

UNIVERSIDAD LABASTIDA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Ciencias Químicas

EXPERIMENTOS SOBRE EL PAPEL DE LA
COAGULASA EN LA PATOGENICIDAD
DE LOS ESTAFILOCOCOS

T E S I S

QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE QUIMICO
FARMACEUTICO BIOLOGO PRESENTA
LA SEÑORITA

María Esperanza Mireles del Campo

DIRECTOR DE TESIS:

MANUEL A. RODRIGUEZ, Q. F. B. MSc.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A mis queridos padres
Sr. Pascual Mireles Treviño
y Sra. Isabel del Campo de Mireles

A mis Hermanos

A mi novio Luis Ricardo

A la memoria del Rvdo. Padre Mons.
Don Enrique Tomás Lozano

A las Rvdas. Madres Hijas de
María Inmaculada de Guadalupe

A mis Maestros

Al Sr. Manuel A. Rodríguez, Q. F. B. MSc.

A mis compañeras

A mis amigas

Este trabajo fué realizado en los laboratorios del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nuevo León, siendo dirigido y supervisado por el Sr. Manuel A. Rodríguez, Q. F. B. MSc.

INTRODUCCION

Una de las bacterias que se han estudiado con más intensidad debido a su ubicuidad y a la habilidad que tiene de producir numerosos cuadros clínicos es *Staphylococcus pyogenes*. Este germen ha adquirido en tiempos recientes gran notoriedad debido a que la incidencia de infecciones causadas por él, ha ido incrementando notablemente; esto se debe fundamentalmente, a la era de los antibióticos (1, 2, 3), los cuales han afectado profundamente el balance microbiano sobre todo en comunidades hospitalarias (4, 5, 6), originado por la supresión de gérmenes susceptibles a estos agentes y seleccionando las mutantes resistentes que se perpetúan en la población, sirviendo estos portadores crónicos de reservorios para nuevos susceptibles a través de infección cruzada (7, 8, 9, 10, 11, 12).

Los estafilococos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y no es difícil encontrárseles en la piel y cavidades abiertas del hombre donde habita como un comensal y en balance armonioso con los otros gérmenes que forman parte de la ecología de cada lugar. Sin embargo, desde hace muchos años, se reconoce que existe una variedad de estafilococos que tiene propiedades muy particulares que la diferencian de otros estafilococos y que permiten a los primeros, invadir los tejidos del huésped, lesionándolos. Si se estudian los productos

generados por estos gérmenes patógenos, se notará que difieren en muchos aspectos metabólicos de sus congéneres saprofitos (13); por ejemplo, se sabe que estos estafilococos patógenos producen un pigmento dorado del cual se deriva el nombre de *Staphylococcus aureus* para diferenciarlo de sus compañeros saprofitos que no producen pigmento y que se les denominó *Staphylococcus albus*. Las cepas aureus, que son consideradas como patógenas debido a la producción de este pigmento y que siempre se aislaban de lesiones, producen una exotoxina termolábil y necrotóxica (14, 15); producen también cuatro hemolisinas en distintas proporciones, de las cuales la alfa toxina que hemoliza los glóbulos rojos del conejo y que probablemente sea idéntica a la exotoxina, guarda una muy buena relación con el poder patógeno del germen; ésta no está presente en los filtrados de las cepas saprofitas. Además las cepas patógenas producen otros factores agresivos que están casi siempre ausentes en las no patógenas, tales como leucocidinas, hialuronidasa, una fibrinolisisina y una enterotoxina. Las cepas patógenas también tienen la propiedad de fermentar el manitol, licuar la gelatina y producir una enzima capaz de coagular el plasma de algunas especies (hombre, conejo, perro, caballo, etc.) (16, 17). Una revisión muy completa de los factores que determinan la patogenicidad de estafilococos, fué hecha por Blair (18).

En encuestas hechas con el objeto de determinar si un estafilococo aislado de una lesión o de una región tiene potencialidades patógenas se ha ensayado la investigación de algunos de estos productos metabólicos con el objeto de diferenciar entre una cepa potencialmente patógena de una saprofita. Así pues, han aparecido a través del tiempo, diferentes criterios y se ha puesto de moda, tomar a la producción de pigmento, la fermentación de manitol, la producción de alfa hemolisina, la licuefacción de la gelatina y quizá la más reciente y casi universalmente aceptada, la formación de coaguleasa (19).

Estudios realizados por diversos autores: (Mueh, 1908; Darányi, 1925, 1926, 1927; Grosz, 1927, 1928, 1931; Calissano,

1927) (20) han demostrado que la producción de coagulasa guarda una estrecha relación con la propiedad de este germen de producir lesiones y por lo tanto, no es extraño que, en vista de esta excelente correlación, diversos investigadores le hayan atribuido un papel preponderante en la iniciación o en la producción de lesiones o en otras palabras, que es el factor más importante que permite al estafilococo ser patógeno. Mucho esfuerzo se ha hecho para asociar a la coagulasa con la patogenicidad de los estafilococos. Dejeune en 1898 (21), fue el primero en relacionar la coagulasa producida por estafilococos con las lesiones tromboticas venosas; los trabajos de Gross en 1932 y 1933 (22) y de Fisher en 1936 (23), versaron sobre problemas de coagulación "in vivo" llevadas a cabo por esta enzima. Los trabajos de Hale y Smith en 1945 (24), relacionándolos con las diferencias observadas en fagocitosis de cepas productoras y no productoras de coagulasa, demostraron que la producción de coagulasa determinaba la fagocitosis de los mismos, mientras que los coagulasa negativa, en vista de no ser protegidos por una red de fibrina, eran fácilmente fagocitados y destruidos; esto fue comprobado al descubrir que existía un factor en los animales cuyo plasma era coagulable por la enzima llamado factor reactivo del plasma, mientras que en los animales cuyo plasma no contenía este factor y por lo tanto no era coagulable, esto no sucedía y eran muy resistentes a la infección estafilocócica. El mismo otro método de estudio, Kksed y Nungester (25) demostraron que la enzima purificada era capaz de producir el bloqueoamiento de otro factor presente en el suero humano y que normalmente inhibe el crecimiento de estafilococos no productores de coagulasa, permitiendo entonces su desarrollo abundante. Estudios posteriores de Kksed (26) han demostrado la realidad de este factor y han estudiado cuidadosamente sus propiedades. Como puede verse, hay elemento material en el cual se ha intentado correlacionar la producción de coagulasa con la capacidad del estafilococo para ser patógeno.

