Sin lugar a duda, entre los agentes bacterianos más frecuentes, están los cocos Gram positivos; sin embargo, los bacilos Gram negativos son de mucha importancia, particularmente en grupos de población de bajos niveles de vida, mal saneados y con desnutrición prevalente.⁽¹⁶⁾

Entre 40 a 70% de los adultos son portadores sanos de neumococos de uno o más tipos serológicos, aunque este estado no es permanente y el número de ellos es mayor en el invierno. La infección por neumococos es, en última instancia exógena, pero en la práctica puede considerarse endógena en la mayoría de los enfermos, ya que aunque el neumococo se encuentra muy a menudo en sujetos sanos, puede volverse patógeno bajo la influencia de diversos factores predisponentes, desencadenando la enfermedad; asimismo, existen ciertos tipos de neumococos que son responsables de síndromes graves de origen exógeno^(6,7).

Aunque la neumonía lobar es la infección neumocócica más importante en el hombre, los neumococos pueden atacar casi todos los órganos y tejidos bajo determinadas circunstancias. Las enfermedades neumocócicas primarias de las vías respiratorias superiores, incluyen la sinusitis y la otitis media, de ésta última existe una revisión⁽¹⁰⁾ en la cual se reporta que cerca del 70% las ocasionan bacterias que también se detectan en la faringe del paciente y *Streptococcus pneumoniae* se considera como el agente etiológico de mayor incidencia, causante de cerca del 85% de todos los casos. Las enfermedades progresivas de los senos mastoideos y respiratorios se extienden, en ocasiones, hacia el espacio subaracnoideo, causando meningitis neumocócica, la cual sigue siendo un problema grave por su elevada mortalidad. El neumococo constituye la segunda causa de meningitis bacteriana en adultos, además puede producir parotiditis, conjuntivitis, peritonitis y gran variedad de afecciones. Entre las complicaciones y secuelas de la neumonía por neumococos, se tienen las inflamaciones de pleura y pericardio. La neumococemia es muy frecuente; en una serie de casos a lo largo de 14 años, se encontró septicemia en 22.8% de los casos^(6,7,9).

La mortalidad por neumonía neumocócica no tratada es relativamente alta, y demuestra el gran poder patógeno de esta bacteria cuando llega a los pulmones.

Los factores que participan en la aparición o en la gravedad de las infecciones neumocócicas son: la edad, el sexo, la raza, el hecho de vivir en condiciones de

hacinamiento, la ocupación del individuo, el enfriamiento del cuerpo, la inhalación de anestésicos irritantes, las infecciones por virus gripal, la estasis pulmonar, el alcoholismo y la diabetes⁽⁶⁹⁾.

Objetivos

1

Determinar cuáles son las condiciones óptimas para la conservación de cepas puras de *Streptococcus pneumoniae*.

2

Determinar la capacidad y la especificidad de la autolisina neumocócica para usarse como reactivo diagnóstico.

Capítulo 1

Generalidades de *Streptococcus pneumoniae*

1.1 Historia y Taxonomía

Reino:	Procariotae
División:	Bacterias
Parte:	Cocos Gram positivos
Familia:	<i>Streptococcaceae</i>
Género:	<i>Streptococcus</i>
Especie:	<i>pneumoniae</i> ⁽⁴⁾

El neumococo fue descubierto independientemente en 1881, por Pasteur en Francia y por Sternberg en Estados Unidos. Quizá ninguna otra bacteria tuvo tanta importancia como ésta en el desarrollo temprano de la Inmunología y la Genética Molecular. Los estudios sobre la neumonía neumocócica fueron el punto de partida para la serotipia específica, ya que el reconocimiento de los distintos tipos serológicos de neumococo a partir de 1910, condujo a la obtención de sueros anti específicos, que constituyeron el tratamiento fundamental para las enfermedades infecciosas hasta el descubrimiento de los antibióticos. Posteriormente, las investigaciones sobre la transformación de los neumococos aportaron las pruebas iniciales de que sólo el ADN es el portador de la información genética.^(6,7,9,21)

Desde su descubrimiento, este pequeño micrococo ha recibido diversos nombres: *Micrococcus lanceolatus*, *Micrococcus pneumoniae*, *Diplococcus pneumoniae* o, más brevemente, neumococo. Aunque están estrechamente ligados con los estreptococos, hasta hace poco tiempo algunos investigadores lo tenían situado en un género aparte, *Diplococcus*; sin embargo, la clasificación actual de Bergey los incluye como una especie del género *Streptococcus*, siendo el nombre formalmente aceptado en la actualidad el de *Streptococcus pneumoniae* ^(9,21).

Se emplean dos nomenclaturas distintas para los tipos de neumococos: el sistema Danés, que es una ampliación del sistema de Cooper, en el cual se agrupan tipos serológicamente relacionados para formar subtipos; y el sistema preparado por Eddy bajo los auspicios del Servicio de Salud Pública de Estados Unidos y la Asociación Estadounidense de Sanidad Pública, en el cual los tipos diferenciables reciben números seriados, cualesquiera que sean sus relaciones antigénicas⁶⁷.

1.2 Morfología y fisiología

En su forma más característica, los neumococos son cocos pequeños, Gram positivos, en forma de punta de lanza, alargados o lanceolados (raramente se encuentran formas bacilares), suelen presentarse en pares (diplococos), aunque también se advierten cadenas que definitivamente son más cortas que las de *Streptococcus pyogenes*. Su tendencia a formar cadenas aumenta cuando crecen en medios artificiales y desfavorables, particularmente a concentraciones bajas de Mg⁺⁺. Aunque son Gram positivos en la fase exponencial de crecimiento, al envejecer los cultivos se pueden volver Gram negativos de modo progresivo, debido a la acción de enzimas autolíticas, las que después de transformar el Gram, causan su lisis^{67,69}.

Los neumococos forman en agar sangre colonias pequeñas, de 0.5 a 1.5 mm de diámetro, redondas, brillantes, no pigmentadas, al principio cupuliformes, que más tarde desarrollan una depresión central con bordes elevados, debido a la autólisis. Presentan alfa hemólisis, por lo cual se pueden confundir con las colonias alfa hemolíticas de *Streptococcus del grupo viridans*. Las colonias que crecen en la profundidad del agar son ovoides^{68,14}.

Cualquier cultivo de neumococos contiene algunos microorganismos incapaces de producir polisacáridos capsulares, dando lugar a colonias rugosas. Sin embargo, la mayoría son bacterias productoras de polisacáridos capsulares, produciendo colonias lisas. Las variantes lisa y rugosa que se observan en los neumococos, también se observan en muchas otras bacterias. Existen colonias intermedias entre estas variantes, pero el neumococo solo resulta virulento en la forma lisa. En la morfología microscópica, el cambio de liso a rugoso se traduce por pérdida de la cápsula⁶⁷.

En cultivos líquidos, la mayor parte de las cepas capsuladas presentan un crecimiento difuso, tendiendo a sedimentar cuando el medio se vuelve ácido; las

cepas no capsuladas, en especial las que tienden a formar cadenas, muestran un crecimiento granular, del que resulta una sedimentación rápida⁽¹⁴⁾.

El neumococo es un microorganismo facultativo y los límites de temperatura para su cultivo son de 25° a 42°C; es muy sensible a los cambios de pH, pero puede crecer y conservarse en un rango de valores de 6.5 a 8.3, con una cifra óptima de 7.8. Sus requerimiento energéticos son aportados fundamentalmente por fermentaciones de tipo ácido láctico, por lo que se clasifican, junto con los estreptococos que se agrupan en cadena, como bacterias acidolácticas. Es una bacteria no móvil, no esporulada, que no posee catalasa ni peroxidasa y está provista de una estructura muy importante, la cápsula. La llamada solubilidad en bilis es una característica prácticamente constante, aunque varía de intensidad según la cepa de que se trate. La quinina y algunos de sus derivados, como el clorhidrato de etil hidrocuprefina u optoquina tienen actividad antineumocócica, así como el fenol, el cloruro mercuríco y los antisépticos ordinarios.^(9,21)

La fermentación de la inulina permite diferenciar algunos neumococos de los estreptococos del grupo viridans, pero no se considera una prueba específica debido a que sólo el 40 a 60% de las cepas la fermentan.

Las siguientes son características bioquímicas del neumococo en fase S, pero debido a la facilidad con que estos microorganismos pasan de esta fase (cepa lisa) a fase R (cepa rugosa) no se usan para su identificación:⁽⁶⁾

- No fermenta polialcoholes ni pentosas
- Acidifica y coagula la leche tornasolada, pero no la reduce
- Licúa la gelatina
- Coagula el suero
- Es indol(+) en agua peptonada
- No reduce nitratos
- Fermenta sacáridos sin desprendimiento de gas y con producción de mucho ácido láctico, algunos ácidos volátiles y alcohol etílico.

1.3 Composición química y antigénica

Mosser y Tomaz identificaron los dos principales componentes macromoleculares de la pared celular de *Streptococcus pneumoniae*⁽¹⁸⁾ Uno, el peptidoglicano, está compuesto por glucosamina, ácido murámico, lisina, alanina

y ácido glutámico. El otro componente, el ácido teicoico contiene D-glucosa, galactosamina, fosfato, colina y diamino trideoxihexosa y es considerado como el antígeno C-polisacárido. Aunque los neumococos no están incluidos dentro del esquema de Lancefield, comparten un antígeno somático común, un ácido teicoico ribitol de la pared celular, que es inmunológicamente idéntico en todos los neumococos. A diferencia del grupo A de estreptococos, en el cual los tipos se diferencian en base al antígeno proteico M de envoltura, los tipos de neumococos se distinguen por poseer carbohidratos específicos capsulares, conocidos con el nombre de sustancia específica soluble o SSS. En la actualidad se conocen 85 tipos de neumococos, los cuales también contienen un antígeno envolvente, semejante a las proteínas M de los estreptococos del grupo A; aunque en los neumococos estas proteínas no son antifagocíticas ni los Ac. frente a ellas son protectoras como en el curso de las estreptococosis, sin embargo, estos antígenos no se utilizan para tipificar, ya que la presencia de la SSS enmascara la aglutinación, por lo cual los sueros antineumococos capsulados son claramente específicos de tipo.

Freeman menciona que ⁽²⁰⁾ los estudios de Dochez y Gillespie, en 1913, demostraron que los neumococos encontrados en los casos de neumonía lobar podían dividirse en cuatro grupos llamados tipos 1, 2, 3 y grupo IV, los tipos 1, 2 y 3 se encuentran en la mayor parte de los enfermos de neumonía y producen las infecciones más graves, teniendo características inmunológicas específicas, en tanto que el grupo IV es inmunológicamente heterogéneo ⁽²¹⁾.

Las cápsulas neumocócicas están compuestas por grandes polímeros de polisacáridos, los cuales son antigénicos e inicialmente provocan una respuesta de células B.

También se han descrito tres tipos diferentes de antígenos somáticos. Dos de ellos, el antígeno R, poco conocido, y la sustancia C, que es un hidrato de carbono, son específicos de especie. El tercero es una proteína tipo específica (antígeno M), que es inmunológicamente independiente de los polisacáridos capsulares tipoespecíficos y no es antifagocítica ^(7,21).

1.4 Productos celulares

El neumococo produce algunas sustancias tóxicas, pero nunca se ha demostrado que produzca alguna exotoxina análoga a la del bacilo diftérico o

retánico a pesar de la aparición de intoxicaciones graves en algunos casos de infecciones neumocóccicas en el hombre.^(7,9)

Dentro de las toxinas producidas por este microorganismo existe una hemolisina filtrable que actúa sobre eritrocitos de carnero, cobayo y hombre, llamada neumolisina, responsable de la alfa hemólisis que se observa en agar sangre. Esta hemolisina neumocóccica parece tener propiedades letales y dermatóxicas y se relaciona inmunológicamente con un grupo de toxinas citolíticas similares entre sí, sensibles a colesterol y oxigenolábiles, dentro de las que están incluidas la estreptolisina O, la toxina tetánica θ y la cereolisina.^(7,9,15)

El neumococo también produce una leucocidinas y una sustancia necrosante, similar a la que elaboran algunos estafilococos. Muchas cepas producen hialuronidasa, especialmente cuando se desarrollan en presencia de ácido hialurónico. Durante la autólisis también liberan una sustancia productora de lesiones purpúricas que causa hemorragias cutáneas e internas cuando se inyecta a conejos, algunos investigadores la han descrito como no antigénica, y parece ser un producto de desdoblamiento de una proteína neumocóccica⁽⁹⁾.