El propósito de este trabajo fue el de aislar la enzima

purificándola hasta tener un producto de gran actividad con el objeto de determinar si al ser inyectada intradérmicamente con estafilococos no productores de coagulasa, les confería la propiedad de producir lesiones importantes y progresivas semejantes a las que producirían estafilococos coagulasa positiva. Por otro lado, se tenía gran interés en determinar si esta enzima era antigénica y se podrían producir anticuerpos que anularan su acción coagulante y, una vez logrado esto, a los animales así inmunizados y con anticuerpos anticoagulasa circulantes, inocularlos con estafilococos coagulasa positiva, en presencia de animales no inmunizados y ver si los anticuerpos, al bloquear la acción de la coagulasa, afectaban en alguna forma la virulencia y, por consiguiente, el tamaño de las lesiones producidas. Los resultados de estas investigaciones, así como la implicación de los hallazgos, son expuestos en los siguientes capítulos.

MATERIALES Y METODOS

El primer paso necesario para la introducción a este estudio consistió en el aislamiento y purificación de la coagulasa con el objeto de tener esta enzima libre de otros factores agresores del *Staphylococcus* y probar su efecto posteriormente.

Preparación de coagulasa:

Para la elección de la mejor cepa productora de coagulasa se examinaron aproximadamente cuarenta cepas distintas de *Staphylococcus coagulasa* positiva que habían sido aisladas en su mayoría, de pacientes del Hospital Universitario. Después de la titulación de los sobrenadantes del cultivo en caldo, se encontró que los más altos eran de 1:64. Se escogió entonces la mejor, pero, como se vió más adelante después de intentos vanos de preparar una coagulasa de gran actividad, era necesario tener una cepa cuyo título de coagulasa fuera mucho mayor que los encontrados en estas cepas. Entonces se solicitó a Tager de la Universidad de Emory y a Ekstedt de la Universidad de Northwestern una de sus cepas tipo. Después de ensayarse ambas se escogió la cepa No. 104 de Tager cuyo título de coagulasa fué de 1:2048.

Para la cepa coagulasa negativa se probaron diez cepas, escogiéndose la cepa HU 7, aislada también de un paciente

del Hospital Universitario.

Para titular la coagulasa producida por las cepas se empleó el método siguiente. Se sembraron en caldo BHI incubándose durante 24 horas. En seguida se centrifugó y del sobrenadante se tomó 1 ml. y se puso en un tubo de ensayo de 13 X 100 mm., de ahí se tomó 0.5 ml. que se pasaron a otro tubo conteniendo 0.5 ml. de caldo y en adelante se fueron diluyendo pasando 0.5 ml. a otros tubos que contenían un volumen igual de caldo para hacer diluciones geométricas 1:2, 1:4, 1:8, etc. Se dejó un tubo conteniendo 0.5 ml. de caldo solo y que serviría de control negativo.

A cada tubo se le añadió 0.5 ml. de plasma citratado de conejo, se mezcló e incubó en baño de agua a 37°C durante tres horas, al final de las cuales se leyó, teniéndose como título de dicho sobrenadante, la dilución más alta que mostrara cualquier signo de coagulación.

Se escogió el plasma de conejo por ser éste el que forma coágulos más consistentes y duraderos y porque da menos resultados falsos negativos.

El método originalmente usado para la purificación de la coagulasa fué el descrito por Yotis y Ekstedt (27), como sigue:

1.—A cada litro de caldo BHI se le añade 1 ml. de las siguientes soluciones:

H_3BO_3	0.060 g litro
$MnCl_2 \cdot 11H_2O$	0.035 g litro
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.040 g litro
$H_2MoO_4 \cdot H_2O$	0.020 g litro
$FeCl_2 \cdot H_2O$	0.250 g litro
$ZnSO_4$	0.200 g litro
KI	0.100 g litro

El medio es distribuido en matraces de 1000 ml. poniendo 500 ml. en cada uno.

- 2.— La cepa de estafilococo coagulasa positiva es inoculada en placas con agar BHI e incubada por 24 horas a 37°C.
- 3.— Tubos que contienen alrededor de 10 ml. de caldo BHI son inoculados con una suspensión hecha añadiendo 1 ml. de caldo BHI a las placas anteriores. Los tubos son incubados durante tres horas a 37°C.
- 4.— Cada matraz es inoculado con el contenido de uno de los tubos e incubado durante 4-6 días a 37°C.
- 5.— Los cultivos son liberados de las células por centrifugación a 5000 RPM por 10 minutos.
- 6.— El material es acidificado lentamente con ácido clorhídrico 1N hasta un pH de 3,8 - 4,0. Se deja en el refrigerador (4°C) por 12-24 horas hasta que se sedimenta todo el precipitado formado (precipitación de la enzima en su punto isoeléctrico) (28).
- 7.— El sobrenadante es descartado y los precipitados reunidos por centrifugación a 3000 RPM por 5 minutos.
- 8.— El precipitado es lavado con 150 ml. de solución buffer de acetato (pH 3,8). Se centrifuga a 3000 RPM por 5 minutos.
- 9.— Se disuelve el precipitado en 150 ml. de solución buffer de fosfato M/15 pH 8,5. Se rectifica el pH y se pone a pH 8,5 - 9,0 con la adición cuidadosa de NaOH 1N. Se centrifuga por una hora a 5000 RPM. Se descarta el precipitado. Esto sirve para separar una fracción proteica inactiva que precipita con la coagulasa a pH 3,8 (28).
- 10.— Se acidifica el sobrenadante a un pH 6,5 con HCl 1N. Se añaden 150 ml. de alcohol de 95% a chorro capilar, con agitación constante a temperatura de -5°C. Se centrifuga en frío.

11.— El alcohol sobrenadante es descartado y el precipitado es juntado por centrifugación a la misma temperatura.

12.— El precipitado es lavado con 450 ml. de alcohol. Se centrifuga y se disuelve con solución buffer de fosfato pH 8.5, rectificando que sea más o menos de 8.2.

13.— Se añade sulfato de amonio sólido hasta alcanzar un 8-12% de saturación. Se deja en el refrigerador por 12-24 horas para que se forme el precipitado. Se centrifuga en frío y se descarta el precipitado, conservando el sobrenadante.

14.— Se ajusta el pH a 6.5-7.0 y se trata con 100 ml. de etanol. Se deja formar el precipitado en el frío por 12-24 horas.

15.— Se centrifuga de nuevo en frío descartando el sobrenadante y conservando el precipitado.

16.— El precipitado es lavado con 100 ml. de alcohol, centrifugado y disuelto en solución buffer de fosfato pH 8.2.

17.— Se añade sulfato de amonio hasta obtener un 10-15% de saturación. Se deja en frío para que se forme el precipitado durante 12-24 horas y éste es descartado por centrifugación.

18.— Se ajusta el pH del sobrenadante a 5.5-6.0 y se añaden de nuevo 100 ml. de alcohol de 95% a -10°C .

19.— Se diáliza contra agua y se liofiliza.

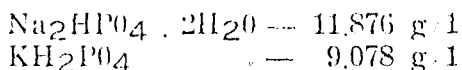
Las soluciones buffer fueron preparadas de la siguiente manera:

Para la solución buffer de acetato pH 3.8:

ácido acético 0.1N	176 ml.
acetato de sodio 0.1N	24 ml.

Para las soluciones buffer de fosfatos:

Soluciones madres:



Para pH 8,5:

9,7 partes de la solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
: 0,3 partes de la solución de KH_2PO_4

Para pH 8,2:

9,5 partes de la solución de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
: 0,5 partes de la solución de KH_2PO_4

Para medir el pH se usó un potenciómetro Beckman (Zeromatic) de electrodo de vidrio. Se ajustó el pH con una u otra solución si no coincidía exactamente con el pH deseado.

Viéndose que la coagulasa obtenida al final de la técnica no era lo suficientemente activa para poder utilizarla, se siguió la actividad de la coagulasa en cada paso de la técnica, viendo que al llegar a la precipitación con sulfato de amonio, la coagulasa perdía gran parte de su actividad. Se decidió, por este motivo, suprimir esas precipitaciones, concretándose a seguir los primeros pasos de la técnica y hacer varias precipitaciones con alcohol. Al final, en la última precipitación con alcohol y lavado el precipitado con más alcohol, se separó por decantación y el resto del alcohol que quedaba con el precipitado, se evaporó bajo corriente de aire seco. El precipitado fue entonces liofilizado. Además como se perdía también actividad durante las centrifugaciones a temperatura ambiente, se decidió hacerlas todas en centrifuga refrigerada.

Siguiendo esta técnica modificada se logró obtener una coagulasa en la que 1 mg. disuelto en 1 ml. de caldo BHI dió un título de 1:10²⁴ (recíproco de dilución) en tres horas de in-

cubación a 37°C. con 0.5 ml. de plasma de conejo.

La cantidad de coagulasa obtenida fué, aproximadamente, de 1.5 g. habiendo partido de la inoculación de seis litros de caldo BIII. La coagulasa liofilizada fué conservada a -20°C.

EXPERIMENTOS PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA COAGULASA PURIFICADA EN LA VIRULENCIA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASA NEGATIVA:

Este experimento fué diseñado con el objeto de ver si estafilococos coagulasa negativa mezclados con coagulasa incrementaban su virulencia, demostrable por la formación de una lesión cutánea más grande y semejante a la producida por estafilococos coagulasa positiva, en comparación con los controles de estafilococos coagulasa negativa.

Se hizo selección de conejos albinos de un peso de 2 a 2.5 Kg., todos obtenidos por cruce de hermanos, sin importar el sexo.

Una vez seleccionados los animales por sus características físicas, era necesario determinar si contenían cantidades importantes de anticuerpos antiestafilocócicos circulantes, ya fuera porque hubieran sufrido una infección o cuando menos, que hubiesen tenido contacto subclínico con el germen.

La técnica seguida para la búsqueda de anticuerpos consistió en la obtención de los sueros correspondientes, haciéndose diluciones de ellos en solución salina hasta 1:16 (volumen total 0.5 ml.). A estas diluciones y a controles negativos con solución salina sola, se les agregó igual volumen de antígeno, se pusieron en baño de agua a 37°C durante 3 horas, al final de las cuales se vió, con la ayuda de un espejo cóncavo de microscopio, si había o no aglutinación.

El antígeno fué preparado a partir de un cultivo de estafilococos coagulasa positiva en caldo BIII de 24 horas, que fué centrifugado y los gérmenes lavados varias veces con solución salina estéril y centrifugados, después se les añadió una solución de formol al 1%, que se dejó durante toda la no-

che. Se centrifugó, se lavaron las células con solución salina y finalmente, se suspendió en la misma. De esta suspensión se hizo una dilución a la que le fué tomada, en un fotocolorímetro Bausch and Lomb a 420 milimicrones, su porcentaje de transmisión, ajustándose con solución salina, hasta que dió una lectura de 70%.

Se escogieron aquellos conejos que no tenían anticuerpos o que los tenían a títulos sumamente bajos (no mayores de 1:2).

Determinación de la dosis mínima infectante (DMI).

Un grupo de 4 conejos fué usado para determinar la virulencia de la cepa de estafilococos coagulasa positiva (Tager 101) y la de estafilococos coagulasa negativa (HU7) antes de estudiarse el efecto de la coagulasa purificada en la virulencia de estafilococos coagulasa negativa.

A los animales se les rasuró el lomo en un área de quince por diez centímetros aproximadamente, cortando cuidadosamente todo el pelo. A estos conejos se les inyectó intradérmicamente en lugares estratégicos, distintas cantidades de cultivos de estafilococos coagulasa positiva y de estafilococos coagulasa negativa.

Antes de hacer las inoculaciones se hizo un cuanteo viable de los cultivos que se iban a inyectar, por el método clásico de hacer diluciones en solución salina de un cultivo en caldo BHI de 24 horas del germen, lavándose varias veces los gérmenes con solución salina y centrifugando, resuspendiéndose finalmente en su volumen original de caldo. Se tomó un ml. de estas diluciones y se pusieron en placas de petri, añadiéndoles agar nutritivo que se había mantenido líquido a 45 °C, mezclándose bien e incubándose durante 24 horas a 37°C.