También se conoce la particularidad de los neumococos de sufrir autólisis, debido a la acción de una enzima autolítica. Aunque no se han definido los mecanismos moleculares que producen la activación de esta enzima, ésta aparece después que el cultivo inicia la fase estacionaria de crecimiento y el proceso autolítico se estimula por medio de agentes tensoactivos, tales como sales biliares (en especial el desoxicolato de sodio) e inclusive, por detergentes. La enzima autolítica es una L-alanino-muramilo-amidasa. Experimentos descritos indican que la lisis de neumococos por desoxicolato, ocurre a través de la participación de esta enzima. El componente colina del ácido teicoico juega un papel clave en la sensibilidad determinante de la enzima autolítica^(9,18,21).

Aunque los preparados de estas sustancias parecen aumentar la virulencia de cepas relativamente avirulentas cuando se inyectan en forma simultánea, dicha virulencia depende directamente del carbohidrato antifagocítico capsular de la SSS y de su invasividad. Aunque no existen pruebas de que ninguna de estas sustancias desempeñe un papel en la patogenia de las infecciones neumocóccicas, es posible que en los estadios terminales se produzca una toxina letal *in vivo*, análoga a la del

ántrax, que origine algunos efectos tóxicos, pero la causa real de las infecciones neumocócicas letales, permanece desconocida ^(7,9).

1.5 Patogenia

Los neumococos son transmitidos principalmente por secreciones de boca y vías respiratorias altas, mediante contacto directo.

Siendo frecuente el estado de portador (arriba del 60% de las personas examinadas albergan neumococos en las vías respiratorias superiores), los neumococos pueden desencadenar una infección cuando la resistencia baja lo suficiente. No se sabe por qué algunos portadores no sufren neumonía, pero al parecer el pulmón normal es muy resistente a esta infección. En gran parte, la resistencia a infecciones neumocócicas es cosa de predisposición individual y aunque la inmunidad específica es de poco valor para ésta, el complejo de factores que acompañan el estado de salud tiene enorme importancia en la aparición y la gravedad de estas infecciones: ^(6, 9, 12)

- 1) La edad: Las neumococcias son, ante todo, afecciones de las edades extremas (niños y adultos por arriba de los 50 años).
- 2) El sexo: El hombre es atacado con más frecuencia que la mujer, pero el embarazo favorece la aparición de neumonía con aborto en 2/3 de los casos.
- 3) La raza: Se conoce la gravedad de la neumonía en los anglosajones y los sujetos de raza negra; la forma septicémica es frecuente en los asiáticos.
- 4) Otros factores: La diabetes, el alcoholismo y las infecciones virales de vías respiratorias altas, así como los descensos súbitos de temperatura y la exposición prolongada al frío son factores que favorecen la infección por neumococos. También el cansancio y los trastornos del drenaje respiratorio como en los pacientes encamados, fumadores inveterados y personas que han inhalado irritantes tóxicos, son factores que predisponen a las neumococcias.

Aunque la neumonía lobar es la enfermedad neumocócica más importante en el hombre, los neumococos no siempre quedan localizados en el pulmón, ya que pueden emigrar por las vías nasales o distribuirse a través del sistema vascular a distintas regiones del organismo hasta crear otros focos de infección, pues ya se sabe que casi todos los órganos o tejidos pueden ser atacados por este microorganismo bajo determinadas circunstancias. ^(1, 4, 9)

En ocasiones, la neumonía neumocócica puede revestir un aspecto epidémico. El estudio de una epidemia mostró que el factor fundamental era el estado de portador y el predisponente, la frecuencia de enfermedades respiratorias no bacterianas. La existencia de pequeñas "epidemias", llevó a algunos autores a defender la teoría de la infección exógena, sin embargo, aunque las epidemias de neumonía neumocócica son raras y su morbilidad baja, es muy probable que la mayor virulencia de algunos tipos de neumococo actúe como factor selectivo para la distribución de los mismos en esta clase de infecciones. (9, 12, 19)

La virulencia es el poder y la capacidad que tiene un microorganismo de multiplicarse en un organismo dado. En el caso de *Streptococcus pneumoniae*, la cápsula juega un papel determinante con relación a la virulencia del mismo, así, los neumococos sobreviven y causan enfermedad, principalmente, debido a su cápsula. Se desconoce el mecanismo por el cual ésta interfiere con la fagocitosis, pero una vez que los neumococos pierden la cápsula pueden ser fagocitados y destruidos fácilmente. (9, 21, 16)

No se ha dilucidado la importancia de la neumolisina en la patogenia de las infecciones neumocócicas, pero los primeros informes indican que podría inhibir las propiedades antimicrobianas de los neutrófilos y la actividad opsonica del suero. (21)

1.6 Requerimientos nutricionales y medios de cultivo

Los neumococos son microorganismos exigentes y sus necesidades nutricionales son complejas debido a la gran variedad de tipos serológicos de este microorganismo. Es bastante uniforme la necesidad de añadir a los medios para su cultivo, colina y ácido nicotínico y pantoténico; algunas cepas requieren biotina y ácido ascórbico, ocasionalmente el desarrollo se estimula por la adición de purinas y pirimidinas. Las necesidades de aminoácidos son complejas y varían mucho de una cepa a otra. (6, 7, 9)

El mejor medio líquido para el cultivo de neumococos es el caldo elaborado con carne fresca, con un 10% de suero o sangre y a un pH final de 7.4 a 7.8. Para lograr un crecimiento masivo, se prepara un medio rico en glucosa, con lo cual se logra simultáneamente la producción de cápsula pero controlando constantemente el pH. Otro factor muy importante para intensificar el desarrollo, es una atmósfera de CO₂ al 5 o 10%. (7, 9)

Para el aislamiento de neumococos se recomienda el uso de agar BHI, el cual logra mantener uniforme la antigenicidad y algunos características serológicas, pero si se desean determinar reacciones hemolíticas típicas, se puede usar como base para el agar sangre, la tripticaseína, ya que es un medio neutro o escasamente alcalino, por lo que se recomienda para el cultivo de neumococos y otros microorganismos generalmente considerados como difíciles de cultivar. (2, 7, 8)

Para evitar la oxidación de los medios líquidos, se añade un agente reductor como la cisteína o el tioglicolato, esto es importante ya que la oxidación del medio inhibe el crecimiento de los neumococos. (5, 6)

Para mantener la virulencia de una cepa de neumococos, se recomienda conservarla en sangre de conejo en condiciones estrictas de anaerobiosis. Para guardar cultivos de neumococos, se recomienda proporcionarles una fuente de catalasa que evite la acumulación de peróxido de hidrógeno, siendo la más adecuada, los eritrocitos. (6)

Cuando la muestra biológica que presuntamente contiene neumococos es sangre, se debe hacer un cultivo en caldo glucosado amortiguado, con carne de ternera.

1.7 Identificación

El neumococo presenta dos etapas esenciales para realizar el diagnóstico microbiológico: (6, 16)

1) en los productos patológicos tomados directamente del organismo o bien en los cultivos jóvenes obtenidos en medios amortiguados y enriquecidos, donde característicamente son diplococos capsulados que dan lugar al crecimiento de colonias tipo S, pequeñas y transparentes; es virulento para el ratón y su identificación por pruebas bioquímicas es fácil,

2) en cultivos de varios días y en ocasiones desde la primera resiembra, donde el microorganismo ha perdido su cápsula y su agrupamiento característico y aunque el cultivo es más abundante, las colonias son de tipo R; se ha perdido la virulencia para el ratón y la mayoría de sus propiedades bioquímicas son inespecíficas. Aquí, se hace necesaria la inoculación de un ratón para obtener neumococos que sean fácilmente identificables.

Las pruebas que se usan para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* son las siguientes: (1, 3, 6, 7, 9, 14, 17)

- ◆ **Tinción de Gram:** Se observan diplococos Gram positivos de 0.5 a 1.0 micras, lanceolados, o en cadenas cortas de 4 a 6 elementos -como máximo- de aspecto rígido.
- ◆ **Tinción de cápsula:** Generalmente, la cápsula se pone de manifiesto por medio de una coloración negativa. Existen varios métodos, pero el más común es el de la tinta china, donde se observa todo el fondo oscuro y los diplococos se ven como zonas claras, ya que no toman la coloración negra debido a su cápsula. Otro método es el del rojo congo, donde además del colorante, se usa un mordiente, pero al igual que con la tinta china, las cápsulas no toman color alguno y los diplococos se observan en un fondo rojo marrón. Existen otros métodos más y al hacer la observación se ven los neumococos sin color con el fondo del colorante usado.
- ◆ **Observación de alfa hemólisis en agar sangre:** Los neumococos dan lugar a colonias brillantes, redondas, no pigmentadas, alfa hemolíticas, con un diámetro de 0.5 a 1.5 mm en agar sangre. Cuando estas colonias envejecen, sus centros se deprimen por la autólisis.
- ◆ **Solubilidad en bilis:** Para realizar esta prueba que pone de manifiesto la activación de las enzimas autolíticas, se deben inocular 2 ó 3 colonias sospechosas en caldo Todd-Hewitt, soya tripticaseína o BHI, incubar a 37°C durante 18 h aproximadamente. Tomar 0.5 ml del cultivo y si es necesario ajustar el pH a 7 con NaOH 1N, posteriormente, añadir 0.5 ml de desoxicolato de sodio al 2%, incubar a 37°C y examinar periódicamente durante 2 h si se presenta aclaramiento del tubo indica una prueba (+). Esta prueba también se puede llevar a cabo usando una suspensión de células de colonias sospechosas en solución salina, la cual debe de tener una turbidez de 0.5 a 1 en la escala de McFarland. La prueba se efectúa de la manera ya descrita. También se puede detectar la solubilidad en bilis sobre agar, si previamente se tocó una colonia aislada con una asa conteniendo desoxicolato e incubando a 37°C durante 30 min. Las colonias de neumococos desaparecen dejando sobre el agar sangre un área de alfa hemólisis.

- ◆ **Sensibilidad a optoquina:** El clorhidrato de etilhidrocupreína, mejor conocido como optoquina, es una sustancia antibacteriana, relativamente específica contra neumococos, por lo que se usa para la identificación de éstos. En un cultivo de 18 a 24 h al que se le colocó posterior a la siembra en gelosa sangre un disco con optoquina, se observa el halo de inhibición que se produce sobre el crecimiento bacteriano; se considera que el microorganismo es sensible a la optoquina, si el halo de inhibición es de 14 mm cuando se usó un disco de 6 mm o de 16 mm si se usó un disco de 10 mm.
- ◆ **Reacción de quellung o de hinchamiento capsular:** Esta prueba se basa en el hecho de que si se mezclan bacterias capsuladas con anticuerpos específicos de tipo, la cápsula se "hincha", es decir, cuando los neumococos se tratan con su suero homólogo, el antipolisacárido se combina con el polisacárido capsular y la cápsula se vuelve refráctil: el cambio del índice de refracción, hace que la cápsula parezca hinchada, y se hace más visible. Esta reacción, al igual que otras de precipitación de polisacáridos, se inhibe por exceso de antígeno.

Antes del uso de los antibióticos, esta prueba se hacía para saber específicamente el tipo de neumococo causante de la enfermedad, para usar como terapia el suero específico, en la actualidad se puede emplear un suero que contenga anticuerpos contra todos los tipos de neumococos (suero omnivalente) para la identificación precisa del neumococo.

- ◆ **Inoculación de ratón blanco:** Esta prueba se realiza tomando en cuenta la extrema sensibilidad que muestra el ratón blanco a la inoculación con neumococos virulentos, para la prueba se inocula en el peritoneo de un ratón blanco, esputo lavado y suspendido en suero fisiológico estéril. Con cepas virulentas de neumococo, el animal muestra signos de enfermedad en 5-8 h, al hacer la necropsia, el examen microscópico del exudado peritoneal permite observar muchos diplococos encapsulados.
- ◆ **Otras pruebas:** Para la identificación de neumococos también pueden emplearse pruebas de aglutinación y precipitación. Mediante la contraelectroforesis se detecta igualmente el polisacárido capsular antigénico en el esputo procedente de pulmones infectados por neumococos, aún cuando el cultivo no muestre al microorganismo.