Dos conejos fueron inyectados con 0.1 ml. del cultivo de estafilococos coagulasa positiva que contenía 3×10^7 bacterias y 0.1 ml. de las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} del mismo cultivo.

Los otros dos conejos se inyectaron con 0.1 ml. del cultivo de estafilococos coagulasa negativa que contenía 3×10^5 microorganismos y 0.1 ml. de las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} del mismo cultivo.

Las lesiones formadas se observaron a las 24, 48 y 72 horas, midiéndose el diámetro de las mismas en milímetros y observándose si hubo o no formación de pus.

Se observó que las mejores lesiones se obtenían con los cultivos sin hacer dilución alguna, ya que al disminuir una unidad de logaritmo la concentración de los gérmenes, las lesiones disminuían rápidamente de diámetro y se volvían muy variables, de tal manera que se adoptó usar el máximo de crecimiento de bacterias como unidad infectante.

Efecto de la coagulasa sobre la virulencia de estafilococos coagulasa negativa.

Una vez determinada la virulencia de las cepas, a un grupo de cinco conejos se inoculó en lugares estratégicos, con 0.1 ml. de un cultivo de estafilococos coagulasa negativa que contenía 9×10^6 microorganismos (cuanteo promedio de varios cultivos usados) adicionados con 1, 2.5, 5 y 10mg. de coagulasa purificada, respectivamente. Además se inoculó 0.1 ml. de este mismo cultivo solo y 0.1 ml. de un cultivo de estafilococos coagulasa positiva que contenía 3×10^7 bacterias (cuanteo promedio de varios cultivos empleados) que servirían como controles. También se inocularon con 5 mg. de coagulasa purificada disueltos en 0.1 ml. de solución salina estéril para ver su efecto por sí sola. Las bacterias de ambos cultivos empleados fueron lavadas repetidas veces con solución salina estéril y finalmente resuspendidas en un volumen igual al original con caldo BHI, antes de hacer las inoculaciones.

INMUNIZACION DE CONEJOS CON COAGULASA.

Preparación del antígeno:

Como muchos investigadores habían fracasado en la demostración del poder antigénico de la estafilocoagulasa inyectando animales directamente con coagulasa purificada o bien filtrados crudos de cultivos conteniéndola (Walston, 1935; Smith and Hale, 1944; Mercier, Pillet and Perry, 1948; Bekker, 1949) (29), se empezaron a usar distintos adyuvantes que, añadidos a la coagulasa, promovieran a la producción de anticuerpos.

Boake (30) demostró que usando fosfato de aluminio como adyuvante, se obtenía un buen título de anticoagulasa. Basándose en estos resultados, se pensó en emplear esta técnica para inmunizar los animales. La técnica es semejante a la descrita por Duthie y Lorenz (31) que tiene sus fundamentos en el método de Holt (32), que se describe para la preparación de un antígeno con toxoide diftérico. La principal diferencia entre la técnica usada por Boake y la de Duthie y Lorenz estriba en las distintas cantidades de coagulasa adsorbida al adyuvante.

La técnica consiste en la preparación del adyuvante, fosfato de aluminio, a partir de una solución de cloruro de aluminio haciéndola reaccionar con otra solución de fosfato trisódico, ajustando el pH final a 4.8-5.0. Se esteriliza al autoclave, se reajusta el pH añadiendo el preservador que es una solución de acetato de sodio y etil-mercuriotiosalicilato de sodio disueltos en agua. A este adyuvante se añade finalmente, la coagulasa.

De los trabajos de Boake y de Duthie y Lorenz se dedujo la cantidad de coagulasa que debería ser adsorbida por el fosfato de aluminio. Cada mililitro de la suspensión de fosfato de aluminio contenía seis miligramos de fosfato de aluminio. Duthie y Lorenz adsorbieron 3.5 mg. de coagulasa por mg. de $AlPO_4$ a un pH de 4.8. La coagulasa la disolvieron en solución salina a una concentración de 1%. Boake, en su trabajo, adsorbió 5 mg. de coagulasa sobre 3 mg. de $AlPO_4$.

Para tener una mayor seguridad de que la coagulasa fuera completamente adsorbida, se usaron 5 mg. de coagulasa disueltos en 0,5 ml. de solución salina adsorbiéndose sobre 3 mg. de $AlPO_4$ contenidos en 0,5 ml. de la suspensión de fosfato de aluminio; siendo el volumen total de 1 ml.

Se prepararon 50 ml. de la suspensión de $AlPO_4$ a los que se agregó lentamente y mezclando bien, 500 mg. de la coagulasa purificada y disueltos en 50 ml. de solución salina. Una vez preparado el antígeno, fué conservado a $4^{\circ}C$.

Cada uno de los animales, de un grupo de diez conejos, recibió una inyección intramuscular de 1 ml. del antígeno semanalmente, durante nueve semanas.

Titulación de la anticoagulasa:

Se investigaron los títulos de anticoagulasa en los sueros correspondientes a las cuatro, seis y nueve semanas.

La técnica empleada para esta titulación fué semejante a la descrita por Boake (30). En primer lugar se probó el título de la coagulasa que se iba a emplear en la titulación el mismo día que se iba a hacer, para determinar la dosis mínima coagulante.

Se hicieron diluciones de los sueros hasta 1:64 con solución salina (volumen final 0,25 ml.). A cada tubo se le agregaron 2 dosis mínimas coagulantes disueltas en 0,25 ml. de peptonal al 2%, se mezcló muy bien y se dejó en baño de agua a $37^{\circ}C$ durante una hora. Finalmente se añadió a cada tubo, igual volumen de plasma de conejo. Se mezcló perfectamente y se dejó en el baño de agua durante tres horas.

Se tomó como título de anticoagulasa, la dilución más alta en que hubiera sido inhibida completamente la acción de la coagulasa.

Inoculación de animales inmunizados y no inmunizados con estafilococos coagulasa positiva y coagulasa negativa.