Capítulo 2

Autolisina

2.1 Composición química

La enzima autolítica de *Streptococcus pneumoniae* es una N-acetil-muramil-L-alanina-amidasa, la cual divide la unión entre el ácido murámico y la alanina de la porción peptidoglicana de la pared celular. ^(18, 21)

Se ha demostrado que las autolisinas son factores importantes en la destrucción de las bacterias por antibióticos. La destrucción de células neumocócicas no autolíticas, se llevó a cabo en un tiempo mucho mayor, en presencia de penicilina, D-cicloserina o fosfomicina, que cuando las células eran capaces de autolizarse. ⁽¹³⁾

Mosser y Tomaz reportaron que las paredes que se solubilizaron con la enzima autolítica, dieron una fracción peptídica de bajo peso molecular, la cual contenía principalmente, alanina, ácido glutámico y lisina (pero no aminoazúcares) y una fracción de alto peso molecular, que consistía del polímero del ácido teicoico y el polímero sacárido deficiente de aminoácidos de la porción terminal del peptidoglicano. Por lo tanto, la principal actividad autolítica de sus preparaciones enzimáticas, provenía de una amidasa, que eliminó la cadena peptídica del polisacárido del peptidoglicano. ⁽¹⁶⁾

La colina del ácido teicoico juega un papel clave en la sensibilidad determinante de la enzima autolítica, ya que se observó que preparados celulares de neumococos en los que se reemplazó la colina de la pared celular por etanolamina, eran totalmente resistentes a la acción de la enzima autolítica. ⁽¹⁸⁾

La importancia fisiológica de las macromoléculas conteniendo colina, se manifiesta por el hecho de que los neumococos la requieren nutricionalmente; además, cuando la etanolamina análoga reemplaza a la colina en la pared celular de la bacteria, ésta desarrolla una serie de anomalías fisiológicas: las células hijas

no se separan al final de la división celular, y las células pierden su capacidad de llevar a cabo la transformación genética, no se autolizan en la fase estacionaria de crecimiento y se hacen resistentes a la lisis inducida por detergentes ^(18, 22).

2.2 Extracción de la enzima autolítica de *Streptococcus pneumoniae*

Existen varios métodos para la extracción de enzimas bacterianas, a continuación se describen dos de ellos:

1.- Método de Howard y Gooder:⁽¹³⁾ Las células obtenidas de 1.5 l de un cultivo en caldo Todd-Hewitt suplementado con 0.5% de glucosa, se lavan dos veces en solución salina a 4°C y se suspenden en 50 ml de fosfato de sodio 0.2M, a pH 6. Se lleva a cabo la autólisis en 1.5 h a 37°C obteniéndose la fracción soluble del autolizado por centrifugación a 29,000 rpm durante 30 min. El sedimento se suspende en 50 ml de amortiguador de fosfatos y se centrifuga, el sobrenadante se junta con la primera fracción soluble. Todos los pasos restantes se hacen a 4°C y las centrifugaciones son de 20 min a 12,000 g. A los 100 ml de extracto crudo se le añaden 4 ml de sulfato de estreptomina al 20% con agitación constante. Se continúa agitando durante 30 min y se centrifuga. El material insoluble se desecha y se añade a la fracción soluble sulfato de amonio sólido, a una concentración final de 40% de saturación. Después de 30 min se colecta el precipitado por centrifugación, mismo que se disuelve en 10 ml de fosfato de sodio 0.01 M a pH 6, con agitación constante se añaden 5 ml de 1-butanol. Se continúa agitando durante 15 min y se centrifuga. La fase acuosa se dializa toda la noche contra 1 litro de fosfato de sodio 0.01 M a pH 6. La actividad enzimática es estable a 4°C durante varias semanas. La precipitación con sulfato de amonio recupera 80 a 90% de la actividad y el paso con butanol logra 55 a 75% de la actividad y alrededor de 1/3 de la purificación.

2.- Método de Mosser y Tomazs:⁽¹⁸⁾ Se cosechan por centrifugación las células de un cultivo en fase exponencial, se lavan y se resuspenden en 0.01 volumen de amortiguador de fosfatos-solución salina, conteniendo 0.002 M de mercaptoetanol. Se añaden 0.5 a 1.0 mg/ml de DNasa pancreática y de 0.03 a 0.1% de

desoxicolato, a una suspensión de 5×10^{10} bacterias por 5 ml. La suspensión se incubó a 37°C, hasta lograr la máxima clarificación, lo que sucede entre 10 y 15 min. Esta suspensión clarificada se centrifuga 10 min a 12,000 rpm para remover las partículas gruesas. El sobrenadante se pasa a través de 2 filtros de fibra de vidrio y sobre un filtro millipore tipo HA de 2.5 cms. El filtrado se pasa a través de una columna de Sephadex G-75, de 3 x 40 cms, usando como eluyente un amortiguador de fosfatos solución salina, conteniendo mercaptoetanol 0.002M, este paso se realiza en el cuarto frío para remover el desoxicolato. La enzima se conserva durante varios meses a 4°C, sin pérdida detectable de la actividad autolítica.

2.3 Caracterización y propiedades de la enzima

En el trabajo publicado por Howard y Goeder, ⁽¹³⁾ se encuentra que algunas de las características de la enzima autolítica de *Streptococcus pneumoniae* y cómo se demostraron, se ve a continuación:

1.- Efecto del pH sobre la actividad de la enzima: Para demostrar esto, se suspendieron paredes celulares de neumococos liofilizadas en fosfato de sodio 0.01 M conteniendo NaCl 0.1M a diferentes pH, en un rango de 5.5 a 8.0. La autolisina se diluyó en amortiguador y se registró el decremento de la D.O., en un intervalo de 10 min para cada valor de pH. El mayor decremento de turbidez se logró a pH 7.0.

2.- Efecto de la concentración de diferentes sales sobre la actividad lítica: Se probó la actividad lítica en fosfato de sodio 0.01 M, a pH 7.0 conteniendo diferentes cantidades de NaCl. La medida de la lisis observada en donde había mayor cantidad de NaCl, fue aproximadamente 50% más que cuando la lisis ocurrió en fosfato de sodio 0.01 M solo.

La estimulación de la actividad por KCl también se observó entre 0.01 y 0.025 M y fue idéntica a la estimulación por NaCl arriba de 0.1 M.

La actividad lítica no fue afectada por MgCl₂ al 0.01%, por desoxicolato de sodio al 0.1%, ni por etanolamina 0.01 a 0.1 M.

Concentraciones de colina en 0.02 a 0.05 M causaron alrededor de 50% de decremento en la medida de la lisis.

3.- Distribución de actividad autolítica en fracciones celulares: Se leyó la cantidad de actividad lítica en la fracción citoplasmática, en el líquido del lavado de paredes en salina y agua y en paredes autolizadas.

Se separaron por centrifugación las paredes y la fracción citoplasmática de una suspensión de células lisadas. Las paredes sedimentadas se suspendieron en solución salina y se dividieron en 2 muestras iguales. Cada muestra se sedimentó y el líquido sobrenadante se guardó (marcándose como primer lavado de paredes). Una de las muestras se suspendió y se lavó 2 veces en salina y el líquido de los lavados se guardó (marcándose como lavado con salina 1 y 2). La otra muestra de paredes se suspendió y lavó 2 veces en agua desionizada y el líquido del lavado se guardó (marcándose como agua de lavado 1 y 2). Ambas preparaciones de paredes lavadas finalmente se suspendieron en fosfato de sodio 0.1 M a pH 7, a 37° C. Las paredes lavadas en agua se lisaron sólo después de 3 h de incubación.

El número de unidades de enzima de cada fracción derivada de las 2 mitades de células lisadas se encuentran en la siguiente tabla:

Fracción probada	Unidades de Enzima
Citoplasma	20.5
Primer lavado de paredes celulares	2.0
Lavado con salina 1	0.7
Lavado con salina 2	menos de 0.4
Lavado con agua 1	4.2
Lavado con agua 2	8.4
Lisado de paredes celulares lavadas con salina	6.9
Lisado de paredes celulares lavadas con agua	menos de 1.2

De la tabla anterior se deduce que se eliminó la actividad autolítica de las paredes durante los lavados con H₂O destilada y que alrededor del 50% de la actividad se encontraba en la fracción citoplasmática.

4.- Poder de reducción de paredes durante la lisis: Las paredes neumocóccicas a una concentración de 1.5 mg/ml se incubaron con autolisina durante 90 min y se determinó el poder de reducción de la mezcla y la turbidez a intervalos periódicos. Hubo un decremento de la turbidez en aproximadamente un 60% después de la incubación, pero no hubo cambio detectable en el poder de reducción de las paredes, así como tampoco cuando se incubaron las paredes o la autolisina solas a concentraciones similares a las de la mezcla.

Capítulo 3

Parte Experimental

3.1 Material

3.1.1. Material de uso común en el laboratorio

Cajas de Petri

Celdas para espectrofotómetro B & L

Gradilla metálica

Matraces Erlenmeyer de 125, 250, 500 y 1000 ml

Matraces con tapón de rosca de 125, 250 y 1000 ml

Matraces aforados de 50, 100 y 1000 ml

Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 ml

Pipetas Pasteur con bulbo

Probetas de 25, 100, 500 y 1000 ml

Termómetro Taylor de -10 a 200° C

Tubos metálicos con tapón para ultracentrífuga

Vasos de precipitado de 125, 250 y 500 ml

Tubo de ensaye de 13 x 100 mm y de 16 x 150 mm

Tubo de ensaye con tapón de rosca de 16 x 150 mm

3.1.2. Equipo

Autoclave (Equipar S.A.)

Balanza Analítica (Sartorius)

Balanza Granataria (Ohaus)

Centrífuga de 500 a 5000 rpm (Solbat)

Espectrofotómetro (Baush & Lomb)

Incubadoras (Riossa)

Microscopio (Karl Zeiss)

Parrilla de calentamiento con agitación magnética (Molda Agitherm)

Potenciómetro (Sargent-Welch, PBL 400)

Refrigerador Philips

Sonicador (MSE, Amplitud: 0-30)
Ultracentrífuga (Birman)
Vórtex (Genie)

3.1.3. Reactivos

Acido Acético glacial
Acido Pirogálico
Acido Sulfúrico
Agua destilada
Alcohol-acetona
Cloruro de bario
Cloruro férrico 6%
Cristal violeta
Desoxicolato de sodio
Fenol 5%
Fosfato de sodio dibásico
Fosfato de sodio monobásico
Fucsina ácida 1%
Hidróxido de sodio
Lugol
Rojo congo
Safranina
Solución salina
Sulfato de amonio
Sulfato de estreptomina

3.1.4. Medios de cultivo

Agar de infusión cerebro corazón (Agar BHI) (Bioxon)
Base de Agar Sangre + sangre de carnero al 5%
Infusión cerebro corazón (BHI) (Bioxon)
Caldo de soya y tripticaseína adicionado con carne fresca y
dextrosa 2.5% (Bioxon)
Caldo tioglicolato (Bioxon)

3.1.5. Material Biológico

Cepas liofilizadas: (Ceparío E.N.E.P. Zaragoza Campus II)

Streptococcus faecalis
Streptococcus mutans
Streptococcus pneumoniae
Streptococcus pyogenes
Streptococcus salivarius
Streptococcus sanguis
Eritrocitos humanos
Eritrocitos de carnero

3.1.6. Otros

Gasa

Jarra para atmósfera de CO₂

Papel indicador pH (0.5 a 14.0)

Masking tape

Membrana para diálisis (poro número 4)

Sensidiscos con optoquina (5 mg etil hidrocupreína BBL)

Sensidiscos con bacitracina (0.040 BBL)

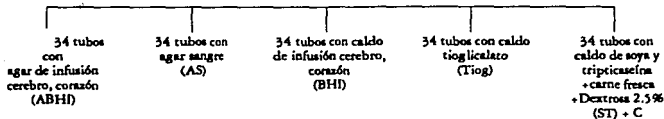
Sensidiscos con autolisina

Tijeras

3.2 Metodología

3.2.1. Conservación de la cepa de *Streptococcus pneumoniae*

- Se hidrató una cepa liofilizada de *Streptococcus pneumoniae* con 3 ml de Caldo tioglicolato.
- Se tomaron 2 ml de esta suspensión y se pasaron a un tubo con caldo tioglicolato. Posteriormente se incubó a 37°C durante 18.
- Con una pipeta estéril de 1 ml se procedió a inocular 0.1 ml del cultivo de 18 hr en una serie de tubos con tapón de rosca:



- Todos los tubos inoculados se llevaron a incubación a 37°C durante 48 hr junto con otra serie de tubos sin inocular que posteriormente se usaron como blanco para las lecturas de D.O.
- A las 24 horas se tomó un tubo de cada medio inoculado y 1 tubo de cada medio sin inocular. A los 2 medios sólidos (ABHI y AS) se les agregaron 7 ml de H₂O destilada y con una asa estéril se desprendió con mucho cuidado el crecimiento bacteriano. A todas las muestras se les midió el pH con papel indicador, se les hizo frotis para observar Gram y se les midió la D.O. a 600 nm usando como blanco el medio de cultivo respectivo; para los medios sólidos se usó H₂O destilada como blanco.
- A las 48 horas se tomaron muestras nuevamente y se procedió con ellas de la misma manera que con las muestras tomadas a las 24 horas.
- Se procedió a separar los tubos restantes para conservarlos a diferentes temperaturas de la siguiente manera:

a 4°C	a 25°C	a 37°C	a 55°C
8 ABHI	8 ABHI	8 ABHI	8 ABHI
8 AS	8 AS	8 AS	8 AS
8 BHI	8 BHI	8 BHI	8 BHI
8 Tiog	8 Tiog	8 Tiog	8 Tiog
8 ST+C	8 ST	8 ST+C	8 ST+C
8 BHI	8 BHI	8 BHI	8 BHI
8 Tiog	8 Tiog	8 Tiog	8 Tiog
8 ST+C	8 ST+C	8 ST+C	8 ST

Blancos

- Cada 5 días se tomaron muestras de todos los cultivos en todas las temperaturas, midiéndoseles pH y D.O. Se realizaron frotis para observar alternadamente Gram y cápsula (para lo que se usó el método de Rojo Congo). Asimismo cada 10 días se hicieron resiembras de las muestras, con una asa bacteriológica sobre agar sangre para observar la viabilidad de las mismas. La metodología que se siguió con todas las muestras fue la misma que se realizó en las muestras a las 24 y 48 horas.

3.2.2. Obtención de la autolisina ⁽¹³⁾

- Las células obtenidas de 3 litros de un cultivo de 18 hr en caldo tioglicolato se lavaron dos veces con solución salina a 4°C.
- Las células se suspendieron en 50 ml de amortiguador de fosfatos 0.2 M, pH 6.
- Esta suspensión se incubó 1 hora a 37°C, o se sometió a sonicación 10 min a -5 C y posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 40 min.⁽²⁰⁾
- El líquido sobrenadante se guardó y el sedimento se resuspendió en 50 ml de amortiguador de fosfato 0.2M, pH 6 y se centrifugó a 12,000 rpm durante 40 min. El sobrenadante se juntó con la primera fracción soluble.
- Se añadieron 4 ml de sulfato de estreptomycinina al 20% con agitación constante y se continuó agitando 30 min, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min.
- A la fracción soluble se añadió sulfato de amonio sólido a una concentración final de 40% de saturación.
- Se agitó con agitador magnético durante 30 min en un cuarto frío a 4°C y se colectó el precipitado por centrifugación a 12,000 rpm, durante 20 min y a 4°C.
- El precipitado se disolvió en 10 ml de amortiguador de fosfatos 0.01M pH 6.
- Se añadieron 5 ml de 1-butanol con agitación constante. Se continuó agitando durante 15 min en cuarto frío y se centrifugó a 12,000 rpm, durante 20 min a 4°C.
- El sedimento se desechó y se dializó la fase acuosa contra 2.5 litros de amortiguador de fosfatos 0.01 M, pH 6, durante 12 horas aproximadamente y a 4°C (en cuarto frío).
- El producto se concentró por liofilización a 8 ml aproximadamente y se guardó en congelación para pruebas posteriores.

3.2.3. Ensayo de la Autolisina

a) Actividad hemolítica ⁽¹⁵⁾

- Se hicieron diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512 de la enzima en amortiguador de fosfatos-salina (PBS) con NaCl 0.138 M, NaH_2PO_4 0.009 M y Na_2HPO_4 0.009M, pH 7.4.
- Se mezcló 1 ml de cada dilución con 1 ml de una suspensión al 3 % de eritocitos humanos en PBS.

- Todos los tubos se agitaron perfectamente y se incubaron a 37 °C durante 60 min, junto con un tubo conteniendo únicamente la suspensión de eritrocitos, para usarse posteriormente como blanco.
- Se volvieron a agitar todos los tubos y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min.
- Se leyó la absorbancia a 540 nm.

b) *Actividad autolítica*

Según Mosser y Tomazs, ⁽¹⁸⁾ una unidad de enzima, es la cantidad de ésta que causa un decremento de 0.10 unidades de D.O. en un intervalo de 10 min, a 500 nm.

- Se hizo una suspensión de neumococos en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.0, a la cual se le ajustó la D.O. entre 0.6 y 0.65 unidades de absorbancia, a 500 nm.
- En una gradilla se colocaron varios tubos de ensaye, en los cuales se pusieron 3 ml de la suspensión antes mencionada. En los primeros dos tubos se adicionaron 0.1 y 1.0 ml de enzima, respectivamente. A los 10 min se leyó la D.O. a ambos tubos. Posteriormente se agregaron en 4 tubos más las siguientes cantidades de enzima: 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml y exactamente a los 10 min de haber agregado la enzima en cada tubo se leyó la D.O. a 500 nm para encontrar la cantidad de enzima causante del decremento en la turbidez, propuesto por Mosser y Tomazs.

Esta prueba se realizó en su totalidad a 37°C, lo cual se logró manteniendo todos los tubos en un baño de agua caliente circulante a dicha temperatura.

c) *Especificidad de la autolisina*

I. Prueba en tubo: a 5 ml de un cultivo de 18 hr en BHI de cada una de las siguientes cepas: *S. pneumoniae*, *S. sanguis*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. salivarius*, se adicionaron 0.5 ml de la autolisina y se incubaron a 37°C durante 15 min. Posteriormente se observó la lisis causada en cada tubo.

II. Prueba en caja: se hicieron siembras en Agar Sangre de las siguientes cepas: *S. pneumoniae*, *S. sanguis*, *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. faecalis*, *S. salivarius* e inmediatamente se colocaron discos estériles de papel filtro de 4 mm de

diámetro, impregnados con la autolisina (con la ayuda de una pinza de disección flameada), se incubaron a 37°C durante 24 hr. Se leyeron los halos de inhibición y la hemólisis causada por la enzima en todas las cajas.

III. Prueba en caja, con atmósfera de CO₂: se hicieron siembras en Agar Sangre de las 6 cepas de los estreptococos antes mencionados, se colocaron discos de papel filtro de 4 mm de diámetro impregnados con la autolisina y se metieron todas las cajas en una jarra con vela para lograr una atmósfera de CO₂. Se incubaron a 37°C durante 24 hr., y se leyeron el halo de inhibición y la hemólisis causada por la enzima en todos los cultivos.

IV. Prueba comparativa de inhibición de estreptococos frente a optoquina bacitracina y autolisina en condiciones de anaerobiosis: Se hicieron siembras de las 6 cepas de neumococos en cajas de agar sangre, se colocaron discos de 4 mm de diámetro impregnados con autolisina y discos comerciales con optoquina y bacitracina. Anteriormente se esterilizaron cajas de Petri vacías, a las cuales se les colocaron en las tapas pedazos de gasa de aproximadamente 10 cm de largo x 8 cm de ancho, doblados, a que quedaran más o menos de 3 cm de ancho. Estas tapas con gasa estériles se colocaron inmediatamente sobre los cultivos en condiciones de esterilidad y con una pipeta Pasteur estéril se agregaron 3 o 4 gotas de pirogalol al 20%, más 3 o 4 gotas de NaOH al 30% y se sellaron perfectamente con masking tape, posteriormente se metieron en una jarra con vela y se incubaron a 37°C durante 24 hr, se leyeron el halo de inhibición y la hemólisis causados por los discos con autolisina, optoquina y bacitracina.

V. Prueba comparativa de inhibición de los estreptococos frente a optoquina, bacitracina y autolisina en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis: Se realizaron siembras de las cepas de estreptococos sobre Agar Sangre, se colocaron discos comerciales de optoquina y bacitracina y discos de 4 mm de diámetro impregnados con la autolisina obtenida en cada caja, se taparon e incubaron a 37°C durante 24 hr. Se leyeron halos de inhibición de los sensibilizados sobre las diferentes cepas. Para las condiciones de anaerobiosis se siguió el mismo procedimiento que para las condiciones de aerobiosis pero después de colocar los discos de optoquina, bacitracina y autolisina en cada caja se obtuvieron condiciones de anaerobiosis en cada

caja por el método del pirogalol (anteriormente descrito) y se metieron todas a una jarra con vela. Se incubaron a 37°C durante 24 hr y se leyeron halos de inhibición de cada disco sobre cada cepa probada. Se compararon los resultados de ambas pruebas.

Capítulo 4

Resultados

4.1. Obtención y Conservación de la cepa de *Streptococcus pneumoniae*

4.1.1. Observación de frotis

Tabla No. 1 Observación microscópica de frotis teñido por el método de Gram de un cultivo de *S.pneumoniae* a 37° C, a las 24 y 48 hrs.

	24 horas	48 horas
BHI	Abundantes diplococos pequeños, escasos cocos individuales y cadenas	Cocos Aislados y diplococos G (+) algunas cadenas de 3-4 células
Trioglicolato	Abundantes cocos lanceolados, diplococos y cadenas de 4-8 células	Abundantes diplococos G (+), escasas células aisladas y cadenas 3-4.
ST	Abundantes diplococos G(+), escasos cocos lanceolados.	Cocos lanceolados y redondos G (+), escasas cadenas de 3-4 células.
Agar Sangre	Cocos muy pequeños escasas cadenas y diplococos de mayor tamaño que los cocos aislados.	Cocos pequeños, lanceolados y abundantes diplococos lanceolados, escasas cadenas de 4-8 células.
Agar BHI	Cocos muy pequeños y cadenas G (+), algunas cadenas de 3-4 células.	Abundantes diplococos y cocos lanceolados G (+), escasas cadenas.