Una vez determinado el título de anticuerpos de cada uno de los animales inmunizados, se procedió a la inoculación

intradérmica de predeterminadas cantidades de estafilococos coagulasa positiva y de estafilococos coagulasa negativa a estos animales y a otros no inmunizados que sirvieron de controles, para ver si la inmunización con coagulasa y la presencia de anticuerpos contra ésta, inhibía la implantación de los estafilococos coagulasa positiva.

Se inyectó 0.1 ml. de un cultivo de estafilococos coagulasa positiva que contenía 1.16×10^7 bacterias; 0.1 ml. de un cultivo de estafilococos coagulasa negativa que contenía 5.6×10^8 microorganismos y finalmente, 0.1 ml. de diluciones 1:10 de ambos cultivos. Estas bacterias fueron también lavadas repetidas veces con solución salina estéril y resuspendidas en su volumen original con caldo BIII, antes de emplearse en las inoculaciones.

Las lesiones se observaron a las 24, 48 y 72 horas, midiéndose su diámetro en milímetros y observándose la formación de pus.

RESULTADOS

Purificación de coagulasa:

Siguiendo la técnica de Yotis y Ekstedt con las modificaciones mencionadas, se obtuvo una coagulasa de título 1:1024.

Titulación de anticuerpos antiestafilocócicos en animales:

Se encontró que los sueros de los animales en su mayoría, no contenían anticuerpos antiestafilocócicos, solamente los conejos números dos y cinco mostraron algunos signos de aglutinación en la dilución 1:1, empleándose sin embargo, por ser muy bajo este título y estar los conejos en perfecto estado de salud.

Tabla No. 1

Determinación de la virulencia de la cepa *Staphylococcus coagulasa* positiva Tager 101 y de la cepa *Staphylococcus coagulasa* negativa HU 7:

Staphylococcus coagulasa positiva

Conejo No. 2

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
3×10^7	30 mm.	25 mm.	21 mm.
3×10^6	10 mm.	—	—
3×10^5	8 mm.	—	—
3×10^4	mm.	—	—
3×10^3	2 mm.	—	—

Conejo No. 8

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
3×10^7	35 mm.	*30 mm.	*26 mm.
3×10^5	12 mm.	—	—
3×10^3	10 mm.	—	—
3×10^2	10 mm.	—	—
3×10^1	6 mm.	—	—

Staphylococcus coagulasa negativa

Conejo No. 16

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
3×10^6	15 mm.	*15 mm.	14 mm.
3×10^3	—	—	—
3×10^2	—	—	—
3×10^1	—	—	—

Conejo No. 17

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
3×10^5	16 mm.	10 mm.	10 mm.
3×10^3	10 mm.	—	—
3×10^2	—	—	—
3×10^1	—	—	—

(*) Significa producción de pus.

Tabla No. 2

Resultado del efecto de la coagulasa purificada en la virulencia del estafilococo coagulasa negativa:

Conejo No. 19

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	13 mm.	12 mm.	10 mm.
Staph. Coag. negativa	6 mm.	6 mm.	4 mm.
5 mg. de coagulasa en 0.5 ml. de sol. salina	5 mm.	—	—
Staph. Coag. negativa + 1 mg. de coagulasa	5 mm.	5 mm.	3 mm.
Staph. Coag. negativa + 2.5 mg. de coagulasa	10 mm.	9 mm.	8 mm.
Staph. Coag. negativa + 5 mg. de coagulasa	*15 mm.	*13 mm.	12 mm.

Conejo No. 3

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiv.	13 mm.	12 mm.	11 mm.
Staph. Coag. negativa	5 mm.	6 mm.	5 mm.
5 mg. de coagulasa en 0.5 ml. de sol. salina	5 mm.	—	—
Staph. Coag. negativa + 1 mg. de coagulasa	5 mm.	5 mm.	4 mm.
Staph. Coag. negativa + 2.5 mg. de coagulasa	7 mm.	6 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa + 5 mg. de coagulasa	*13 mm.	*12 mm.	10 mm.

Conejo No. 18

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	32 mm.	30 mm.	25 mm.
Staph. Coag. negativa	13 mm.	11 mm.	9 mm.
5 mg. de coagulasa en 0.5 ml. de sol. salina	6 mm.	4 mm.	3 mm.
Staph. Coag. negativa + 1 mg. de coagulasa	15 mm.	13 mm.	12 mm.
Staph. Coag. negativa + 2.5 mg. de coagulasa	15 mm.	14 mm.	12 mm.
Staph. Coag. negativa + 5 mg. de coagulasa	15 mm.	15 mm.	13 mm.

Conejo No. 21

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	9 mm.	7 mm.	6 mm.
Staph. Coag. negativa	6 mm.	6 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa + 1 mg. de coagulasa	7 mm.	7 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa + 5 mg. de coagulasa	11 mm.	10 mm.	8 mm.
Staph. Coag. negativa + 10 mg. de coagulasa	12 mm.	11 mm.	10 mm.

Conejo No 20

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	10 mm.	8 mm.	7 mm.
Staph. Coag. negativa	7 mm.	6 mm.	6 mm.
Staph. Coag. negativa · 1 mg. de coagulasa	8 mm.	7 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa · 5 mg. de coagulasa	10 mm.	*10 mm.	9 mm.
Staph. Coag. negativa · 10 mg. de coagulasa	11 mm.	*10 mm.	8 mm.

(*) Significa producción de pus.

Tabla No. 3

Titulación de anticoagulasa (Después de 9 semanas de inmunización):

CONEJOS	DILUACIONES								
	No.	S.D.	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	2+
7	—	—	—	—	—	—	—	—	2+
11	—	—	—	—	—	—	—	2+	4+
12	—	—	—	—	—	—	—	3+	4+
15	—	—	—	—	—	—	3+	3+	4+
1	—	—	—	—	—	—	—	2+	3+
14	—	—	—	—	2+	2+	3+	3+	4+

En las dos primeras titulaciones (a las 4 y 6 semanas) no hubo una inhibición completa de la acción de la coagulasa, sin embargo, se notó disminución en el tamaño y consistencia del coágulo en las diluciones más bajas.