Tabla No. 2 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de Gram, de *S. pneumoniae* cultivado en caldo BHI y conservado 35 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	Abundantes cocos aislados, escasos diplococos y cadenas.	Cocos aislados, abundantes, muy escasos diplococos, no se ven cadenas.	Casi exclusivamente cocos redondos, regular cantidad de pares de cocos, escasas cadenas de 3-4 células. Gram con tendencia a negativo.	Cocos aislados no se ven diplococos, algunas cadenas de 3-4 cadenas.
15 Días	Cocos aislados y diplococos, escasas cadenas de 3-4 células. No hay células lanceoladas.	Casi sólo células aisladas, algunos pares de cocos, no hay cadenas.	Abundantes cocos G (+), muchas células irregulares, sin bordes definidos, condensación de cromatina en muchas células. Escasos diplococos y cadenas G (+), pares de células lanceoladas.	Muy escasas células de forma regular, diplococos, abundantes restos celulares.
25 Días	Cocos y pares de cocos, escasas cadenas y diplococos. Cocos agrupados en racimos de 3-5 células.	Escasos cocos y diplococos. algunos racimos de 3-4 células G (-) y células de bordes no regulares. Abundantes restos celulares.	Escasos cocos redondos G (-). Abundantes restos celulares de color rojo.	Escasos cocos y diplococos G (+). Abundantes acúmulos de restos celulares.
35 Días	Muy pocas células G (+) con bordes definidos, pero algunas con condensaciones de cromatina y de formas irregulares. Abundantes restos celulares de células individuales o en acúmulos.	Muy escasas células con morfología característica, algunas con condensación de cromatina. Casi exclusivamente se observan restos celulares.	Muy escasos cocos G (+) Mayormente se observan acúmulos de restos celulares. Abundantes células con Gram indefinido o negativo.	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 3 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de Gram, de *S. pneumoniae* cultivado en caldo tioglicolato y conservado durante 35 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	Abundantes diplococos, escasos cocos aislados pero de mayor tamaño que en BHI, algunas cadenas.	Diplococos y cocos aislados, escasas cadenas de 3-4 células	Gran cantidad de pares de cocos, regular cantidad de cadenas de 4-6 células. Cocos redondos y lanceolados.	Cocos en pares, no diplococos, muchas células de forma irregular como con acúmulos de citoplasma.
15 Días	Abundantes cocos en pares, pocas cadenas. Diplococos y cocos aislados, redondos y lanceolados, agrupación en racimos de 4-8 células, se ven células G(-) algunas de forma irregular o sin contornos definidos.	Cocos aislados, la mayoría redondos, algunos lanceolados se ven diplococos, no hay cadenas aproximadamente la mitad de las células con Gram indefinido	Células G(+) y G(-), condensaciones de cromatina en muchas células, las G(-) de forma definida. Cocos aislados y diplococos escasos, algunas cadenas de 3-5 y algunos pares de cocos.	Pocos diplococos, pares de cocos y cadenas de 4-6, abundantes células de los 3 tipos de agrupación con bordes indefinidos y con condensación de cromatina, restos celulares en mucho menor cantidad que en BHI.
25 Días	Se observan células irregulares y con condensaciones de cromatina. Cocos redondos, escasos diplococos y cadenas de 3-4 células.	Cocos aislados y escasos pares, acúmulos de células con Gram indefinido o Gram +.	Escasos cocos y diplococos Gram positivos. Muchas células Gram negativas y con condensaciones de cromatina.	Abundantes restos celulares. Muchas células de forma irregular o con condensaciones de cromatina. Escasos diplococos y pares de cocos G(+).
35 Días	Escasos cocos, diplococos y cadenas de 3-5 miembros Gram positivo. Abundantes células con Gram indefinido o negativo. Células deformadas o con condensación de cromatina.	Pocos diplococos Gram positivos. Muchas células con Gram indefinido, deformadas o con acúmulos de cromatina.	Algunos acúmulos de restos celulares. Muchas células deformadas o con apariencia de haberse reventado. Escasos cocos y diplocos Gram positivos.	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 4 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de Gram, de *S. pneumoniae* cultivado en caldo soya tripticasefina y conservado durante 35 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	Cocos y diplococos más o menos en igual proporción, pocas cadenas de 3-4 células.	Diplococos y cocos redondos, escasas células lanceoladas y pocas cadenas de 3-5.	Cocos aislados y en pares, no se ven células lanceoladas, algunas cadenas de 3-5 células.	Muestra desecada por calor, por falta de tapón de rosca.
15 Días	Cocos, diplococos y racimos. Cadenas de 4-8 células, pocas células, las lanceoladas, generalmente formando cadenas.	Cocos y diplococos, escasas cadenas de 3-5 células. 1/3 de células G (-). Conglomerados celulares G (+) de 10 o más células.	Células G (+), escasas cadenas y diplococos, la mayoría cocos redondos.	Muestra desecada por calor y por falta de tapón rosca.
25 Días	Abundantes células de G indefinido, tendiente a negativo. Células con condensaciones de cromatina. No se ven restos celulares.	Cocos redondos, diplococos y pares de cocos. Células Gram positivo y negativo. Células irregulares y con condensaciones de cromatina.	Cocos, diplococos y cadenas de G (+). Células con condensación de cromatina. Restos celulares individuales sin formar acúmulos.	Muestra desecada por calor.
35 Días	Cocos, pares de cocos y diplococos G (+) en muy escaso número. Abundantes restos celulares y células irregulares, con G indefinido.	Escasos cocos, pares de cocos y cadenas G (+) Células deformadas y con condensaciones de cromatina. Acúmulos de restos celulares.	Abundan células deformadas, acúmulos de restos celulares, Escasos cocos, pares de cocos y diplococos G (+).	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 5 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de Gram, de *S. pneumoniae* cultivado en agar BHI y conservado durante 35 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	Cocos, diplococos y cadenas de 6-8 células, muchos cocos agrupados en pares, células lanceoladas y redondas.	Diplococos y cocos aislados, cadenas de 6-8 células.	Cocos aislados y en pares, pocos diplococos y células lanceoladas, algunas cadenas de 3-5 células.	Muestra desecada por calor.
15 Días	Diplococos y cocos G (+) todas las células de forma regular, la mayoría cocos redondos, algunos lanceolados.	Cocos y diplococos G (+), todos de forma regular.	Cocos y diplococos G (+), algunos diplococos lanceolados.	Muestra desecada por calor.
25 Días	Cocos redondos, diplococos, cadenas de 4-6 células y racimos de cocos, todos G (+).	Se observan cocos y pares de éstos, escasos diplococos. No se ven células con condensaciones de cromatina, cambio en el Gram.	Cocos redondos, diplococos y algunas cadenas de 3 ó 4 levaduras en el frotis, contaminantes de la muestra.	Muestra desecada por calor.
35 Días	Cocos redondos y lanceolados. Diplococos y escasas cadenas. No se ven células deformadas.	Regular cantidad de cocos y pares de cocos, escasos diplococos. Todo Gram (+). No se aprecia deformación celular ni variación del Gram.	Regular cantidad de cocos y diplococos, algunas cadenas de 4-6 miembros. No se aprecian anomalías morfológicas.	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 6 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de Gram, de *S. pneumoniae* cultivado en agar sangre y conservado 35 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	Cocos pequeños y diplococos G (+), escasas cadenas de 3-5 células.	Células muy pequeñas, cocos y diplococo G (+), escasas cadenas de 3-4 células. Contaminación por levaduras.	Cocos aislados muy pequeños, escasos diplococos y cadenas de 3-4 células, algunas células lanceoladas.	Muestra desecada por calor.
15 Días	Cocos y diplococos G (+). Cadenas de 3-4 células lanceoladas.	Cocos y diplococos G (+) no se ven cadenas.	Cocos G (+), escasos diplococos y cadenas de 3-5 células.	Muestra desecada por calor.
25 Días	Cocos, diplococos, racimos y cadenas de células lanceoladas de 4 miembros o de cocos redondos.	Cocos redondos, escasos pares de cocos y diplococos, algunas cadenas de 4-6 miembros. Escasos diplococos. Todo G (+). No se aprecia deformación celular.	Cocos y pares de cocos y algunas cadenas de Gram positivos.	Muestra desecada por calor.
35 Días	Cocos redondos y lanceolados, diplococos y cadenas, aunque no en gran cantidad. Gram positivos y morfológicamente normales.	Cocos redondos y lanceolados, menos cantidad de diplococos G (+). Todas las células con morfología característica.	Regular cantidad de cocos redondos y lanceolados, pares de cocos y escasos diplococos G (+). No se ven células anormales.	Muestra desecada por calor.

4.1.2. Observación microscópica de cápsula en frotis teñidos por el método de Rojo Congo.

Tabla No. 7 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de rojo congo, de *S. pneumoniae* cultivado en BHI y conservado 40 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
10 Días	Abundantes cocos individuales y escasos diplococos con cápsulas grandes.	Cocos y diplococos con cápsula que doblan sus tamaños.	Cocos y diplococos con cápsulas pequeñas.	Cocos y diplococos con cápsulas de regular tamaño.
20 Días	Cocos y diplococos con escasa cápsula.	Cocos pequeños y escasos diplococos con cápsulas pequeñas.	No se pudo realizar la observación.	Escasos cocos aislados con poca cápsula.
30 Días	Cocos y diplocos, la mayoría sin cápsula.	Cocos y diplococos con muy escasa cápsula.	Escasos cocos y diplococos con cápsula muy pequeña.	Escasos cocos normales con cápsula pequeña.
40 Días	Cocos y escasos diplococos casi sin cápsulas y sin ellas.	Cocos aislados sin cápsula	Cocos aislados escasos con cápsula muy pequeña.	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 8 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de rojo congo, de *S. pneumoniae* cultivado en tioglicolato y conservado 40 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
10 Días	Diplococos abundantes. Cápsulas de mayor tamaño que en el BHI. Cadenas de 3-4 células.	Diplococos y cadenas de 5-6 células. Cápsulas muy grandes.	Cadenas y diplococos con cápsula grandes.	Cocos, diplococos y cadenas con cápsulas grandes.
20 Días	Abundantes diplococos y algunos cocos aislados y cadenas con cápsulas que doblan sus tamaños.	Diplococos y cadenas con escasas cápsulas. Algunos cocos aislados también con cápsula pequeña.	Cocos, diplococos y cadenas con cápsula de regular tamaño.	Cocos, diplococos y tréadas con cápsulas de regular tamaño.
30 Días	Diplococos y cadenas con cápsulas pequeñas	Diplococos y cadenas, la mayoría sin cápsula.	Diplococos y cocos con escasa cápsula.	Escasos cocos y diplococos con escasa cápsula o sin ella.
40 Días	Escasos cocos, diplococos y cadenas con escasas cápsulas y sin ellas.	Escasos cocos con cápsulas pequeñas o sin ellas.	Diplococos y cadenas con muy poca cápsula o sin ella.	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 9 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de rojo congo, de *S. pneumoniae* cultivado en Caldo Soya Tripticaseina y conservado 40 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
10 Días	Diplococos abundantes con cápsulas muy grandes	Abundantes cocos y diplococos con cápsulas de regular tamaño.	Diplococos, cocos y cadenas con escasas cápsulas.	Muestra desecada por calor.
20 Días	Abundantes cocos y escasos diplococos y cadenas con cápsulas grandes.	Cocos y diplococos con muy escasa cápsula.	Diplococos y algunos cocos con escasa cápsula.	Muestra desecada por calor.
30 Días	Escasos cocos y diplococos con cápsulas pequeñas.	Cocos y diplococos con escasa cápsula o sin ella.	Cocos y diplococos con escasa cápsula o sin ella.	Muestra desecada por calor.
40 Días	Escasos cocos y diplococos, casi sin cápsulas y sin ellas.	Muy escasos cocos y diplococos con cápsula muy pequeña o sin ella.	Escasos cocos sin cápsula.	Muestra desecada por calor.

Tabla No. 10 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de rojo congo, de *S. pneumoniae* cultivado en Agar BHI y conservado 40 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
10 Días	Diplococos de tamaño pequeño con cápsulas más o menos al doble de su tamaño.	Cocos y diplococos con cápsula al doble de sus tamaños.	Cocos y diplococos casi sin cápsulas.	Muestra desecada por calor.
20 Días	Cocos y diplococos casi sin cápsula.	Cocos y diplococos con escasa cápsula, algunas cadenas con poca cápsula también.	Abundantes cocos y escasos diplococos con cápsulas muy pequeñas.	Muestra desecada por calor.
30 Días	Cocos con escasa cápsula.	Cocos aislados con muy poca cápsula.	Cocos aislados sin cápsula.	Muestra desecada por calor.
40 Días	Cocos escasos sin cápsula.	Muy escasos cocos sin cápsula.		Muestra desecada por calor.

Tabla No. 11 Observación microscópica de frotis teñidos por el método de rojo congo, de *S. pneumoniae* cultivado en Agar Sangre y conservado 40 días a diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
10 Días	Cocos y diplococos pequeños con cápsulas al doble de sus tamaños.	No se pudo realizar frotis.	Pocos cocos aislados con cápsulas muy escasas. Conglomerados de cocos.	Muestra desecada por calor.
20 Días	Cocos y diplococos con cápsulas pequeñas.	Diplococos, cocos aislados o cadenas de 4-6 miembros con cápsulas muy pequeñas o sin ellas.	Cocos y escasos diplococos con cápsula muy pequeña o sin ella.	Muestra desecada por calor.
30 Días	Cocos con escasa cápsula, se ven conglomerados de células.	Cocos y algunos diplococos con escasa cápsula o sin ella.	Escasos cocos y diplococos con poca cápsula o sin ella.	Muestra desecada por calor.
40 Días	Cocos aislados sin cápsula.	Escasos cocos y diplococos casi sin cápsula o sin ella. Conglomerados de células.	Cocos y diplococos escasos sin cápsula.	Muestra desecada por calor.

4.1.3. Lectura de pH empleando papel indicador.

Tabla No. 12 Lectura de pH con papel indicador, en los cultivos de *S. pneumoniae* a 37° C en 5 diferentes medios de cultivo, a las 24 y 48 hrs.