Tabla No. 1

Resultados de la inoculación con estafilococos coagulasa positiva y estafilococos coagulasa negativa a animales inmunizados y no inmunizados:

Controles

Conejo No. 22

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	25 mm.	25 mm.	15 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	5 mm.	7 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa	10 mm.	9 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	7 mm.	5 mm.	—

Conejo No. 9

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	24 mm.	20 mm.	11 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	7 mm.	6 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa	5 mm.	6 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	—	—	—

Conejo No. 10

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	13 mm.	*20 mm.	*18 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	5 mm.	* 5 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa	8 mm.	7 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	—	—	—

Animales Inmunizados

Conejo No. 4

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	20 mm.	*30 mm.	*21 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	6 mm.	10 mm.	* 7 mm.
Staph. Coag. negativa	10 mm.	* 6 mm.	4 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	3 mm.	—	—

Conejo No. 7

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	12 mm.	* 5 mm.	7 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	—	—	—
Staph. Coag. negativa	6 mm.	—	—
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	—	—	—

Conejo No. 11

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	*25 mm.	**30 mm.	24 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	10 mm.	10 mm.	—
Staph. Coag. negativa	*20 mm.	*20 mm.	10 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	10 mm.	10 mm.	—

Conejo No. 12

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	*25 mm.	*20 mm.	**20 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	10 mm.	12 mm.	*10 mm.
Staph. Coag. negativa	*15 mm.	*9 mm.	6 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	5 mm.	3 mm.	—

Conejo No. 15

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	*30 mm.	**30 mm.	**28 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	*15 mm.	*15 mm.	8 mm.
Staph. Coag. negativa	*20 mm.	**8 mm.	7 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	—	—	—

Conejo No. 1

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	20 mm.	*25 mm.	*15 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	—	5 mm.	5 mm.
Staph. Coag. negativa	13 mm.	*10 mm.	7 mm.
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	—	—	—

Conejo No. 14

INOCULOS	24 horas	48 horas	72 horas
Staph. Coag. positiva	15 mm.	*10 mm.	9 mm.
Staph. Coag. positiva Dilución 1:10	—	5 mm.	—
Staph. Coag. negativa	10 mm.	5 mm.	—
Staph. Coag. negativa Dilución 1:10	3 mm.	—	—

(* y **) significan producción de pus en distinta proporción.
El resto de los animales inmunizados murió en el curso de la inmunización.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Mucha atención se ha prestado en los últimos años a la estafilocoagulasa como uno de los factores más importantes y quizá indebidamente exagerada, como el factor responsable de la virulencia de los estafilococos. Es de esperarse que cualquier estudio en el cual se implique a la coagulasa como factor capital, sufrirá desde un principio de cierta miopía al olvidar otros factores agresivos también muy importantes.

La purificación de la coagulasa es un prerrequisito para cualquier estudio de esta índole y muy diversos autores (Tagger, Ekstedt, Yotis, Duthie, Haughton) (33, 27, 34) han logrado por medio de diversas técnicas, aislar esta enzima concentrando muchas veces su actividad. En este estudio se siguieron los lineamientos clásicos, lo cual con los cuidados adecuados, tales como trabajar este producto en frío constantemente, se logró un producto de gran actividad. Desde luego, es importante partir de una cepa que sea una buena productora de coagulasa con el objeto de asegurar desde un principio, una cantidad importante de la enzima. El producto liofilizado se conserva bastante bien y sería la forma ideal de conservarlo.

El primer paso que se consideraba de importancia, fue el determinar si estafilococos no productores de coagulasa y con una capacidad para producir lesiones cutáneas muy limi-

tada incrementarían su capacidad si se agregaba al inóculo la enzima pacificada. Naturalmente esto requirió determinar anticuerpos antiestafilocócos en la sangre de los animales y también es determinar la dosis infecciosa mínima intradérmica de los cepes que se proponían usar, con el objeto de escoger y conocer la cantidad de microorganismos que diera una lesión clara, visible y reproducible.

En vista de que la mejor dosis fue aquella en que se usó el cultivo de 24 horas sin dilución alguna excepto que las células fueron repetidamente lavadas con solución salina estéril y finalmente en el mismo volumen original se usó sistemáticamente un inóculo que contenía en 0.1 ml. para la copa y reactora de coagulasa aproximadamente 3×10^7 bacterias y para la copa coagulasa negativa de 3×10^7 . Las mejores lesiones se obtenían en las primeras 24 horas y a medida que pasaba el tiempo iban gradualmente disminuyendo. Se decidió, en el caso de los estafilococos coagulasa negativa, escoger una concentración de gérmenes que diera una pequeña lesión y determinar después si la adición de coagulasa incrementaba el tamaño de la lesión, en lugar de escoger una concentración de gérmenes que no diera lesión por el peligro de haber tomado una cantidad muy por debajo del umbral de infección y por lo tanto que no llegase a ser alcanzado aún con la adición de coagulasa.

Los resultados de este experimento indican que no hay un incremento importante de la lesión estafilocócica producida por la adición de coagulasa para a estafilococos coagulasa negativa en cantidades de 1 ó 2.5 mg. por inóculo. En algunos casos, al agregar 5 ó hasta 10 mg. de coagulasa, se obtuvo un incremento de actividad en la lesión evidenciado no tanto por el tamaño de ella sino por la aparición de pus a las 24 horas de desarrollo de ella y en algunos casos, hasta las 48 horas. En otros casos, al agregar a la inyección intradérmica de 1 mg. de coagulasa suspendida en solución salina, produjo lesiones similares a las de 24 horas, que se eliminaban espontáneamente en el curso de este tiempo, de tal manera que se puede concluir que no hubo algún incremento en la actividad de

truidos por los leucocitos. En el caso de los estafilococos que tienen la propiedad de sintetizar la enzima, verifican este bloqueo por sí solos pero además cuentan con otros numerosos factores que hacen a la fagocitosis poco eficiente, además de producir otras sustancias que garantizan, por decirlo así, la supervivencia de esas células en el tejido.