	24 hrs.	24 hrs.
BHI	5-6	5-6
Tioglicolato	5	5
SC	5	5
Agar BHI	6-7	6-7
Agar sangre	6-7	6-7

Tabla No. 13 Lectura de pH con papel indicador en cultivos de *S. pneumoniae* en caldo BHI y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	5-6	5-6	5-6	5-6
10 Días	5-6	5-6	5-6	5-6
15 Días	5-6	5-6	5-6	5-6
20 Días	5-6	5-6	5-6	5-6
25 días	5-6	5-6	5-6	5-6
30 Días	5-6	5-6	5-6	5
35 Días	5-6	5-6	5-6	--
40 Días	5-6	5-6	5-6	--

Tabla No. 14 Lectura de pH con papel indicador, en cultivos de *S. pneumoniae* en caldo tioglicolato y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	4-5	4-5	4-5	4-5
10 Días	4-5	4-5	4-5	4-5
15 Días	4-5	4-5	4-5	4
20 Días	4-5	4-5	4-5	4
25 días	4-5	4-5	4-5	4
30 Días	4-5	4-5	4	4
35 Días	4-5	4-5	4	--
40 Días	4-5	4-5	4	--

Tabla No. 15 Lectura de pH con papel indicador, en cultivos de *S. pneumoniae* en caldo Soya y Trypticasefna conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	5	5	5	--
10 Días	5	5	5	--
15 Días	5	5	5	--
20 Días	5	5	5	--
25 días	5	5	5	--
30 Días	5	5	5	--
35 Días	5	5	5	--
40 Días	5	5	4-5	--

Tabla No. 16 Lectura de pH con papel indicador, en cultivos de *S. pneumoniae* en Agar BHI y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	6-7	6-7	6-7	--
10 Días	6-7	6-7	6-7	--
15 Días	6	6	6	--
20 Días	6	6	6	--
25 días	6	6	6	--
30 Días	6	6	6	--
35 Días	6	6	6	--
40 Días	6	6	6	--

Tabla No. 17 Lectura de pH con papel indicador, en cultivos de *S. pneumoniae* en Agar Sangre y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	6-7	6-7	6-7	--
10 Días	6-7	se rompió	6-7	--
15 Días	6-7	6-7	6-7	--
20 Días	6-7	6-7	6-7	--
25 días	6-7	6-7	6-7	--
30 Días	6-7	6-7	6-7	--
35 Días	6-7	6-7	6-7	--
40 Días	6-7	contaminado	6-7	--

4.1.4. Lectura de densidad óptica a 600 nm.

Tabla No. 18 Lectura de D.O. a las 24 y 48 h, de cultivos de *S. pneumoniae* a 37° C en 5 diferentes medios de cultivo.

	24 hrs.		24 hrs.	
BHI	22 ¹	0.653	21 ¹	0.663
Tioglicolato	18	0.745	17	0.770
STC	10 ³	0.969	7 ³	1.1115
Agar BHI	6 ¹	1.2045	5 ¹	1.2805
Agar sangre	27 ²	0.561	25	0.602

Tabla No. 19 Lectura de D.O. de *S. pneumoniae* cultivado en caldo BHI y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	%T	4°	Abs.	%T	25°	Abs.	%T	37°	Abs.	%T	55°	Abs.
5 Días	23		0.638	24 ¹		0.6155	23 ²		0.629	17 ³		0.751
10 Días	24 ³		0.6065	27 ²		0.561	23 ³		0.645	24 ²		0.611
15 Días	40 ³		0.3895	46 ²		0.332	43		0.367	49		0.611
20 Días	41 ²		0.382	47		0.328	45 ²		0.342	52 ³		0.278
25 días	41 ³		0.3795	45 ³		0.3395	46 ³		0.330	56 ³		0.247
30 Días	41 ³		0.3795	46		0.337	47		0.328	59 ³		0.226
35 Días	44		0.357	48 ³		0.312	47		0.328	--		--
40 Días	45 ³		0.3395	51		0.292	49 ²		0.305	--		--

Tabla No. 20 Lectura de D.O. de *S. pneumoniae* cultivado en caldo Tioglicolato y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	%T	4°	Abs.	%T	25°	Abs.	%T	37°	Abs.	%T	55°	Abs.
5 Días	17 ³		0.751	16 ²		0.782	16 ³		0.776	7 ³		1.1115
10 Días	18 ¹		0.739	16 ²		0.782	16		0.796	10 ¹		0.9895
15 Días	32 ³		0.485	32 ¹		0.4915	27 ³		0.557	26 ²		0.9895
20 Días	32		0.495	31		0.509	30		0.523	41 ¹		0.3845
25 días	32 ¹		0.4915	30 ²		0.516	30		0.523	52 ³		0.282
30 Días	32		0.495	31 ¹		0.5055	30 ²		0.516	59 ³		0.226
35 Días	32		0.495	32 ¹		0.4915	32 ¹		0.4915	--		--
40 Días	33 ³		0.472	32		0.495	32		0.495	--		--

Tabla No. 21 Lectura de D.O. de *S. pneumoniae* cultivado en Caldo Soya Tripticaseina y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	%T	4°	Abs.	%T	25°	Abs.	%T	37°	Abs.	%T	55°	Abs.
5 Días	9 ²		1.022	9 ²		1.022	9 ¹		1.034	--		--
10 Días	9 ¹		1.034	9 ¹		1.034	9		10.46	--		--
15 Días	30 ¹		0.5195	29 ¹		0.534	29 ²		0.530	--		--
20 Días	29		0.538	30		0.523	29 ²		0.530	--		--
25 días	29		0.538	29 ³		0.5265	29 ³		0.5265	--		--
30 Días	28 ³		0.5415	28 ¹		0.549	29 ¹		0.534	--		--
35 Días	28 ³		0.5415	30 ¹		0.5195	29 ²		0.530	--		--
40 Días	31 ³		0.4985	31		0.509	30 ²		0.516	--		--

Tabla No. 22 Lectura de D.O. de *S. pneumoniae* cultivado en Agar BHI y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	%T	4°	Abs.	%T	25°	Abs.	%T	37°	Abs.	%T	55°	Abs.
5 Días	5 ³		1.241	5		1.301	4 ¹		1.3725	--		--
10 Días	5 ¹		1.2805	5		1.301	5 ³		0.241	--		--
15 Días	4 ³		1.324	6 ¹		1.2045	6 ³		1.171	--		--
20 Días	21 ¹		0.673	21 ³		0.663	22 ³		0.643	--		--
25 días	21		0.678	22		0.658	22 ³		0.643	--		--
30 Días	21		0.678	22 ¹		0.648	22 ²		0.648	--		--
35 Días	22 ¹		0.653	26		0.585	24 ¹		0.6155	--		--
40 Días	21 ³		0.665	25 ³		0.5895	25		0.602	--		--

Tabla No. 23 Lectura de D.O. de *S. pneumoniae* cultivado en Agar Sangre y conservado durante 40 días en diferentes temperaturas.

	%T	4°	Abs.	%T	25°	Abs.	%T	37°	Abs.	%T	55°	Abs.
5 Días	24 ³		0.6065	24 ²		0.611	24 ³		0.6065	--		--
10 Días	24 ²		0.611	--		--	23 ³		0.6245	--		--
15 Días	30 ¹		0.5195	34 ¹		0.4655	40		0.398	--		--
20 Días	32 ¹		0.488	43		0.367	46		0.337	--		--
25 días	33		0.482	47		0.328	47		0.328	--		--
30 Días	33		0.482	39		0.310	47		0.328	--		--
35 Días	33		0.482	48		0.319	48 ¹		0.3165	--		--
40 Días	35		0.456	--		--	48		0.316	--		--

4.1.5. Cálculo del número aproximado de bacterias (ver anexo)

Tabla No. 24 Número aproximado de bacterias ($\times 10^6$), de cultivos de *S. pneumoniae* en diferentes medios de cultivo a las 24 y 48 hrs.

	24 hrs.	24 hrs.
BHI	1575	1605
Tioglicolato	1815	1875
STC	2355	2685
Agar BHI	2910	+ de 3000
Agar sangre	1365	1455

Tabla No. 25 Número aproximado de bacterias ($\times 10^6$), de cultivos de *S. pneumoniae* en caldo BHI y conservados 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	1560	1500	1530	1815
10 Días	1485	1365	1500	1485
15 Días	945	810	900	750
20 Días	930	810	825	690
25 días	930	825	810	615
30 Días	930	825	810	570
35 Días	885	750	810	--
40 Días	825	705	750	--

Tabla No. 26 Número aproximado de bacterias ($\times 10^6$), de cultivos de *S. pneumoniae* en caldo Tioglicolato y conservados 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	1815	1890	1890	2685
10 Días	1800	1890	1935	2400
15 Días	1200	1200	1365	1410
20 Días	1215	1245	1260	930
25 días	1200	1260	1260	690
30 Días	1215	01245	1260	570
35 Días	1215	1200	1200	--
40 Días	1140	1215	1215	--

Tabla No. 27 Número aproximado de bacterias ($\times 10^6$), de cultivos de *S. pneumoniae* en caldo de Soya tripticasa y conservados 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	2475	2475	2490	--
10 Días	2505	2505	2550	--
15 Días	1260	1305	1290	--
20 Días	1305	1260	1290	--
25 días	1305	1290	1290	--
30 Días	1305	1335	1290	--
35 Días	1305	1260	1290	--
40 Días	1215	1245	1290	--

Tabla No. 28 Número aproximado de bacterias ($\times 10^6$), de cultivos de *S. pneumoniae* en Agar BHI y conservados 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	3000	+ de 3000	+ de 3000	--
10 Días	+ de 3000	+ de 3000	3000	--
15 Días	+ de 3000	2910	2835	--
20 Días	1620	1605	1560	--
25 días	1650	1560	1560	--
30 Días	1650	1575	1575	--
35 Días	1575	1410	1500	--
40 Días	1505	1440	1455	--

Tabla No. 29 Número aproximado de bacterias ($\times 10^6$), de cultivos de *S. pneumoniae* en Agar Sangre y conservados 40 días en diferentes temperaturas.

	4°	25°	37°	55°
5 Días	1485	1485	1485	--
10 Días	1485	--	1500	--
15 Días	1260	1140	975	--
20 Días	1200	900	825	--
25 días	1170	810	810	--
30 Días	1170	750	810	--
35 Días	1170	780	780	--
40 Días	1125	--	780	--

4.1.6. Lectura de resiembras, cada 10 días, de *S. pneumoniae* en diferentes medios, conservados a diferentes temperaturas durante 40 días.

Tabla No. 30 Lectura del crecimiento de *S. pneumoniae* en resiembras del mismo a los 10, 20, 30 y 40 días de conservación a diferentes temperaturas.

BHI	4°	25°	37°	55°
10 Días	+++	+++	+++	++
20 Días	++	++	++	+
30 Días	++	++	+	(-)
40 Días	++	+	+	---
Tioglicolato				
10 Días	++++	++++	++++	++
20 Días	++	+++	+++	+
30 Días	+	+++	++	(-)
40 Días	+	+++	++	---
Caldo Soya Trypticaseína				
10 Días	++++	++++	++++	---
20 Días	+++	+++	+++	---
30 Días	++	+++	++	---
40 Días	+	+++	+	---

Continúa...

Continuación de tabla No. 30

ABHI	4°	25°	37°	55°
10 Días	+++	+++	+++	---
20 Días	++	+	+	---
30 Días	+	+	(-)	---
40 Días	(-)	(-)	(-)	---
AS				
10 Días	+++	---	+++	---
20 Días	+	+	+	---
30 Días	+	+	(-)	---
40 Días	(-)	(-)	(-)	---

Menos de 10 colonias +

De 10 a 100 Colonias ++

De 101 a 200 Colonias +++

De 201 a incontables Colonias ++++

4.2. Ensayo de la autolisina neumocócica obtenida

4.2.1. Actividad Hemolítica de la autolisina.

Tabla No. 31 Lectura de la absorbancia de la enzima a diferentes diluciones para encontrar el % de hemólisis.

Dilución Autolisina	Absorbancia	% Hemólisis
1:2	1.824	91
1:4	1.55	58
1:8	0.688	34
1:16	0.395	20
1:32	0.226	10
1:64	0.155	7
1:128	0.122	6
1:256	0.111	5
1:512	0.108	5

Nota: para % hemólisis ver anexo.