Diversos autores han fracasado en obtener anticuerpos contra la estafilocagulasa en diversos animales (Watson, 1935; Smith and Hale, 1944; Mercier, Pillet y Perry, 1948; Bekler, 1949) (29). Sin embargo, Tager y Hales (35) obtuvieron anticuerpos contra la enzima usando grandes cantidades de estafilocagulasa purificada, en el conejo. En el mono, aparentemente, la producción es más fácil (Rammelkamp, Badger, Dingle, Feller y Hodges, 1950) (36). Duthie y Lorenz (31) por un lado y Boake (30) por otro, lograron excelentes títulos en conejos usando un adyuvante (fosfato de alanino).

En este estudio se lograron obtener títulos sustanciales de anticoagulasa que variaron desde 1:2 hasta 1:32 utilizando para su titulación una técnica semejante a la descrita por Boake (30) de inhibición de coagulación, solo que en este caso se usaron dos unidades de coagulasa en lugar de cinco que usó el autor mencionado. Estos títulos, según se demuestra en la tabla No. 3, fueron obtenidos después de nueve semanas de inmunización con el antígeno indicado en el capítulo de Materiales y Métodos. En titulaciones llevadas a cabo a las 4 y 6 semanas, se obtuvo una inhibición parcial de la acción coagulante de la enzima evidenciada por una disminución en el tamaño del coágulo en los tubos de baja dilución del suero, pero en ningún caso se llegó a la inhibición completa; en la titulación después de la novena semana, si hubo una inhibición de la coagulación de la enzima debida a un "inhibidor" presente en el suero que no existía antes de la inmunización que iba disminuyendo su capacidad inhibitoria a medida que se iba diluyendo. En vista de esta evidencia del incremento del título a medida que aumentaba el tiempo de inmunización, da razón para pensar que este factor inhibitorio es un anticuerpo contra la coagulasa.

Los animales inmunizados con coagulasa que mostraron anticuerpos en su suero fueron inoculados con una cepa de estafilococos coagulasa positiva y otra coagulasa negativa y a animales que no habían sido inmunizados se les sometió al mismo inoculo. El propósito fundamental era determinar si la existencia de anticuerpos anticoagulasa en el animal bloquearía ésta y determinaba que el germen se viera imposibilitado para ejercer su acción patógena, ya sea inhibiendo el establecimiento y la multiplicación del germen en el tejido o reduciéndolo de una manera importante al ser comparado con las lesiones producidas por la misma cepa en animales no inmunizados.

Si se revisa con cuidado la tabla No. 4 en la cual se exponen los resultados obtenidos en siete conejos inmunizados con las lesiones obtenidas en tres conejos controles no inmunizados, puede verse que en los controles el tamaño de las lesiones producidas por estafilococos coagulasa positiva lavados cuidadosamente e inoculados en una concentración de 1.16×10^7 en un volumen de 0.1 ml., produjeron lesiones que oscilaban en un diámetro de 12 a 25 mm., aproximadamente, en algunos casos con formación de pus a las 48 horas, mientras que en los animales inmunizados, lejos de presentarse una inhibición o retardo de la aparición de la lesión, ni siquiera hubo una disminución importante del tamaño de ésta y en algunos de los casos, algunas de ellas tendieron a ser ligeramente mayores y con mayor inclinación a la formación de pus.

La evidencia obtenida en este trabajo indica que la antiestafilococulasa no tuvo ningún efecto en suprimir o disminuir las lesiones causadas por estafilococos coagulasa positiva, como tampoco ninguna acción sobre los estafilococos coagulasa negativa, a pesar de existir en la circulación anticuerpos contra esta cepa. Esto no es ninguna sorpresa ya que otros autores (Rammekant y Lebovitz, 137) también han demostrado en monos que la presencia de anticuerpos no prevenía la aparición de lesiones. Sin embargo los resultados obtenidos por Boake (139) en animales inmunizados, pero introduciendo los organismos por vía intra-

venosa, habían mostrado una mayor supervivencia de los animales inmunizados.

El resultado de estos experimentos, en realidad, no hacen sino confirmar más lo aseverado por Elek (38) y otros autores de que probablemente la acción de la coagulasa es una reacción "in vitro", que quizá se lleva a cabo en escala limitada en los tejidos y si esto sucede, no significa más que uno de tantos mecanismos que usa el estafilococo patógeno para eludir la muy eficaz línea de defensa constituida por la fagocitosis, pero que, finalmente, es vencido y fagocitado al destruir las enzimas proteolíticas las redes de fibrina formadas y que eran su protección. Los experimentos en animales inmunizados con coagulasa indican que a pesar de ser bloqueada esta enzima, ya que se demostraron anticuerpos circulantes, no influyeron en nada en el establecimiento y evolución de la lesión estafilocócica a pesar de que las células hubiesen sido lavadas repetidamente y por lo tanto, desprovistas de factores tóxicos que se hubiesen producido durante su cultivo. Esto demuestra que, a pesar de la neutralización de su coagulasa, el estafilococo se multiplicó y produjo junto con coagulasa, otros factores agresivos dermonecroticos tales como alfa hemolisina, delta hemolisina, leucotoxina, hialuronidasa, etc., que causaron el daño suficiente como para manifestarse clínicamente y por lo tanto, no debemos de dar a la coagulasa un papel tan decisivo ni en la iniciación ni en la producción de la lesión misma, sino como un factor accesorio de mayor o menor importancia y que colabora probablemente, en impedir que se lleve a cabo una acción fagocitaria satisfactoria y esto, solo por un tiempo limitado.

De esta manera, a pesar de no haber comprobado una hipótesis que hubiese resultado muy interesante —la inhibición de la iniciación de lesiones en animales inmunizados con coagulasa, se logró, sin embargo, demostrar satisfactoriamente:

Que se puede obtener una coagulasa de alta actividad para estudios experimentales.

Que la coagulasa incrementa en alguna forma la super-

vivencia y capacidad para producir lesiones de estafilococos que no producen coagulasa.

Que es posible inmunizar conejos con esta enzima purificada adsorbida sobre un adyuvante de fosfato de aluminio con la producción de anticuerpos circulantes capaces de inhibir la acción de esta enzima en el tubo de ensayo.

Y por último, que los animales inmunizados y con anticuerpos circulantes contra la coagulasa son incapaces por el hecho de bloquear la acción de esta enzima, de detener o controlar el establecimiento y la multiplicación de los gérmenes, como tampoco, desde luego, la producción de otros factores tóxicos capaces de producir lesiones semejantes a las obtenidas en animales no inmunizados.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.—Knight, V., et al. The effect of antimicrobial drugs on the staphylococcal flora of hospital patients, *Ann. Inter. Med.*, 49:536-543, 1958.
- 2.—Rodríguez, M. A. y Vizeaya, A. Sensibilidad a cuatro antibióticos de *Micrococcus pyogenes* coagulasa positivos aislados de pacientes intra- y extrahospitalarios, *Rev. Latinoamer. Microb.*, 1:101-110, 1958.
- 3.—White, A., et al. Studies on the origin of drug resistant Staphylococci in a mental hospital, *Amer. Jour. Med.*, 27:26-39, 1959.
- 4.—Blomm, M. T. El "dorado villano" de los hospitales, *El Hospital*, 11:18-19, 1958.
- 5.—Madd, S. Staphylococcal infections in the hospital and community, *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 166:1177-1178, 1958.
- 6.—Bass, J. A., et al. Epidemiologic study of a hospital outbreak of micrococci infections, *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 166:731-734, 1958.
- 7.—Brown, J. W. Hygiene and education within hospitals to prevent Staphylococcal infections, *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 166:1185-1191, 1958.
- 8.—Ashbister, C. Staphylococcal infection in infancy, *Med Jour. Australia*, 2:629-633, 1959.
- 9.—Vogel, R. A., et al. The genesis and spread of a hospital staphylococcal epidemia on an adult medical ward, 261: 1301-1309, 1959.
- 10.—Mendes, T. C. y Rodríguez, M. A. Estudio epidemiológico de *Staphylococcus aureus* en pacientes extra- e intra-hospitalarios y personal asistencial empleando técnicas bacteriofugicas, *Rev. Latinoamer. Microb.*, 2:139-152, 1959.
- 11.—Wysham, D. N. and Kirby, W. Micrococcal (Staphylococcal) infections in a General Hospital, *Jour. Amer. Med. Assoc.*, 164:1733-1739, 1957.
- 12.—Wheeler, W. E. Staphylococcal infections, *Pediatrics*, 23:977-979, 1959.

- 13.—Elek, S. D. and Levy, E. Distribution of haemolysis in pathogenic and non-pathogenic staphylococci. Jour. Path. Bact. 62:541-551, 1950.
- 14.—Kleiger, B. and Blair, J. E. Role of toxin and use of antitoxin in systemic staphylococci infection. Arch. Surgery, 46:548-551, 1943.
- 15.—Kleiger, B., et al. Behavior of rabbits after infection with toxigenic and nontoxigenic staphylococci. Arch. Surgery, 45:571-577, 1942.
- 16.—Schub, I. G. and Merritt, Ch. D. The identification of *Staphylococcus aureus*. A method for the determination of coagulase production and mannitol fermentation in a single medium. Bull. John Hopkins Hosp. 106:25-35, 1960.
- 17.—Esber, R. J. and Faulconer, R. J. A medium for initial visual demonstration or production of coagulase and fermentation of mannitol by pathogenic staphylococci. Amer. Jour. Clin. Path. 22:192-194, 1959.
- 18.—Blair, J. E. Factors determining the pathogenicity of Staphylococci. Ann. Rev. Microb. 12:491-506, 1958.
- 19.—Referido por Elek, S. D. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. & S. Livingstone, Ltd. London. 314-315, 1959.
- 20.—Referido por Elek, S. D. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. & S. Livingstone, Ltd. London. 203, 1959.
- 21.—Referido por Elek, S. D. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. & S. Livingstone, Ltd. London. 178, 1959.
- 22.—Referido por Boake, W. C. Antistaphylocoagulase in experimental Staphylococcal Infections. Jour. Immunol. 76:89-96, 1956.
- 23.—Referido por Elek, S. D. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. & S. Livingstone, Ltd. London. 178, 1959.
- 24.—Hale, J. H. and Smith, W. The influence of coagulase on the phagocytosis of staphylococci. Brit. Jour. exp. Path.

- 26:200-216, 1945.
- 27.—Eliassoff, R. D. and Nungester, W. J. Coagulase in Reversing Antibacterial Activity of Normal Human Serum on *Micrococcus pyogenes*. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 89:90-94, 1955.
- 28.—Eliassoff, R. D. The effect of coagulase on the antibacterial activity of normal human serum against selected strains of *Micrococcus pyogenes*. *Ann. New York Acad. Sci.* 65:119-131, 1956.
- 29.—Communication personal.
- 30.—Eliassoff, R. D. Activity of Human Serum and coagulase on *Micrococcus pyogenes*. *Jour. Bact.* 72:157-161, 1956.
- 31.—Referido por Elek, S. D. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease, E. & S. Livingstone, Ltd. London, 1958, 1959.
- 32.—Bonke, W. C. Antistaphylocoagulase. In: experimental Staphylococcal Infections. *Jour. Immunol.* 76:89-96, 1956.
- 33.—Dumble, E. S. and Lorenz, L. L. Staphylococcal coagulase: Mode of action and antigenicity. *Jour. Gen. Microb.* 6:95-107, 1952.
- 34.—Referido por Boyd, W. C. *Fundamentals of Immunology*. Interscience Publ. Inc., New York, 375. Ed. 635, 1957.
- 35.—Tager, M. Problems in the coagulation of plasma by staphylocoagulase. *Ann. New York Acad. Sci.* 65:109-118, 1956.
- 36.—Dumble, E. S. and Houghton, G. Purification of free Staphylococcal coagulase. *Biochem. Jour.* 70:125-131, 1958.
- 37.—Tager, M. and Hales, The environmental production of coagulase by staphylocoagulase. *Jour. Immunol.* 60:175-187, 1948.
- 38.—Barnhill, G. O. et al. Antigenicity of a free staphylococcal coagulase. *Jour. Infect. Dis.* 86:159-163, 1950.
- 39.—Barnhill, G. O. and Lutz, H. M. The role of coagulase in the development of infections. *Ann. New York Acad. Sci.* 47:161-171, 1950.
- 40.—Referido por Elek, S. D. *Staphylococcus pyogenes*, and its relations to disease, E. & S. Livingstone, Ltd. London, 178-215, 1959.