4.2.2. Actividad Autolítica de la autolisina.

Tabla No. 32 Lectura de Absorbancia a 500 nm de una serie de tubos conteniendo 3 ml de una suspensión de neumococos con una D.O. inicial de 0.64 unidades de absorbancia mezclados con diferentes cantidades de autolisina.

ml enzima	Absorbancia a los 10 min	decremento de la D.O. unidades de absorb.
0.1	0.573	0.067
0.2	0.565	0.07
0.3	0.553	0.09
0.4	0.534	0.109
0.5	0.519	0.1235
1.0	0.4915	0.1485

4.2.3. Especificidad de la Autolisina

Tabla No. 33 Lectura de la disminución de la turbidez de suspensiones de diferentes estreptococos frente a la autolisina neumocócica.

Cepa Probada	Decremento visible de la Turbidez		
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3
<i>S. pneumoniae</i>	(-)	(+)	(-)
<i>S. mutans</i>	(+)	(-)	(-)
<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)
<i>S. sanguis</i>	(-)	(-)	(-)
<i>S. faecalis</i>	(-)	(-)	(-)
<i>S. salivarius</i>	(-)	(-)	(-)

Tabla No. 34 Sensibilidad de diferentes cepas de estreptococos frente a discos impregnados con autolisina neumocócica.

Cepa Probada	Decremento visible de la Turbidez		Zona de Hemólisis	
	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 1	Prueba 2
<i>S. pneumoniae</i>	(+) 10mm	(+) 5mm.	Se Observaron zonas de alfa-hemólisis alrededor de los discos de aproximadamente 7 a 8 mm. de diámetro. Esta característica fue constante para todas la muestras	
<i>S. mutans</i>	(-)	(+) 5mm.		
<i>S. pyogenes</i>	(-)	(+) 5mm.		
<i>S. sanguis</i>	(-)	(-)		
<i>S. faecalis</i>	(-)	(-)		
<i>S. salivarius</i>	(-)	(-)		

Table No. 35 Sensibilidad de diferentes cepas de estreptococos frente a discos impregnados con autolisina neumocócica en ausencia y en presencia de CO₂

Cepa Probada	Aerobiosis		Atmósfera de CO ₂	
	Halo de Inhibición	Zona de Hemólisis	Halo de Inhibición	Zona de Hemólisis
<i>S. pneumoniae</i>	(-)	Zonas de hemólisis alrededor de los discos de aproximadamente 8mm. de diámetro para todas las muestras	0.6 mm.	Zonas de hemólisis de aproximadamente 8 mm. de diámetro alrededor de todos los discos.
<i>S. mutans</i>	(-)		0.6 mm.	
<i>S. pyogenes</i>	(-)		0.6 mm.	
<i>S. sanguis</i>	(-)		0.45 mm.	
<i>S. faecalis</i>	(-)		(-)	
<i>S. salivarius</i>	(-)		(-)	

Tabla No. 36 Sensibilidad comparativa de diferentes cepas de estreptococos frente a optoquina, bacitracina y autolisina neumocócica en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

Cepa Probada	Optoquina		Bacitracina		Autolisina	
	Aerob.	Anaerob.	Aerob.	Anaerob.	Aerob.	Anaerob.
<i>S. pneumoniae</i>	6.5 mm.	6.5 mm.	9.5 mm.	9.5 mm.	6.5 mm.	9 mm.
<i>S. mutans</i>	6.5 mm.	7.0 mm.	7.0 mm.	8.0 mm.	(-)	9 mm.
<i>S. pyogenes</i>	(-)	(-)	(-)	9.5 mm.	(-)	9 mm.
<i>S. sanguis</i>	(-)	9 mm.	9 mm.	(-)	7 mm.	8 mm.
<i>S. faecalis</i>	(-)	(-)	(-)	7 mm.	(-)	(-)
<i>S. salivarius</i>	(-)	7.5 mm.	7.5 mm.	8 mm.	(-)	9 mm.

Capítulo 5

Análisis de los resultados

En el presente trabajo se planteó el aspecto de la conservación de la cepa de *Streptococcus pneumoniae* debido a que siendo una bacteria exigente, causa problemas en los ceparios bacteriológicos; para dicho estudio se emplearon los medios de cultivo más comunmente reportados en la bibliografía, incluyendo tanto medios líquidos como sólidos y así poder encontrar el óptimo para su conservación.

Con fines de estandarización del método, se hizo necesaria una fase inicial de obtención de la cepa en los diferentes medios empleados, en la cual se midieron y observaron los mismos parámetros que en la fase de conservación (Tablas 1, 12, 18 y 24).

De manera general, se consideran como fuente de error los siguientes puntos:

- i) Por falta de material, algunos de los tubos usados no contaron con tapón de rosca, lo que dió como resultado la pérdida de los cultivos, por desecación a la temperatura de conservación más elevada y, en consecuencia, igualmente la pérdida de algunos de los datos de la información total recabada.
- ii) La temperatura de conservación a 55° C se eligió con la intención de mantener inactiva a la enzima autolítica, pero resultó ser excesiva, dando algunos resultados falsos en el número aproximado de bacterias, además de causar la desecación antes mencionada.
- iii) El empleo de papel indicador de pH dió como resultado la obtención de datos poco precisos; aunque era obvio que esto sucedería, se prefirió su uso al de un potenciómetro debido a que se trataba de cultivos biológicamente activos.

A lo largo del período de 40 días de conservación de la cepa y dentro de la observación microscópica tanto de Gram como de cápsula en los diferentes medios

de cultivo, así como de las diferentes temperaturas de conservación estudiadas, se lograron ver muchas de las características de los neumococos reportadas por diferentes autores, así como variaciones del Gram y anomalías en las células al envejecer los cultivos.

En los cultivos en Caldo BHI se observaron de manera preponderante los cocos aislados y los pares de cocos, sin que este tipo de agrupación fuera modificado por la temperatura de conservación; por otro lado, aunque inicialmente se observaron cápsulas de gran tamaño a 4° y 25° C, éstas desaparecieron alrededor de los 20 días y a 37° y 55° C, aún desde los primeros 10 días no se favoreció la formación de la misma. Se observaron anomalías celulares entre los 25 y 35 días en los medios conservados a 4° y 25° C y en las temperaturas más elevadas (37° y 55° C) esto sucedió desde los primeros 5 días.

Se realizaron frotis de los cultivos en Caldo Tioglicolato, en los que se observó la agrupación característica de diplococos y también se observaron células lanceoladas; igualmente se favoreció la formación de cápsulas de gran tamaño en este medio, pero alrededor de los 20 días empezaron a disminuir de tamaño y a desaparecer sin importar cual fuese la temperatura de conservación.

Se empezaron a observar anomalías de morfología y Gram en los frotis realizados a los 15 días para los cultivos guardados a 4°, 25° y 37° C y desde los 5 días para los conservados a 55° C.

En los frotis hechos a partir de los cultivos en Caldo Soya Tripticasa + carne fresca aunque se observó la agrupación típica de diplococos, casi no se vieron células lanceoladas, observándose además cadenas de 4-8 células; la presencia y tamaño de las cápsulas también se favorecieron en este medio, pero tendieron a hacerse pequeñas e, inclusive, a desaparecer entre los 20 y 30 días.

Se observaron anomalías morfológicas y de Gram a partir de los primeros 15 días de conservación a 4°, 25° y 37° C, las muestras conservadas a 55° C se secaron desde los primeros 5 días.

Las células observadas en los frotis de los cultivos en Agar BHI no presentaron anomalías morfológicas ni de Gram a lo largo del período que duró este estudio.

Se observaron cocos aislados principalmente y en mucho menor proporción diplococos y cadenas de 6-8 células. No se favoreció la formación de cápsula y las pocas que se observaron eran pequeñas y desaparecieron entre los 10 y 20 días.

Otro de los medios sólidos empleados, el Agar Sangre, también mostró de manera predominante cocos aislados y en menor proporción diplococos y cadenas de 3-4 células, siendo estas últimas mucho más cortas que las observadas en Agar BHI y, por el contrario, la escasa presencia de cápsula y la ausencia de anomalías celulares fueron semejantes en los dos medios sólidos.

Con respecto a las lecturas de pH, se puede notar que todos los medios estudiados sufrieron un decremento del mismo a las 24 h, en la fase de obtención de la cepa, ya que el pH original en todos los medios fué de 7 y al efectuarse la primera lectura, a las 24 h, se registró un descenso significativo de este parámetro en todos los medios (Tabla No. 12), los cuales se mantuvieron casi constantes durante la serie de lecturas hechas periódicamente a lo largo de 40 días, únicamente el Caldo Tioglicolato y el Caldo Soya Tripticasa + carne variaron pero en forma mínima alrededor de los 25 días (Tablas 13-17), siendo estos mismos medios los que registraron el cambio de pH más marcado en la primera lectura.

Las lecturas de la D.O. de los cultivos se hicieron con la finalidad de calcular el número aproximado de bacterias con la ayuda del nefelómetro de MacFarland (Anexo).

Del cálculo de estos números, se encuentra que el mayor número de bacterias se obtuvo en los cultivos en Agar BHI tanto en la fase de obtención, como en la fase de conservación en las diferentes temperaturas, siguiéndole en rendimiento el Caldo Soya Tripticasa + carne y en tercer lugar el Caldo Tioglicolato; el Caldo BHI y el Agar Sangre fueron los medios que dieron los rendimientos más bajos. Aunque el Agar BHI mantuvo hasta el final el mayor número de bacterias, la diferencia entre las cuentas iniciales y finales también fué la mayor, siendo el Caldo Tioglicolato el que dió la diferencia menos notable. Por otro lado, se vió que los tres medios líquidos estudiados tuvieron un descenso significativo de este parámetro entre el décimo y el décimo quinto día y que los dos medios sólidos registraron este descenso entre el décimo quinto y el vigésimo día.

El resultado de las resiembras efectuadas a los cultivos en los diferentes medios a distintas temperaturas, indica que los medios que mantuvieron el mayor número de células viables hasta el final del trabajo fueron, primeramente, el Caldo Soya Tripticasa + carne, seguido del Caldo Tioglicolato.

Con respecto a la segunda parte de este trabajo, que fué la obtención y ensayo de la autolisina de *Streptococcus pneumoniae*, se puede decir lo siguiente:

- Se escogió el Caldo Tioglicolato como fuente de obtención de la masa celular necesaria para extraer la enzima, a pesar de que el Caldo Soya Tripticasa fué el medio que resultó ser el óptimo para la conservación de los neumococos, ya que que este segundo contenía pedacitos de carne, lo cual habría interferido con la técnica de obtención de la enzima, pues difícilmente se habría podido eliminar la carne sin perder gran cantidad de células.
- La obtención de la enzima se llevó a cabo por triplicado según el método descrito por L. Howard (13). En la primera ocasión se logró un rendimiento mínimo y a este producto se le hicieron dos pruebas de especificidad, una en caja y otra en tubo, la primera se hizo de manera similar a las pruebas de sensibilidad a optoquina o bacitracina y se logró ver un halo de inhibición de *S. pneumoniae* frente a la enzima obtenida y la segunda prueba se hizo de manera similar a la prueba de solubilidad en bilis, colocándose la enzima obtenida en presencia de diferentes cepas de estreptococos y en esta prueba se observó una disminución de la turbidez en el tubo que contenía *S. mutans* (Tablas No. 33 y 34).
- En el producto obtenido la segunda ocasión se lograron hacer las mismas pruebas que la primera ocasión, pero de la prueba en caja además de observarse el halo de inhibición frente a *S. pneumoniae* también se vió inhibición de otras cepas de estreptococos frente a la enzima obtenida (Tabla No. 34) y la prueba en tubo también dió un resultado diferente a la primera ocasión (Tabla No. 33).
- Considerando la variabilidad de los resultados de las dos primeras veces, se consideró necesario obtener la enzima por tercera ocasión y con la intención

de lograr un producto de mejor calidad se hizo una ligera variación al método, introduciéndose el uso de la vibración ultrasónica descrito por Shumway y Klebanoff⁽²⁷⁾ para romper las células en lugar de la incubación con amortiguador de fosfatos por 1 h a 37° C, además el producto obtenido fué sometido a liofilización con la finalidad de concentrarlo. A este producto se le hicieron las mismas prueba que a los dos primeros productos obtenidos además de otras; las pruebas de inhibición frente a diferente estreptococos se realizaron de manera paralela con el producto de la segunda obtención, con la finalidad de comparar los productos.

- Una de las pruebas adicionales hechas al tercer producto obtenido fué una prueba de autólisis descrita por L. Howard⁽¹³⁾, quien define a una unidad de enzima como la cantidad de ésta que es capaz de causar un decremento de 0.1 unidades de D.O. en un intervalo de 10 min. Se encontró que el producto obtenido en el presente trabajo causaba dicho decremento con 4 ml (Tabla No. 32).
- Otra de las pruebas realizadas a este tercer producto y que no se le hicieron a los dos primeros fué su capacidad hemolítica según el método descrito por M.K. Johnson⁽¹⁵⁾, encontrándose que el 50% de hemólisis se encuentra en la dilución 1:4 (Tabla No. 31).
- Se realizó otra prueba en caja para este tercer producto en la cual de incubaron las cajas en atmósfera de CO₂ para ver si había alguna modificación en los resultados, encontrándose que efectivamente se activa o incrementa la capacidad autolítica de la enzima en presencia de CO₂ (Tabla No. 35).
- Considerando el resultado anterior se decidió hacer una prueba más en caja, en esta prueba se crearon condiciones estrictas de anaerobiosis (método del pirogalol) y además se probaron de manera simultánea discos comerciales de optoquina y bacitracina junto con los discos preparados con autolisina, encontrándose que para la gran mayoría de las cepas probadas, la autolisina aumentó su capacidad de inhibición en condiciones estrictas de anaerobiosis, cosa que no ocurrió, de manera general, para los discos con optoquina y bacitracina.

Uno de los objetivos del presente trabajo fué ver si la autolisina era específica para *Streptococcus pneumoniae*, para lo cual se hicieron las pruebas en tubo y en caja, previamente descritas. Los discos empleados se prepararon en el laboratorio cortando discos de papel filtro de 4 mm de diámetro los cuales se esterilizaron y en el momento de usarse se impregnaron de autolisina con la ayuda de una pinza flameada.

Aunque solamente se hizo la prueba de hemólisis al tercer producto, siguiendo una metodología descrita, cabe señalar que en todas las pruebas hechas en caja se observó la capacidad hemolítica del producto al existir zonas de hemólisis alrededor de los discos impregnados con autolisina de manera constante.

De lo anterior podemos concluir que el producto obtenido es una enzima con capacidad hemolítica y autolítica pero esta última propiedad se ve afectada por la presencia de oxígeno, es decir que la enzima se inactiva parcialmente; o bien, podría tratarse de una mezcla de enzimas que actúan por separado, una con capacidad hemolítica y otra con capacidad autolítica.

Capítulo 6

Conclusiones

1. La mejor temperatura a la cual se conservan viables las cepas de *Streptococcus pneumoniae* es a 25°C ó a temperatura ambiente hasta por 30 ó 40 días.
2. De los medios estudiados, se consideran óptimos para la conservación de cepas de *Streptococcus pneumoniae* el Caldo Tioglicolato y el Caldo Soya Trypticasa adicionado de carne fresca y a una concentración final de 2.5% de dextrosa.
3. Aunque los medios sólidos dieron lugar al menor número colonias posteriores a las resiembras, las células en estos medios no presentaron variaciones morfológicas ni de Gram.
4. El pH no es un parámetro que afecte la viabilidad de las cepas de *Streptococcus pneumoniae*.
5. El producto obtenido a partir de la masa celular de *Streptococcus pneumoniae* posee tanto actividad hemolítica como autolítica.
6. El producto obtenido a partir de la masa celular de neumococos es parcialmente oxigenolábil, ya que su actividad autolítica se potenció o se activó en algunos casos, en condiciones de anaerobiosis estricta.
7. El producto obtenido a partir de *Streptococcus pneumoniae* conserva sus propiedades hemolíticas y autolíticas aún después de 5 meses.

8. El producto obtenido a partir de *Streptococcus pneumoniae* resiste temperaturas de congelación sin modificar sus propiedades hemolíticas y autolíticas.
9. La autolisina de *Streptococcus pneumoniae* no funciona como reactivo diagnóstico debido a su falta de especificidad y a la falta de reproducibilidad en los resultados.

Anexo

1. Preparación de Medios de Cultivo

Todos los medios de cultivo empleados se prepararon a partir de medios de cultivo deshidratados formulados por Bioxon y todos los tubos se prepararon con 7 ml de cada medio.

- Caldo BHI: Se suspenden 37 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada y se calienta ligeramente, si es necesario.
- Se esteriliza a 121° C (15 lb) durante 15 min.
- Caldo Tioglicolato: Se suspenden 28.5 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada, se mezcla bien. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve hasta disolución. Se esteriliza a 121° C (15 lb) durante 18 min. De preferencia se prepara el mismo día que se va a usar porque se oxida fácilmente.
- Caldo de Soya Trypticasefna + carne fresca + dextrosa 2.5%: Se suspenden 30 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada. Se mezcla bien. Se calienta hasta lograr la disolución. Se esteriliza de 118 a 121° C (pero no más de 15 lb de presión) durante 15 min.

Antes de distribuir en los tubos se adicionó dextrosa a una concentración final de 2.5%, se hizo la distribución y con la ayuda de una espátula curva se agregó a cada tubo una pequeña porción de carne fresca seca, la cual se preparó previamente picando lo más finamente posible carne de res libre de grasa y metiéndose a secar a una estufa a 45° C por aproximadamente 2 h.

- Agar BHI: Se suspenden 52 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada. Se remoja de 10 a 15 min. Se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante 1 min. Se esteriliza a 121° C (15lb) durante 15 min.

- **Agar Sangre:** Se suspenden 40 g del medio deshidratado en 1000 ml de agua destilada. Se remoja entre 10 y 15 min. Se hierve durante 1 min. Se esteriliza a 121° C (15 lb) durante 15 min. Se enfría a 45-50° C y se añade de 5-10% de sangre desfibrinada estéril.

Se llevó a cabo la distribución del medio en los tubos antes de esterilizarlos. Se enfriaron a la temperatura indicada y se adicionaron 0.5 ml de sangre de carnero a cada tubo, en condiciones de esterilidad.

2. Nefelómetro de MacFarland

Se prepararon una serie de tubos de acuerdo con la siguiente tabla y se leyó la D.O. a 510 nm

BaCl ₂ (ml)	H ₂ SO ₄ (ml)	Número Aproximado de Bacterias (X10 ⁶)	Absorbancia
0.05	9.95	150	0.0645
0.10	9.90	300	0.134
0.15	9.85	450	0.204
0.20	9.80	600	0.235
0.25	9.75	750	0.284
0.30	9.70	900	0.3645
0.35	9.65	1050	0.444
0.40	9.60	1200	0.485
0.45	9.55	1350	0.565
0.50	9.50	1500	0.581
0.55	9.45	1650	0.688
0.60	9.40	1800	0.745
0.65	9.35	1950	0.824
0.70	9.30	2100	0.846
0.74	9.25	2250	0.912

Se graficaron los resultados para poder calcular el Número Aproximado de Bacterias de los cultivos de *Streptococcus pneumoniae*.

3. Preparación de Soluciones Amortiguadoras

Fosfato de Sodio 0.2 M, pH 6

119.99 g de NaH_2PO_4 _____ 1.0 M

23.99 g de NaH_2PO_4 _____ 0.2 M

141.95 g de Na_2HPO_4 _____ 1.0 M

28.39 g de Na_2HPO_4 _____ 0.2 M

Fosfato de Sodio 0.01 M, pH 6

138.0 g de NaH_2PO_4 _____ 1.0 M

1.380 g de NaH_2PO_4 _____ 0.01M

141.95 g de Na_2HPO_4 _____ .0 M

1.4195 g de Na_2HPO_4 _____ 0.01

4. Curva de Hemólisis

Se prepararon una serie de tubos de la siguiente manera para obtener la curva de hemólisis necesaria y así encontrar los % de hemólisis correspondientes a la enzima obtenida a partir de *S. pneumoniae*. Se leyó la D.O. a 541 nm contra un blanco de Solución Salina.

Susp. Erit. 3% (ml)	Sol. Salina (ml)	Agua (ml)	Hemólisis (%)	D.O.
3.0	—	3	100	1.912
2.25	0.75	3	75	1.3725
1.5	1.5	3	50	1.000
0.75	2.25	3	25	0.663
0	3.0	—	0	—

Capítulo 9

Bibliografía

1. Ausina V., M. Luquin; "Avances en el Diagnóstico Etiológico de las Infecciones Pulmonares"; *Medicine* 37/I, 2495-2508 (1992)
2. Bioxon Manual
MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS DIAGNÓSTICOS
3. Buchanan R.E. & N.E. Gibbons Editores
BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY
8th. Edition. Edit. Board (Waverly Press Inc.)
U.S.A. 1979
4. Calderon J.E. "Infecciones por *Streptococcus pneumoniae*"; *Infectología* II/4, Editorial (1982).
5. Cowan, S.T., K.J. Steel
MANUAL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE
BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA
2a. Edición
CECSA (Cia. Edit. Continental, S.A.)
México, D.F. (1982).
6. Daguet G.L. y Col.
EXÁMENES DE LABORATORIO, TÉCNICAS EN BACTERIOLOGÍA.
Tomo I, Aerobios
1a. edición, Edit. Jims
Barcelona, España. (1977).

7. Davis B.D., R. Dulbeco. H. Eisen; H.S. Ginsberg & R. Austrian
TRATADO DE MICROBIOLOGÍA
Capítulo 27
3a. Edición
Salvat Editores. (1980)
8. DIFCO Manual, 10th Ed. U.S.A. (1984).
9. Freeman, B.A. y Col.
TRATADO DE MICROBIOLOGÍA DE BURROWS
Capítulos "Los Estreptococos"
22a. edición. Edit. Interamericana
México (1985)
10. Garza V.R., E. Peniche Q.; "Los Tres Principales Agentes Etiológicos de Otitis Media Bacteriana"; Lab-acta 2/3 39-42 (1990).
11. Ghuyssen J.M., D.J. Tipper and J.L. Strominger
"ENZYMES THAT DEGRADE BACTERIAL CELL WALLS
IN METHODS IN ENZYMOLOGY"
vol. 8. S.P.
Colowick and N.A. Kaplan (ed),
U.S.A. (1966)
12. González Ch. A., O.Mtz.; "Infecciones en el Paciente con Enfermedad Pulmonar Crónica"; Medicine: 41/V; 2703-2709 (1992).
13. Howard L.V. and H. Gooder; "Specificity of the Autolysin of *Streptococcus pneumoniae*"; J. Bacteriol; 117/2; 796-804; (1974).
14. Jawetz E., J.L. Melnide, E.A. Adelbery
MICROBIOLOGÍA MÉDICA
13a. edición
Editorial El Manual Moderno
México (1990).

15. Johnson M.K.; "Properties of Purified Pneumococcal hemolysin"; *Infect. & Immunit.* 6/5; 755-760 (1972).
16. Kumate J. y G. Gutiérrez
MANUAL DE INFECTOLOGÍA
11a. edición.
Francisco Cervantes Editor
México, (1988)
17. Lennette, E.H., A. Balows. W.J. Hausler y H.J. Shadomy
MANUAL DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
4a. edición
Editorial Médica Panamericana
Buenos Aires. (1987)
18. Mosser J.L., and A. Tomaz; "Choline-containing Theichoic Acid as a Structural Componen of Pneumococcal Cell Wall and its Role in Sensitivity to Lysis by and Autolytic Enzyme", *J. Biol. Chem.* 245/2: 287-298 (1970).
19. Raju, L., V. Patel; "Infecciones Pulmonares en Ancianos"; *Infectología* 9/10: 639-646 (1989).
20. Shumway CN., and S.J. Klebanoff; "Purification of Pneumolysin", *Infec. & Immunit:* 4/4: 388-392 (1971).
21. Volk W.A., D.C. Benjamin, R.J. Kadner y J.T. Parsons
MICROBIOLOGÍA MÉDICA
3a. edición
Editorial Interamericana
México (1988)